

IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN EN CRUDO POR
LC-ORBITRAP-MS y GC-QqQ-MS

ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2017

IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN EN CRUDO POR
LC-ORBITRAP-MS y GC-QqQ-MS

ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ

Trabajo de investigación para optar al título
de Magíster en Química

Directora

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

Co-director

JAIRO R. MARTÍNEZ MORALES, Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA

2017

DEDICATORIA

A todas las personas que siempre han creído en mí, especialmente, a mis abuelos, padres y hermanos.

A la construcción de un país libre, soberano y en paz.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Elena y Jairo, por su esmero en hacernos personas críticas, eruditas y conscientes. Por guiarnos hacia un país con menos deficiencias científicas. Muchas gracias, por las recomendaciones y enseñanzas en el desarrollo de éste proyecto.

Al Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) dentro del Acuerdo de Cooperación No. 06 derivado del Convenio Marco No. 5211794, suscrito con ICP-Ecopetrol S.A., y a la Universidad Industrial de Santander. Gracias, por todo el apoyo logístico y financiero para la realización de esta investigación.

A Camilo Durán, por el apoyo logístico en el desarrollo del Acuerdo de Cooperación No. 06 UIS-ICP.

A Robert Márquez y José Domingo, profesionales del ICP, por las capacitaciones y asesorías en el área de geoquímica orgánica.

A Mauricio Vásquez, por sus sugerencias y aporte de muestras de roca y crudo (acuerdo de cooperación UIS-ICP).

A todos los integrantes de CROM-MASS y Cenivam, especialmente a los compañeros del semillero de geoquímica orgánica, por compartir su tiempo, ideas y buen ambiente de estudio y trabajo.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	31
1. ESTADO DEL ARTE	35
1.1. CRUDO.....	35
1.1.1. Reservas.....	36
1.1.2. Clasificación.....	37
1.1.3. Biodegradación.....	38
1.2. BIOMARCADORES.....	39
1.2.1. Definición.....	39
1.2.2. Aplicaciones.....	40
1.2.3. Hidrocarburos saturados y aromáticos.....	41
1.2.4. Hidrocarburos monoaromáticos.....	43
1.2.5. Hidrocarburos diaromáticos.....	44
1.2.6. Hidrocarburos poliaromáticos.....	46
1.2.7. Benzotiofenos.....	47
1.2.8. Benzohopanos.....	47
1.2.9. Esteroides monoaromáticos.....	48
1.2.10. Esteroides triaromáticos.....	49
1.3. ÁCIDOS NAFTÉNICOS.....	50
1.3.1. Definición.....	50
1.3.2. Estructura.....	51
1.3.3. Importancia.....	52
1.3.4. Biodegradación.....	53
1.3.5. Índice de biodegradación.....	54
1.4. FRACCIONAMIENTO DE CRUDO EN COLUMNA.....	54
1.4.1. Precipitación de asfaltenos.....	55

1.4.2. Fracción saturada	55
1.4.3. Fracción aromática	55
1.4.4. Fracción resinas.....	56
1.5. PARÁMETROS MOLECULARES.....	56
1.6. ANÁLISIS INSTRUMENTAL.....	57
1.6.1. Masas nominales y exactas	58
1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES	58
1.7.1. Detectores.....	58
1.8. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-QqQ-MS (MODO MRM).....	60
1.9. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	61
1.9.1. Detectores en cromatografía líquida de alta resolución	61
1.10. ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (<i>TIME OF FLIGHT, TOF</i>).....	62
1.11. ANALIZADOR ORBITRAP	63
2. CIENCIOMETRÍA.....	65
2.1. BASE DE DATOS SCOPUS (<i>ELSEVIER</i>)	65
3. GENERALIDADES DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO	72
3.1. LOCALIZACIÓN.....	72
3.2. ANTECEDENTES.....	73
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	75
4.1. MATERIALES Y REACTIVOS	75
4.1.1. Reactivos y solventes	75
4.1.2. Material de referencia certificado	75
4.1.3. Material de laboratorio	76
4.2. MUESTRAS DE CRUDO	77
4.3. OBTECIÓN DE MALTENOS Y ASFALTENOS.....	78
4.3.1. Precipitación de asfaltenos	78

4.3.2. Separación de maltenos	79
4.4. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE ELUCIÓN	80
4.5. ELIMINACIÓN DE <i>n</i> -PARAFINAS CON ZEOLITA ZSM-5.....	80
4.6. FRACCIONAMIENTO DE CRUDO PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NAFTÉNICOS – ENSAYOS PRELIMINARES	81
4.6.1. Cromatografía líquida en columna abierta	81
4.6.2. Limpieza de fracción polar	81
4.7. ANÁLISIS INSTRUMENTAL	82
4.7.1. Análisis de biomarcadores aromáticos por GC-MS/SIM	82
4.7.2. Cromatografía de gases – Analizador triple cuadrupolar (GC-QqQ-MS)	83
4.7.3. Cuantificación de biomarcadores aromáticos analizados con GC-MS y GC-QqQ-MS	83
4.8. ANÁLISIS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN CRUDO POR LC-ORBITRAP- MS	83
5. RESULTADOS	85
5.1. DETERMINACIÓN DE MALTENOS Y ASFALTENOS	85
5.2. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE ELUCIÓN	87
5.2.1. Análisis de fracciones por FT-IR	91
5.3. ANÁLISIS <i>WHOLE OIL</i>	95
5.4. FRACCIÓN SATURADA.....	98
5.5. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS EN CRUDO	107
5.6. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-MS/SIM.....	108
5.7. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-QqQ-MS.....	111
5.7.1. Método DFT para predicción de orden de elución	111
5.8. DETERMINACIÓN DE TRANSICIONES MRM PARA EL ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS	114
5.8.1. Transiciones MRM	114
5.8.2. Determinación de energía de cámara de colisiones activadas en el análisis de biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM)	138

5.8.3. Relaciones moleculares determinadas con biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM)	148
5.9. ANÁLISIS DE FRACCIÓN POLAR DE CRUDOS BIODEGRADADOS	161
5.9.1. Obtención de extracto polar a partir de crudo	161
5.9.2. Fraccionamiento completo de crudo	164
5.9.3. Análisis por FT-IR de fracciones y extractos polares de crudo	165
5.9.4. Análisis por GC-FID y GC-MS (<i>full scan</i>) de fracciones y extractos polares de crudo	167
5.9.5. Análisis por HPLC-DAD de fracciones y extractos polares de crudo	174
5.9.6. Fraccionamiento selectivo en columna de elución	176
5.9.7. Formación de metilésteres a partir de ácidos nafténicos	176
5.9.8. Condiciones de elución en columna de fraccionamiento selectivo	178
5.10. ANÁLISIS DE FRACCIONES POLARES POR UHPLC-ORBITRAP-MS...	184
6. CONCLUSIONES	199
BIBLIOGRAFÍA	201
ANEXOS	214

LISTA DE ABREVIATURAS

A/C	Relación ácidos acíclicos y cíclicos
AADAMC	Ácido 1-adamantanocarboxílico
A6PH	Ácido 6-fenilhexanoico
ANH	Agencia Nacional de Hidrocarburos (Colombia)
API°	Gravedad API (<i>American Petroleum Institute</i>)
BP3M	3-Metilbifenilo
BP4M	4-Metilbifenilo
BSTFA	N,O- <i>bis</i> (trimetilsilil)trifluoroacetamida
ca.	Cantidad aproximada
CAD	Celda de colisiones activadas
CI	Ionización química
Da	Dalton
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBE	Equivalencia de doble enlace
DBT	Dibenzotiofeno
DBTM	Metildibenzotiofeno
DFT	Teoría funcional de carga
DMP	Dimetilfenantreno
eg.	Por ejemplo
EIC	Corriente iónica extraída (<i>Extract Ion Chromatogram</i>)
ELLB	Extracción líquido-líquido por lotes
ESI	Ionización <i>Electrospray</i> (<i>Electrospray interface</i>)
FID	Detector de ionización en llama
FLD	Detector de fluorescencia
FT-ICR MS	Espectrometría de masas resonancia de ion ciclotrón con transformada de <i>Fourier</i>
FT-IR	Infrarrojo con transformada de <i>Fourier</i>
GC	Cromatografía de gases

GC/APCI-MS	Cromatografía de gases- Espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica
GC-FID	Cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama
GC x GC	Cromatografía de gases bidimensional
GC x GC-TOFMS	Cromatografía de gases bidimensional – espectrometría de masas (detector de tiempo de vuelo)
GC-MS	Cromatografía de gases- Espectrometría de masas
GC-MS/SIM	Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (monitoreo de ion seleccionado)
GC-QqQ-MS	Cromatografía de gases con analizador triple cuadrupolar
HCD	<i>High Collision Dissociation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP	Instituto Colombiano del Petróleo
K _a	Constante de acidez
LC-MS	Cromatografía líquida - Espectrometría de masas
LC/FT-ICR MS	Cromatografía líquida con espectrometría de masas - Resonancia de ion ciclotrón con transformada de <i>Fourier</i>
MA	Esteroides monoaromáticos
MDR	Variación de metilfenantreno
MME	Ministerio de Minas y Energía
MP	Metilfenantreno
MPI	Índice de metilfenantreno
MPLC	Cromatografía líquida de presión media
MRC	Material de referencia certificado
MRM	Monitoreo de reacción múltiple (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MSD	Detector selectivo de masas
<i>m/z</i>	Relación masa sobre carga
NAs	Ácidos nafténicos
N1M	1-Metilnaftaleno
N2M	2-Metilnaftaleno

NSO	Compuesto polares nitrogenados, oxigenados o azufrados
OPEP	Organización de Países Exportadores de Petróleo
PAH	Hidrocarburos poliaromáticos
PCA	Análisis de componentes principales
PDMS	Polidimetilsiloxano
Phen	Fenantreno
PVT	Vaporización programada por temperatura
QqQ	Analizador triple cuadrupolar
Rf	Radiofrecuencia
Rm	Reflectancia de vitrinita
SARA	Saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos
SBR	Bacterias sulforeductoras
S/N	Relación señal-ruido
SPE	Extracción en fase sólida
TA	Esteroides triaromáticos
TAN	Número total de ácidos
TOF	Detector de tiempo de vuelo (<i>Time of flight</i>)
TMN	Trimetilnaftaleno
TeMN	Tetrametilnaftaleno
TMN	Trimetilnaftaleno
UCM	Mezcla compleja no resuelta
UHPLC	Cromatógrafo líquido de ultra alta presión
UHPLC-OrbitrapMS	Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución con analizador de masas Orbitrap
VMM	Valle Medio del Magdalena
<i>Whole oil</i>	Análisis de crudo total

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Rangos típicos de composición elemental de un crudo.	37
Tabla 2. Grupos composicionales de diferentes tipos de crudos.	39
Tabla 3. Modos de adquisición de los analizadores de masas.	63
Tabla 4. Características de los principales detectores utilizados en HPLC.	65
Tabla 5. Material de referencia certificado de biomarcadores aromáticos y ácidos nafténicos.	78
Tabla 6. Listado de muestras de crudo provenientes de diferentes cuencas de la geografía Colombiana.	80
Tabla 7. Método cromatográfico para el análisis de biomarcadores aromáticos por GC-MS/SIM.	85
Tabla 8. Porcentajes (p/p) de maltenos y asfaltenos en muestras de crudo.	89
Tabla 9. Estudio de los porcentajes de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos del crudo proveniente de Campo C-GQ-1, obtenidos con diferentes condiciones de elución.	92
Tabla 10. Comparación de los porcentajes de saturados, aromáticos y resinas obtenidos por cromatografía en columna de elución pequeña (B) y grande (A).	93
Tabla 11. Solventes o mezclas de elución para obtención de fracciones saturadas, aromáticas y polares a partir de maltenos.	96
Tabla 12. Porcentajes (p/p) de las fracciones SARA (Saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) de muestras de crudo.	97
Tabla 13. Variables y niveles para el diseño factorial 2^4 en el tratamiento de la fracción saturada del crudo con zeolita ZSM-5.	103
Tabla 14. Matriz de experimentos para el diseño factorial 2^4 en el tratamiento de la fracción saturada del crudo con zeolita ZSM-5.	104
Tabla 15. Comparación entre los parámetros obtenidos para los biomarcadores aromáticos obtenidos mediante GC-MS/SIM.	112

Tabla 16. Momentos dipolares calculados con el método computacional DFT para esteranos mono- y triaromáticos.	116
Tabla 17. Material de referencia certificado para análisis de biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS. 124	
Tabla 18. Iones usados en el análisis de MRC de aromáticos en el modo de adquisición SIM.	127
Tabla 19. Transiciones y energía de cámara de colisiones activadas para el análisis de estándares aromáticos en el modo de adquisición MRM.	130
Tabla 20. Energía de cámara de colisiones activadas para el análisis de estándares aromáticos por GC-QqQ-MS en modo de adquisición MRM.	132
Tabla 21. Condiciones de análisis de estándares aromáticos para estudio de energía de cámara de colisiones activadas mediante GC-QqQ-MS.	134
Tabla 22. Condiciones para el análisis de esteranos mono- y triaromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM).	136
Tabla 23. Transiciones MRM para el monitoreo de biomarcadores aromáticos mediante GC-QqQ-MS.	140
Tabla 24. Relaciones moleculares de biomarcadores aromáticos determinada en la muestra C-GQ-1 con áreas y alturas de picos cromatográficos obtenidos mediante GC-QqQ-MS (modo MRM).	152
Tabla 25. Parámetros de madurez térmica determinados en muestras de crudo biodegradado.	158
Tabla 26. Identificación tentativa de los componentes presentes en el extracto polar del crudo C-MSTB analizado por GC-MS.	177
Tabla 27. Parámetro de biodegradación A/C de las muestras de crudos biodegradados fraccionados (F2), <i>clean-up</i> y analizados por UHPLC-Orbitrap-MS.	199

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Reservas probadas de crudo en Colombia.	38
Figura 2. Clasificación de crudos según la distribución parafinas, naftenos y aromáticos más compuestos NSO.	40
Figura 3. Estructura básica de los esteranos.	44
Figura 4. Estructura química de isoprenoides.	44
Figura 5. Estructura química de la serie homóloga de hidrocarburos Aromáticos.	46
Figura 6. Estructura química de fenilalcanos.	47
Figura 7. Estructura química de algunos hidrocarburos diaromáticos.	48
Figura 8. Estructura química de hidrocarburos poliaromáticos en el crudo.	49
Figura 9. Estructura general de los benzotiofenos.	50
Figura 10. Estructura general de los benzohopanos.	51
Figura 11. Estructura general de un esteroide monoaromático.	51
Figura 12. Estructuras generales de esteroides triaromáticos.	53
Figura 13. Estructuras representativas de ácidos nafténicos con $z = 0, -2, -4, \text{ y } -6$.	54
Figura 14. Fórmula de cálculo del índice de biodegradación con ácidos nafténicos.	57
Figura 15. Esquema para el fraccionamiento de crudo.	58
Figura 16. Operación del GC-QqQ en el modo MRM.	64
Figura 17. Esquema de un analizador de masas orbitrap.	66
Figura 18. Relación año-número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.	69
Figura 19. Relación entre las revistas científicas y el número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.	70
Figura 20. Relación entre países y el número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.	71

Figura 21. Relación entre año y el número de publicaciones sobre ácidos naftenicos en crudo.	72
Figura 22. Relación de países y el número de publicaciones sobre ácidos naftenicos en crudo.	73
Figura 23. Ubicación geográfica por cuencas de las muestras de crudo.	76
Figura 24. Esquema general de análisis de biomarcadores aromáticos y productos de biodegradación en el crudo.	81
Figura 25. Filtración de asfaltenos.	82
Figura 26. Obtención de maltenos y asfaltenos con <i>n</i> -pentano y diclorometano, respectivamente.	82
Figura 27. Obtención de maltenos y asfaltenos con <i>n</i> -pentano y diclorometano, respectivamente.	88
Figura 28. Fracciones eluidas en el fraccionamiento de crudo en columna.	90
Figura 29. Etapas del fraccionamiento de maltenos en columna pequeña.	93
Figura 30. Comparación de los espectros IR de la fracción saturada de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (rojo) y columna pequeña (verde).	94
Figura 31. Comparación de los espectros IR de la fracción de aromáticos de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (marrón) y columna pequeña (rosado).	95
Figura 32. Comparación de los espectros IR de la fracción de resinas de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (marrón) y columna pequeña (rosado).	95
Figura 33. Perfil cromatográfico de hidrocarburos lineales C ₈ -C ₄₀ , con pristano y fitano, obtenido por GC-FID columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).	99
Figura 34. Perfil cromatográfico <i>whole oil</i> de crudo proveniente de Campo C-GQ-1 obtenido por GC-FID, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).	100
Figura 35. Perfil cromatográfico <i>whole oil</i> de muestras de crudo, verde: C-Ch-170, rojo: C-R-444, azul: C-GTQ-22, obtenidos por GC-FID, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).	100

Figuras 36 y 37. Cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5: [5%-fenil-(metilpolisiloxano), (60 m x 0.25 mm x 0.25µm)] de la fracción saturada de crudo tratada con diferentes adsorbentes.	102
Figura 38. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25µm) para el crudo.	106
Figura 39. Cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5: [5%-fenil-(metilpolisiloxano), (60 m x 0.25 mm x 0.25µm)] de la fracción saturada de crudo.	106
Figura 40. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25µm) de la fracción saturada del crudo con tratamiento de zeolita ZSM-5. Evaluación de la repetibilidad del tratamiento con zeolita, C-GI-1.	107
Figura 41. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25µm) de la fracción aromática del crudo. Evaluación de la repetibilidad con el crudo C-GI-1.	108
Figura 42. Comportamiento del área cromatográfica de hidrocarburos lineales, según el tratamiento del crudo con diferentes cantidades de zeolita ZSM-5, y posterior fraccionamiento en columna.	109
Figura 43. Corriente iónica extraída (<i>m/z</i> 253) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60 mx0.25 mmx0.25 µm), MSD (EI, 70 eV).	111
Figura 44. Estructura química de estándares de referencia certificados de esteranos monoaromáticos y triaromáticos.	114
Figura 45. Perfil cromatográfico obtenido para la superposición de corrientes iónicas totales obtenidas por GC-QqQ-MS (modo <i>full scan</i>) de esteranos aromáticos de referencia.	115
Figura 46. Perfil cromatográfico obtenido para la superposición de corrientes iónicas totales obtenidas por GC-QqQ-MS (modo <i>full scan</i>) de esteranos aromáticos de referencia y momento dipolar calculado con el método DFT.	116
Figura 47. Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo	

- C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 500 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (100 mL). 118
- Figura 48.** Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL). 119
- Figura 49.** Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 100:5 v/v (4 mL). 120
- Figura 50.** Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 100:6 v/v (4 mL). 120
- Figura 51.** Fragmentograma de masas de esteranos monoaromáticos (*m/z* 253) de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:diclorometano 9:1 v/v (3, 4, 5 y 6 mL). 121
- Figura 52.** Fragmentograma de masas (MRM) de benzotiofenos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de ca. 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL). 122
- Figura 53.** Fragmentograma de masas (MRM) de metilfenantrenos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de ca. 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL). 123
- Figura 54.** Corriente iónica total (TIC) de estándares de aromáticos obtenida por GC-MS, modo de adquisición: *full scan*, rango de masas: 50-550. 125

Figura 55. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: <i>full scan</i> , rango de masas: 50-550, C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃)).	125
Figura 56. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: <i>full scan</i> , rango de masas: 50-550. d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático.	126
Figura 57. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: <i>full scan</i> , rango de masas: 50-550. d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H)).	126
Figura 58. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición <i>full scan</i> y SIM, para C ₂₉ esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃)).	127
Figura 59. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición <i>full scan</i> y SIM, para d ₂ C ₂₀ esterano triaromático.	127
Figura 60. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición <i>full scan</i> y SIM, para d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H)).	128
Figura 61. Corrientes iónicas extraídas con diferentes <i>m/z</i> para el compuesto de referencia C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃)) (EI, 70 eV).	128
Figura 62. Corrientes iónicas extraídas con diferentes <i>m/z</i> para el compuesto de referencia d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático (EI, 70 eV).	129
Figura 63. Corrientes iónicas extraídas con diferentes <i>m/z</i> para el compuesto de referencia d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H)) (EI, 70 eV).	129
Figura 64. Fragmentogramas de masas (MRM, 394→253) obtenidos para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia C ₂₉ esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃)) (EI, 70 eV).	130
Figura 65. Fragmentogramas de masas (MRM, 262→233) obtenidos para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia d ₂ C ₂₀ esterano triaromático (EI, 70 eV).	131

- Figura 66.** Fragmentogramas de masas (MRM, 285→256) obtenido para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia d_3C_{21} esterano monoaromático (5 α (H)/5 β (H)) (EI, 70 eV). 131
- Figura 67.** Áreas cromatográficas de esterano C_{29} monoaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre $M^+ \rightarrow F^+$ y $F^+ \rightarrow F^+$. 132
- Figura 68.** Áreas cromatográficas de d_2C_{20} esterano triaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre $M^+ \rightarrow F^+$ y $F^+ \rightarrow F^+$. 133
- Figura 69.** Áreas cromatográficas de d_3C_{21} esterano monoaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre $M^+ \rightarrow F^+$ y $F^+ \rightarrow F^+$. 133
- Figura 70.** Efecto de la energía de la cámara de colisiones activadas sobre el área cromatográfica y relación S/N por GC-QqQ en el modo de adquisición MRM. 1. Esterano C_{29} monoaromático. 2. d_2C_{20} esterano triaromático. 3. d_3C_{21} esterano monoaromático. 135
- Figura 71.** Superposición de fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis del esterano monoaromático (C_{29}) con diferentes transiciones, (EI, 70 eV). 136
- Figura 72.** Fragmentogramas de masas (MRM, 253→143) obtenida por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos monoaromáticos, (EI, 70 eV). 137
- Figura 73.** Fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos triaromáticos, (EI, 70 eV). 138
- Figura 74.** Comparación de la relación señal-ruido calculada para el análisis de esteranos triaromáticos en muestras de crudo mediante el análisis por GC-QqQ-MS, modo de adquisición MRM. 139
- Figura 75.** Fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos metiltriaromáticos, (EI, 70 eV). 139
- Figura 76.** Comparación de la relación señal-ruido calculada para el análisis de esteranos metiltriaromáticos en muestras de crudo mediante el análisis por GC-QqQ-MS, modo de adquisición MRM. 140
- Figura 77.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 142→115) de metilnaftalenos en la fracción aromática del crudo

- de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 142
- Figura 78.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 156→141) de dimetilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 142
- Figura 79.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 170→155) de trimetil- y etilmetilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 143
- Figura 80.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 184→169) de tetrametilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 144
- Figura 81.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 168→153) de metilbifenilos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 145
- Figura 82.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 178→152) de fenantreno en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 145
- Figura 83.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 192→165) de metilfenantrenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas. 146
- Figura 84.** Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 206→191) de dimetilfenantrenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes

energías de cámara de colisiones activadas.	147
Figura 85. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 184→152 y 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.	147
Figura 86. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, M^+ →191) de benzohopanos (C_{32} hasta C_{35}) en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.	148
Figura 87. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 253→143) de esteranos monoaromáticos $C_{21}, C_{22}, C_{27}-C_{29}$ en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.	149
Figura 88. Ruta de fragmentación propuesta para esteranos monoaromáticos por impacto con electrones.	149
Figura 89. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 231→203) de esteranos triaromáticos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.	150
Figura 90. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 245→230) de esteranos metiltriaromáticos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.	151
Figura 91. Ruta de fragmentación de esteranos triaromáticos para la formación de iones producto en la adquisición MRM.	151
Figura 92. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, dimetilnaftalenos.	154
Figura 93. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, trimetilnaftalenos.	155

Figura 94. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, tetrametilnaftalenos.	157
Figura 95. Madurez térmica de las muestras de crudo biodegradado con base en las relaciones $2,3,6/(2,3,6+1,2,5)$ TMN vs $1,3,6,7/(1,3,6,7+1,2,5,6)$ TeMN.	157
Figura 96. Índice de metilfenantreno (MPI-1) Vs la tasa de metilfenantreno (MPR) en muestras de crudo biodegradado.	158
Figura 97. Diagrama ternario del porcentaje de los esteroides monoaromáticos (MAS) determinado en las muestras de crudo.	159
Figura 98. Relaciones C_{27}/C_{28} 20R TAS Vs C_{26}/C_{28} 20S TAS determinadas en las muestras de crudo.	160
Figura 99. Fragmentogramas de masas (MRM, 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-Ch-170 obtenidos por GC-QqQ-MS.	161
Figura 100. Fragmentogramas de masas (MRM, 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GTQ-22 obtenidos por GC-QqQ-MS.	162
Figura 101. Diagrama ternario de metildibenzotiofenos en las muestras de crudo.	163
Figura 102. Áreas cromatográficas de 9-metilfenantreno y 1- metilfenantreno obtenidas por GC-QqQ-MS (modo MRM) en las muestras de crudo biodegradadas.	163
Figura 103. Relación DBT/PHEN Vs Pr/Ph en las muestras de crudo biodegradadas.	164
Figura 104. Esquema general de la metodología propuesta para la búsqueda de moléculas polares en muestra de crudo biodegradado.	165
Figura 105. Etapas de la extracción de compuestos polares del crudo.	166
Figura 106. Etapas de <i>clean-up</i> y concentración de extracto polar del crudo.	167
Figura 107. Fraccionamiento en columna de elución de crudo, con gel de sílice activada como sorbente.	168

Figura 108. Espectro IR, fracción polar del crudo procedente de C-MSTB obtenida por columna de elución.	169
Figura 109. Espectro IR, extracto polar (ELLB) del crudo C-MSTB.	169
Figura 110. Cromatograma obtenido por GC-FID de la fracción polar del crudo C-MSTB, obtenida por columna de elución y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	170
Figura 111. Cromatograma obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo proveniente de Cuitiva (Boyacá), obtenida por columna de elución y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	171
Figura 112. Cromatograma obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenida por ELLB y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 1. Blanco de procedimiento. 2. Extracto polar del crudo. 3. Patrón de algunos metilésteres de ácidos nafténicos (z=0).	172
Figura 113. Cromatograma obtenido por GC-FID de una mezcla de metilésteres de ácidos nafténicos (z=0), y otros ácidos grasos, en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	172
Figura 114. Cromatograma (0-30 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	173
Figura 115. Cromatograma (30-60 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	174
Figura 116. Cromatograma (60-92 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).	175
Figura 117. Perfil cromatográfico del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por GC-MS (<i>full scan</i>), columna DB-5 (30m x 0.25mm x 0.25 μ m).	176
Figura 118. Comparación de perfiles cromatográficos de compuestos polares extraídos con etanol: agua (70:30) pH 11-12 y fracción polar obtenida en columna de elución, en muestras de crudo C-MSTB.	178

- Figura 119.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos con y sin derivación (metilación), columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 180
- Figura 120.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos con y sin derivación (metilación) y blanco de procedimiento, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 181
- Figura 121.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción obtenida con metanol y etanol modificados con hidróxido de sodio 1 % p/v, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 182
- Figura 122.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador obtenida a partir del crudo C-GQ-1 enriquecido con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 183
- Figura 123.** Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador (*clean-up*) obtenida a partir del crudo C-GQ-1 enriquecido con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 184
- Figura 124.** Cambios en la coloración de la fracción F2 (A), y después (B) del procedimiento de limpieza. 185
- Figura 125.** Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GQ-1 enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2. 185
- Figura 126.** Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GL-1 enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2. 186
- Figura 127.** Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GTQ-22

enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2.	186
Figura 128. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador de crudos de diferentes gravedad API°, enriquecidos con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).	187
Figura 129. Corriente iónica total obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.	188
Figura 130. Fragmentograma de masas [M-H] ⁻ : 255.23241 (C ₁₆ , z=0) obtenido por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.	189
Figura 131. Fragmentograma de masas [M-H] ⁻ : 283.26371 (C ₁₈ , z=0) obtenido por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.	189
Figura 132. Fragmentograma de masas [M-H] ⁻ : 255.23241 (C ₁₆ , z=0) obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ con diferentes energías HCD (10, 30 y 50 eV) de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.	190
Figura 133. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ determinados en la mezcla técnica de referencia certificada.	191
Figura 134. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-GQ-1.	192
Figura 135. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-GL-1.	193
Figura 136. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI ⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-LI-107.	193

- Figura 137.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-MSTB. 194
- Figura 138.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-GTQ-22. 195
- Figura 139.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-Ch-170. 196
- Figura 140.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-R-444. 196
- Figura 141.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-R-147. 197
- Figura 142.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-R-357. 197
- Figura 143.** Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-R-807. 198
- Figura 144.** Productos de biodegradación diferentes a ácidos nafténicos determinados por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- en los crudos biodegradados procedentes de la cuenca Llanos Orientales, VMM y Central. 200
- Figura 145.** Productos de biodegradación determinados mediante UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- en las muestras crudo biodegradado.
 I. $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 223.16980. II. $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 255.06573. III. $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 211.03952. IV. $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 181.06534. 201

RESUMEN

TÍTULO: IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE BIODEGRADACIÓN EN CRUDO POR LC-ORBITRAP-MS y GC-QqQ-MS.*

AUTOR: ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ**

PALABRAS CLAVE: biomarcadores; crudos biodegradados; cromatografía de gases y líquida; analizadores de masas; triple cuadrupolo; orbitrap.

Las cuencas Llanos Orientales y Valle Medio del Magdalena, han sido objeto de diferentes estudios en geoquímica orgánica. La exploración y explotación de hidrocarburos, ha sido apoyada con el análisis de biomarcadores saturados y aromáticos, sin embargo, los procesos de biodegradación de crudo en reservorio, han disminuido sus concentraciones. El análisis de muestras de crudos biodegradados ha sido realizado con técnicas convencionales, tales como: GC-SIM/MS, GC-FID y FT-IR.

Este trabajo de investigación profundizó en la determinación de las relaciones moleculares de biomarcadores aromáticos, específicamente: naftalenos, fenantrenos, benzotiofenos, benzohopanos, bifenilos y esteranos aromáticos. El análisis de biomarcadores en la fracción aromática, fue desarrollado por cromatografía de gases acoplada a un sistema de masas tándem, GC-MS/MS, de tres cuadrupolos (QqQ). Algunos productos de biodegradación fueron determinados en una fracción polar del crudo, mediante el monitoreo por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia con analizador de masas orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS).

En las fracciones ricas en biomarcadores aromáticos, se determinaron transiciones en modo de adquisición MRM de iones precursores e iones producto para el análisis por GC-MS con triple cuadrupolo de dibenzotiofenos, naftalenos, fenantrenos, benzohopanos y bifenilos. Los esteranos monoaromáticos, triaromáticos y metiltriaromáticos, se determinaron selectivamente en mezclas complejas, usando transiciones entre iones-fragmento característicos, y una energía de colisiones activadas de 10 eV. Las relaciones de ácidos nafténicos acíclicos y cíclicos (A/C), determinadas con base en las áreas de picos cromatográficos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS, permitieron clasificar las muestras de crudo, desde las más biodegradadas con un índice A/C= 0.18 hasta las menos biodegradadas, con un índice de biodegradación 1.26.

*Trabajo de investigación

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Maestría de Investigación en Química. Directora Elena E. Stashenko, Química, Ph.D. Co-director Jairo R. Martínez Morales, Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: IDENTIFICATION OF BIODEGRADATION PRODUCTS IN CRUDE OIL BY LC-ORBITRAP-MS AND GC-QqQ-MS.*

AUTHOR: ANDRÉS FERNANDO GONZÁLEZ SUÁREZ**

KEYWORDS: biomarkers; biodegraded crudes; gas and liquid chromatography; mass analyzers; triple quadrupole; orbitrap.

The Llanos Orientales and Middle Valley Magdalena basins have been the subject of different studies in organic geochemistry. The exploration and exploitation of hydrocarbons has been supported by the analysis of saturated and aromatic biomarkers, however, the biodegradation processes of crude in reservoir, have decreased their concentrations. The analysis of biodegraded crude samples has been performed using conventional techniques, such as GC-SIM/MS, GC-FID and FT-IR.

This research work focused on the determination of the molecular relationships of aromatic biomarkers, specifically: naphthalenes, phenanthrenes, benzothiophenes, benzohopanes, biphenyls and aromatic steranes. The analysis of biomarkers in the aromatic fraction was developed by gas chromatography coupled to a tandem mass system, GC-MS / MS, of three quadrupoles (QqQ). Some biodegradation products were determined in a polar fraction of the crude, by monitoring with ultra-high performance liquid chromatography with orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS) mass analyzer.

In the fractions rich in aromatic biomarkers, transitions were determined in MRM acquisition mode of precursor ions and product ions for GC-MS analysis with triple quadrupole dibenzothiophenes, naphthalenes, phenanthrenes, benzohopanes and biphenyls. Monoaromatic, triaromatic and methyltriaromatic steranes were selectively determined in complex mixtures, using transitions between characteristic ions-fragments, and energy of activated collisions of 10 eV. The ratio of acyclic and cyclic naphthenic acids (A/C), determined based on the areas of chromatographic peaks obtained by UHPLC-Orbitrap-MS, allowed to classify crude samples from the most biodegraded with an A/C=0.18 until the least biodegradable, with a biodegradation index 1.26.

*Master's Thesis.

**Faculty of Science. School Chemical. Master of Research in Chemistry. Director Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D. Co-director Jairo R. Martínez Morales, Chemist, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El petróleo crudo es un material generado de forma natural que comprende una mezcla muy compleja de coexistencia de hidrocarburos y compuestos orgánicos polares. Una de las principales fuentes de hidrocarburos son moléculas orgánicas que en un pasado fueron sintetizadas por organismos marinos, o solamente por plantas superiores o terrestres. Estas últimas, pueden ser transportadas al océano a través de diferentes mecanismos de transporte y preservarse en los sedimentos marinos. La abundancia relativa de estos compuestos en los sedimentos marinos puede ser usada para determinar la contribución de materia orgánica, terrestre o marina, que fue depositada.

De acuerdo con las estimaciones actuales, casi el 81% de las reservas probadas de petróleo del mundo se encuentran en los países miembros de la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP), con el grueso de las reservas de petróleo de la OPEP en el Oriente Medio, que asciende a 66% del total de la OPEP. En el año 2015, las reservas probadas de petróleo de la OPEP se situaron en 887 billones de barriles, y 2731 billones de barriles en países no miembros de la OPEP, como Sudán, México, Noruega, Rusia, Kazajistán, Omán y Egipto. En países como Arabia Saudita, existe una de las reservas más grande de crudo liviano en el mundo. Sin embargo, en países como Colombia, la cantidad de crudo de menor gravedad API, está disminuyendo. Adicionalmente, se estima que alrededor del 20% de las reservas de crudo a nivel mundial están sufriendo biodegradación. El país ha pasado de tener como suministro principal de hidrocarburos, de la cuenca del Magdalena Medio a Llanos Orientales. Actualmente, está produciendo el 73% del crudo total nacional, relegando las cuencas productoras de los Valle Medio y Superior del Magdalena, y el Putumayo. Los principales campos de la cuenca de los Llanos Orientales son: Rubiales, Castilla, Quifa y Chichimene.

La biodegradación, disolución y la volatilización alteran sustancialmente la composición química y propiedades físicas de hidrocarburos líquidos del petróleo, una vez se ha liberado en el subsuelo. Se ha demostrado que la biodegradación de crudo en el reservorio genera la disminución de algunas clases de hidrocarburos en un orden específico. Desde el siglo XX se conoce que bacterias y hongos degradan hidrocarburos en condiciones aeróbicas. Sin embargo, en los años 80 se demostró que nuevos tipos de microorganismos podían degradar crudo en condiciones estrictamente anaeróbicas. Se encontró que el tolueno podía ser biodegradado, mediante una reacción de adición carbono-carbono, y posterior β -oxidación, con eliminación de dos carbonos sucesivos en forma de acetyl-CoA.

Los microorganismos tienen la capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo, algunos degradan alcanos (lineales, ramificados y parafinas cíclicas), otros solo aromáticos, y otros, parafinas y aromáticos. A menudo, los alcanos normales C₁₀ a C₂₆, son fácilmente biodegradables, pero, hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, xilenos, que hacen parte del petróleo, se degradan con alguna dificultad por muchos microorganismos marinos. Hidrocarburos aromáticos más pesados, son más difíciles de biodegradar, esto infiere que un menor número de microorganismos pueden biodegradar estas estructuras, y las velocidades de degradación son inferiores a las de los hidrocarburos saturados.

Los biomarcadores se han usado ampliamente en la exploración de petróleo en *off-shore* y *on-shore*, sin embargo, las bacterias degradan no solamente compuestos saturados y aromáticos, también moléculas más estables como biomarcadores, debido a esto, las concentraciones de biomarcadores aromáticos disminuyen. Los cálculos de relaciones moleculares por técnicas como GC-MS/SIM, no pueden realizarse, o en algunos casos pueden generar interpretaciones erróneas por la baja concentración de algunos biomarcadores (eg. aromáticos) que fueron biodegradados.

El estudio de la geoquímica del petróleo se hace difícil, cuando los crudos son alterados por la acción microbiana (biodegradación) y lavados con agua. Parámetros utilizados para comparar crudos para determinar relaciones “genéticas” (correlación crudo-crudo, crudo-roca), ambientes de depósito, ventana de generación (madurez térmica de la roca madre en la generación/expulsión de crudo), se dificultan por degradación microbiana o agua de lavado.

Los ácidos nafténicos saturados, principalmente, que se encuentran en la fracción polar del crudo, pueden estar en los crudos desde concentraciones indetectables hasta un 3 %(p/p). La principal razón de su aparición, es la insuficiente catagénesis de la materia orgánica o biodegradación por bacterias. De hecho, los ácidos nafténicos han sido encontrados en depósitos de crudo naturalmente biodegradado, uno de los casos más estudiado es el caso del crudo de Athabasca (Alberta, Canadá), en donde se encontró que los ácidos nafténicos fueron producidos por biodegradación de crudo maduro.

En Colombia, se han realizado algunos estudios sobre biomarcadores saturados y aromáticos en las Cuencas del Valle Medio del Magdalena (VMM) y Llanos Orientales. Desde el año 1999, se han estudiado biomarcadores saturados y aromáticos, y diamantoides, en diferentes muestras de crudo. El nivel de biodegradación ha sido estudiado, según el perfil cromatográfico obtenido con la técnica de *whole oil*, en donde la abundancia relativa de alcanos e isoprenoides, permitió clasificar los crudos en una escala de biodegradación de 1 a 6. Los estudios más recientes sobre la Cuenca de los Llanos Orientales, han sido desarrollados con técnicas cromatográficas; cromatografía de gases con detector selectivo de masas, adquisición en modo de ion seleccionado (GC-MS/SIM); cromatografía líquida con espectrometría de masas - resonancia de ion ciclotrón con transformada de *Fourier* (LC/FT-ICR MS).

El propósito de este trabajo, fue la implementación de una metodología analítica confiable, que permitiera determinar relaciones de biomarcadores geoquímicos en la fracción aromática por GC-QqQ (modo MRM), y productos de biodegradación (LC-Orbitrap-MS), en muestras de crudo biodegradados provenientes de las cuencas Llanos Orientales, VMM y Central.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. CRUDO

El petróleo crudo, al igual que el bitumen asociado en la roca fuente, contienen hidrocarburos (alifáticos y aromáticos), resinas y asfaltenos. Está conformado por estructuras químicas tan sencillas como el metano hasta macromoléculas más complejas, *eg.*, asfaltenos, la mezcla abarca más de 10.000 moléculas orgánicas. En la **Tabla 1**, se presentan los rangos típicos de composición elemental de los crudos. En términos de relaciones atómicas, por cada 1000 átomos de C hay alrededor de 1600-2200 átomos de H, y hasta 25, 40 y 15 átomos de S, O y N, respectivamente. Gran parte del nitrógeno, oxígeno y azufre hace parte de las resinas y asfaltenos, y, por lo tanto, a menudo se conocen como compuestos NSO. Sin embargo, una cantidad significativa de azufre puede estar presente en compuestos de mediano peso molecular, entre éstos los tiofenos. Otros elementos en el crudo incluyen varios metales, níquel y vanadio, en trazas.

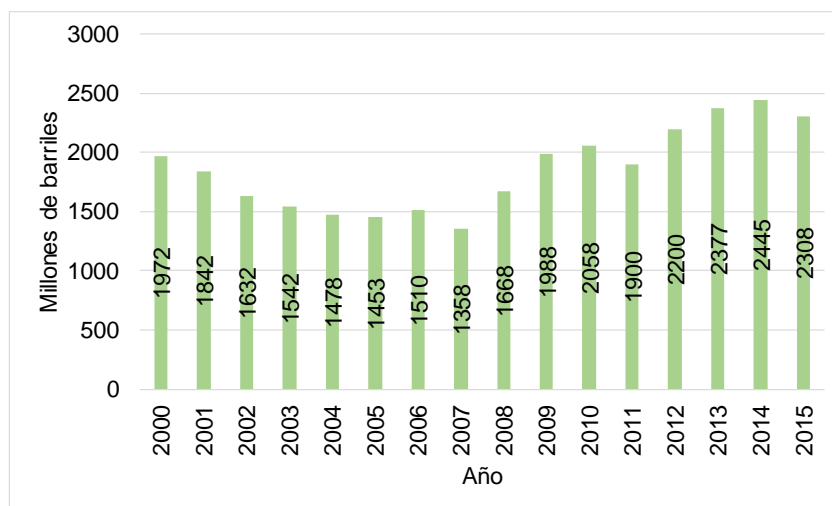
Tabla 1. Rangos típicos de composición elemental de un crudo.

Elemento	Abundancia, % p/p
C	82.2-87.1
H	11.8-14.7
S	0.1-5.5
O	0.1-4.5
N	0.1-1.5
Otros	≤ 0.1

Entre los hidrocarburos del petróleo es fácil encontrar cantidades relativamente pequeñas de biomarcadores (< 1%) de origen lipídico. Al final de la diagénesis sus precursores son transformados en hidrocarburos que, después de la catagénesis, todavía permiten relacionarlos con los precursores específicos.

1.1.1. Reservas. Son aquellas cantidades de hidrocarburos que prevén serán recuperadas comercialmente de acumulaciones conocidas a una fecha dada. Es decir, solo la parte recuperable y explotable de los recursos de hidrocarburos en un tiempo determinado. En este siglo, se han reportado 793 pozos, de los cuales solo 21 han sido exitosos, en las cuencas Llanos Orientales y VMM. La probabilidad de hallar un pozo con hidrocarburos fue en promedio de 38.5%, por encima del promedio mundial. La actividad exploratoria en el país ha permitido incorporar más de 8200 millones de barriles de crudo en reservas.

Figura 1. Reservas probadas de crudo en Colombia.



Fuente: MME y ANH

La **Figura 1**, muestra la evolución de reservas probadas de crudo en los últimos dieciséis años, que tiene una trayectoria descendente entre 2000-2007 con una tasa de crecimiento negativa de 5.1% promedio año. Sin embargo, a partir de 2007, las reservas probadas aumentaron 4.3% promedio anual, al finalizar el año 2015, las reservas ascendían a 2308 millones de barriles de petróleo, es decir, que, si no hay nuevos descubrimientos de yacimientos de crudo, las reservas alcanzarían para abastecer el país por ca. 7 años.

1.1.2. Clasificación. En general, todos los crudos pueden ser divididos dentro de dos grandes grupos: crudos A, que tienen cantidades determinadas de alcanos lineales y ramificados en sus cromatogramas, y crudos B, que no tienen picos cromatográficos de alcanos lineales, como se muestra en la **Tabla 2**. Cada categoría tiene dos subdivisiones: A1, A2 y B2, B1. En la subdivisión A1, hay distribución normal de los alcanos lineales y ramificados, los alcanos lineales predominan sobre los cíclicos. En el grupo A2, se presenta un pequeño incremento en la altura de los alcanos ramificados sobre los lineales, sobresalen los ramificados comparados con los lineales. Cuando el perfil de hidrocarburos está conformado prominentemente por picos de alcanos ramificados, el crudo corresponde a la subdivisión B2. El último grupo, B1, es cuando en el cromatograma de hidrocarburos carece de picos de alcanos lineales y ramificados.

Tabla 2. Grupos composicionales de diferentes tipos de crudos.

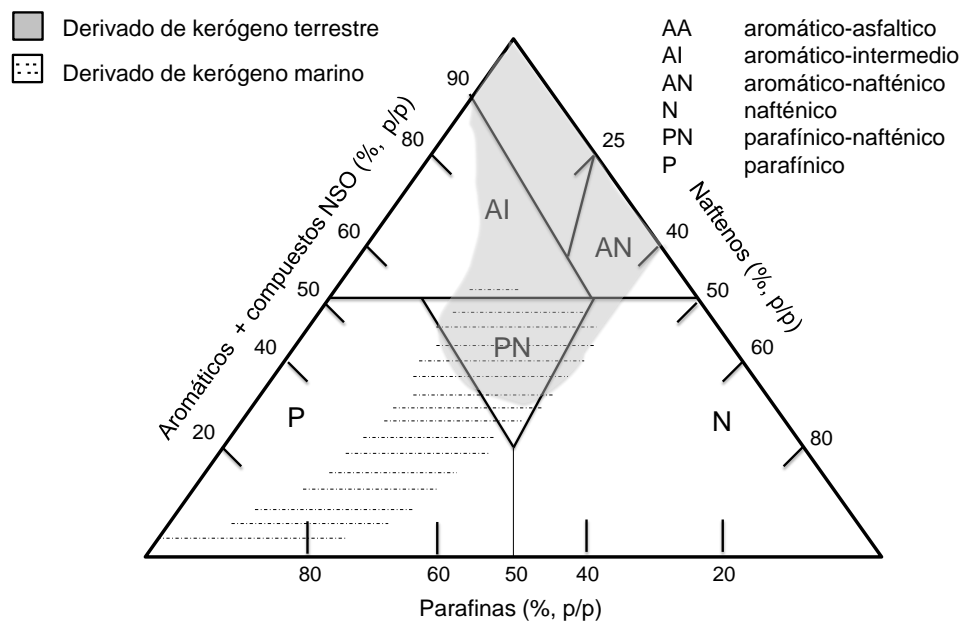
Hidrocarburos	Tipo de crudo*			
	A1	A2	B2	B1
Alcanos totales	15-60 (25-50)	10-30 (15-25)	5-30 (10-25)	4-10(6-10)
Lineales	5-25 (8-12)	0.5-5 (1-3)	0.5	-
iso-Prenoides	0.05-6.0 (0.5-3)	1-6 (1.5-3)	0.5-6 (0.2-3)	-
Cicloalcanos	15-45 (20-40)	20-60 (35-55)	20-70 (35-55)	20-70 (50-65)
Aromáticos	10-70 (20-40)	15-70 (20-40)	20-80 (20-45)	25-80 (25-50)

*En paréntesis los valores más comunes.

Los crudos también se pueden clasificar según la cantidad de alcanos acíclicos, cicloalcanos y la mezcla de hidrocarburos aromáticos más compuestos NSO presentes. La clasificación se representa por un diagrama ternario (**Figura 2**). Se puede diferenciar entre crudos provenientes de ambientes marinos o terrestres; las principales clases de crudos normales son:

- Crudos parafínicos: contienen principalmente alcanos acíclicos y con $S < 1\%$.
- Crudos parafínicos-nafténicos: contienen mayoritariamente alcanos acíclicos y cicloalcanos, y $S < 1\%$.
- Crudos aromáticos-intermedio: contienen $> 50\%$ de hidrocarburos aromáticos y usualmente $S > 1\%$.

Figura 2. Clasificación de crudos según la distribución de parafinas, naftenos, aromáticos y compuestos NSO.



1.1.3. Biodegradación. Biodegradación es un proceso mediado por microorganismos que altera un crudo. Se estima que la cantidad de crudo biodegradado supera el crudo convencional. Se ha encontrado, que reservorios profundos ($T > 60^{\circ}\text{C}$), contienen únicamente bacterias anaeróbicas y sus crudos son medianamente biodegradados. Los mecanismos de biodegradación no han sido comprendidos totalmente, sin embargo, existen unas condiciones en las que el proceso de biodegradación es altamente probable:

- a. La temperatura del reservorio varía entre 60 y 80 °C, que corresponde a profundidades de pozo inferiores a los 2000 m. La biodegradación puede ocurrir a temperaturas más altas, pero con una cinética más lenta.
- b. La presencia de nutrientes y aceptores de electrones (eg., oxígeno molecular, nitratos, sulfatos y fosfatos).
- c. El depósito debe carecer de H₂S para microorganismos aerobios, o hasta un 5% para que las bacterias reductoras de sulfato anaeróbicas sean activas.
- d. La salinidad del agua de la formación debe ser inferior a 100-150 ppm.

La desaparición de algunos grupos de hidrocarburos se puede utilizar como indicador definitivo de la biodegradación. Los indicadores de biodegradación corresponden a cambios en la composición de varias fracciones del crudo, especialmente, los hidrocarburos aromáticos.

Para determinar el grado de biodegradación existen varios parámetros. La concentración de hidrocarburos alifáticos, presenta algunas desventajas, ya que ellos constituyen la fracción más fácil de biodegradar, con respecto a los compuestos aromáticos que son más resistentes a la biodegradación.

En la fracción aromática del crudo, la secuencia de biodegradación afecta en su orden: alquilbencenos, naftalenos, benzotiofenos, fenantrenos y benzotiofenos. Los esteroides mono- y triaromáticos tienen una elevada resistencia microbiana. Adicionalmente, los esteroides triaromáticos son más resistentes a la biodegradación que los esteranos rearrreglados y terpanos tricíclicos.

1.2. BIOMARCADORES

1.2.1. Definición. Biomarcadores son aquellos compuestos orgánicos que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos y cuyo esqueleto carbonado base se presenta de tal forma que, a pesar de la diagénesis

y la mayor parte de la catagénesis, se puede relacionar con su precursor biológico. La mayoría de biomarcadores derivan de lípidos de organismos vivos, y tienen inicialmente grupos funcionales que contienen oxígeno. Los procesos de pérdida de grupos funcionales los afecta, al igual que el resto de la materia orgánica. Por lo tanto, los productos diagenéticos son generalmente hidrocarburos. Simultáneamente, los compuestos no saturados (tipo alqueno) tienden a reducirse mediante hidrogenación, que genera hidrocarburos alifáticos (esteranos, hopanos, entre otros) o se aromatizan.

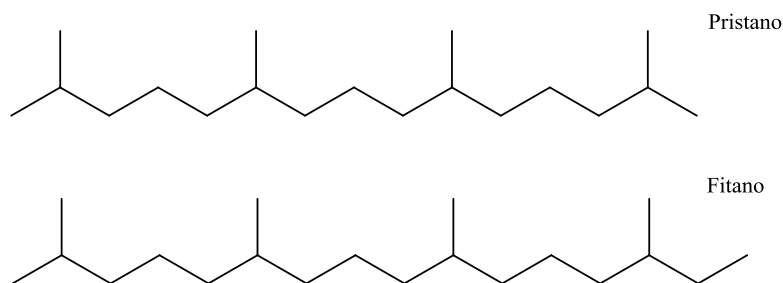
Las estructuras de los biomarcadores son mayoritariamente cíclicas, que han sufrido pocas modificaciones estructurales en el tiempo. La mayoría provienen de precursores moleculares que hacían parte de diferentes organismos vivos que habitaron la tierra hace 300-400 millones de años, entre plancton, helechos, plantas superiores, bacterias, musgos, hongos, algas, líquenes, etc.

1.2.2. Aplicaciones. Los biomarcadores son muy importantes, ya que proporcionan información acerca de: fuentes biológicas de materia orgánica sedimentaria en roca fuente, condiciones ambientales durante la depositación (diagénesis), la madurez térmica experimentada por la roca o crudo (catagénesis), edad geológica, el grado de biodegradación, y algunos aspectos de mineralogía de la roca fuente (litología). En el crudo o materia orgánica de las rocas, son constituyentes traza, pero son de gran utilidad, especialmente, en el caso de los crudos.

El estudio de los biomarcadores permite hacer correlaciones entre diferentes crudos, entender procesos de migración y establecer su relación con la roca que los generó. Asimismo, es posible obtener el conocimiento sobre la posible biodegradación del crudo, la cinética de su generación y la bioprospección.

isoprenoides (**Figura 4**), derivados de la cadena fitol de la clorofila, pueden sufrir procesos de oxidación o reducción, esto depende del potencial redox en el ambiente de sedimentación, en condiciones muy reductoras, predomina el isoprenoide fitano (C₁₈), en condiciones menos reductoras, puede ocurrir la oxidación a ácido fitánico y posterior descarboxilación y formación de pristano (C₁₇). Consecuentemente, la relación pristano/fitano puede ser utilizada como indicadora de condiciones óxido-reductoras del ambiente de sedimentación.

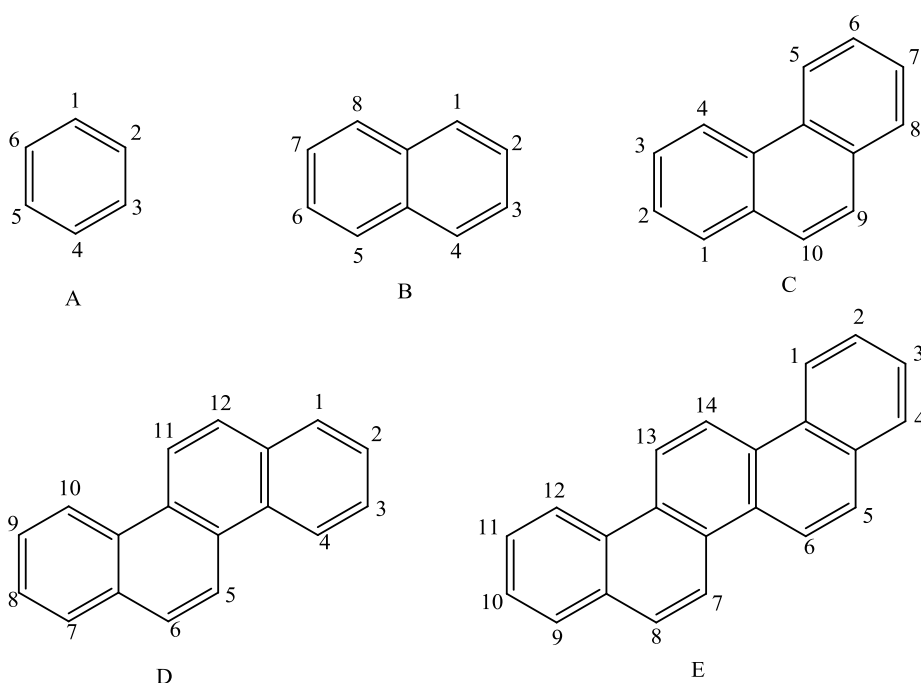
Figura 4. Estructura química de isoprenoides



Los hidrocarburos aromáticos tienen uno o más anillos con enlaces π deslocalizados y fórmula general C_nH_{2n-6y}, donde y es el número de anillos aromáticos. Benceno, un anillo aromático de seis carbonos, es el hidrocarburo aromático más simple. Los biomarcadores aromáticos pueden proveer información valiosa sobre la entrada de materia orgánica. Los organismos vivos sintetizan cantidades despreciables de hidrocarburos aromáticos, su aparición en el crudo se debe a la compleja transformación de precursores naturales de olefinas y nafténicos. Las transformaciones ocurren durante la diagénesis y catagénesis. Esto genera dificultades para hacer relaciones genéticas entre componentes aromáticos y los productos naturales precursores en el crudo. La aromatización puede darse principalmente por alteración significativa de precursores con reacciones de alquilación, dealquilación, isomerización y apertura de anillos. Las reacciones de rearrreglo de todos los terpenoides aparentemente ocurren vía intermediarios carbocatión.

Los hidrocarburos aromáticos se pueden dividir en dos grupos. El primero, incluye hidrocarburos alquilaromáticos con un solo anillo y sustituyentes alifáticos. La serie homóloga más conocida conforman alquibencenos, alquilnaftalenos, alquilfenantrenos, alquilcrisenos y alquilpicenos (veáse **Figura 5**).

Figura 5. Estructura química de la serie homóloga de hidrocarburos aromáticos: A. Alquibencenos; B. Alquilnaftalenos; C. Alquilfenantrenos; D. Alquilcrisenos; E. Alquilpicenos.

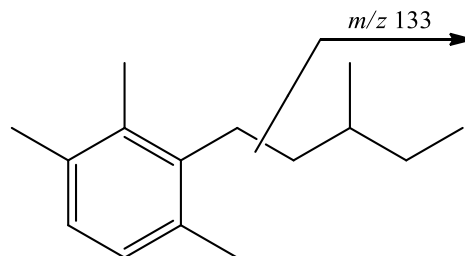


1.2.4. Hidrocarburos monoaromáticos. Los hidrocarburos monocíclicos (homólogos de benceno), han sido estudiados en algunos crudos. Las concentraciones de hidrocarburos sustituidos exceden considerablemente a aquellos no sustituidos. En efecto, estructuras di- y trisustituidos se encuentran en altas concentraciones en los crudos.

En la **Figura 6**, se muestra la estructura química de los fenilalcanos; biomarcadores más representativos de este grupo. Están “genéticamente”

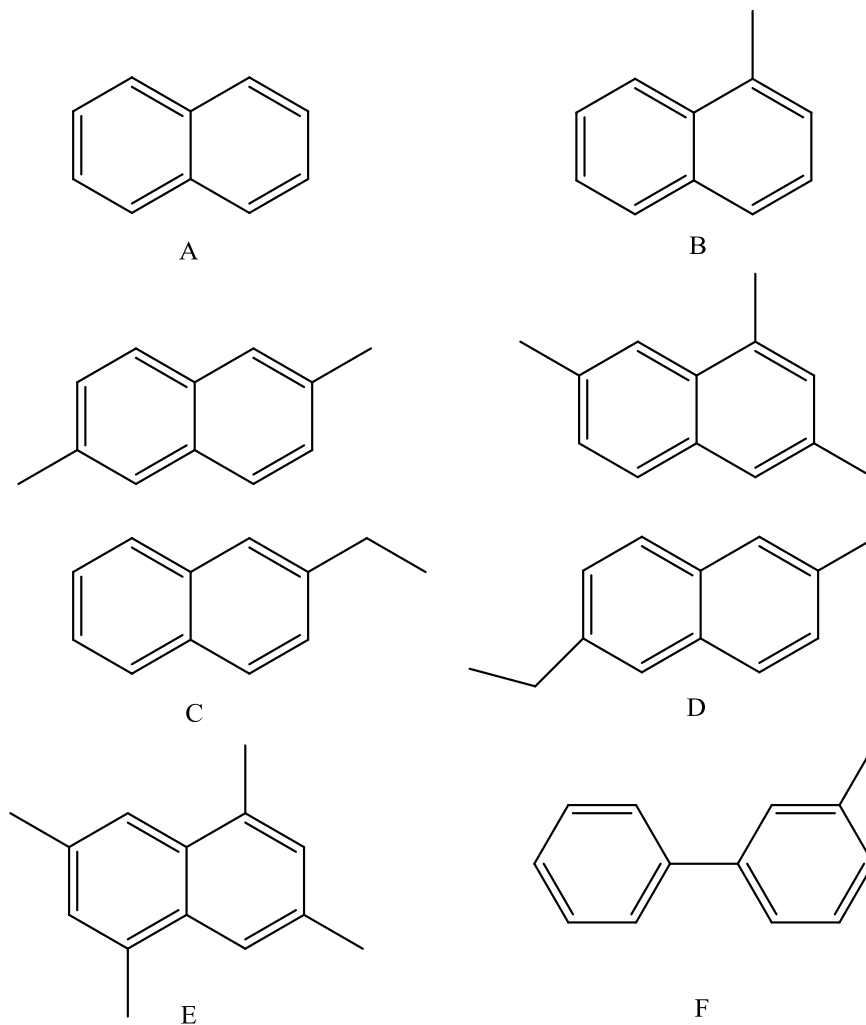
relacionados con carotenoides como posibles precursores, entre éstos, el 1,1,3-trimetil-2-alkilciclohexano; la única diferencia es la migración de un grupo metilo geminal que resulta en la formación de fenilalcanos. La ruptura de la cadena alifática en la posición β , genera el fragmento en m/z 133.

Figura 6. Estructura química de fenilalcanos (m/z 133).



1.2.5. Hidrocarburos diaromáticos. Son moléculas diaromáticas o hidrocarburos bicíclicos. El contenido de naftaleno en el crudo es insignificante, mientras que mono-, di-, y tri- metilnaftalenos están presentes en concentraciones más altas. Los isómeros 1,6 y 1,7 de los dimetilnaftalenos usualmente se encuentran en las concentraciones más altas, por el contrario, los etilnaftalenos están en el crudo en cantidades inferiores. En la **Figura 7**, se muestran las principales estructuras de naftaleno (m/z 128), metilnaftalenos (m/z 142), dimetilnaftalenos (m/z 156), trimetilnaftalenos (m/z 170), y tetrametilnaftalenos (m/z 184). Entre paréntesis aparecen las masas de sus iones moleculares. En los hidrocarburos aromáticos bicíclicos, el bifenilo monosustituido (m/z 168) es el más representativo, sin embargo, las concentraciones en el crudo son inferiores comparadas con los hidrocarburos diaromáticos tipo naftaleno.

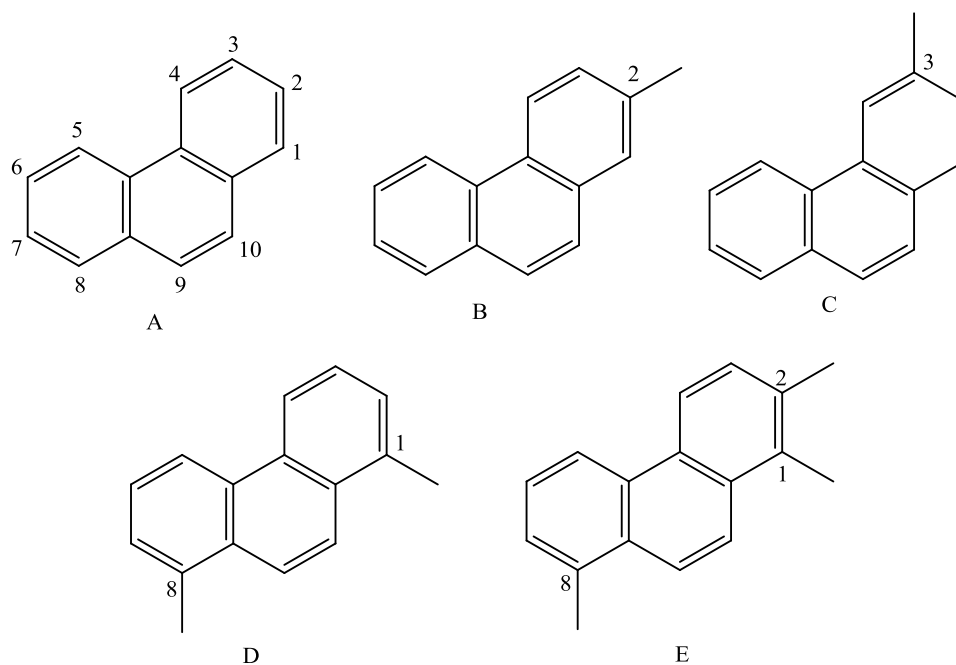
Figura 7. Estructura química de algunos hidrocarburos diaromáticos: A. Naftaleno; B. Metilnaftalenos; C. Dimetilnaftalenos; D. Trimetilnaftalenos; E. Tetrametilnaftalenos; F. Metilbifenilo.



Algunos biomarcadores aromáticos en crudo y bitumen, tales como 1,2,5-trimetilnaftaleno (TMN), 1,2,5,6-tetrametilnaftaleno (TeMN), 9-metilfenantreno (MP), 1,7-dimetilfenantreno (DMP), y reteno se originaron a partir de terpenoides. El reordenamiento y apertura del anillo del esqueleto carbonado en terpenoides es parte del proceso de aromatización.

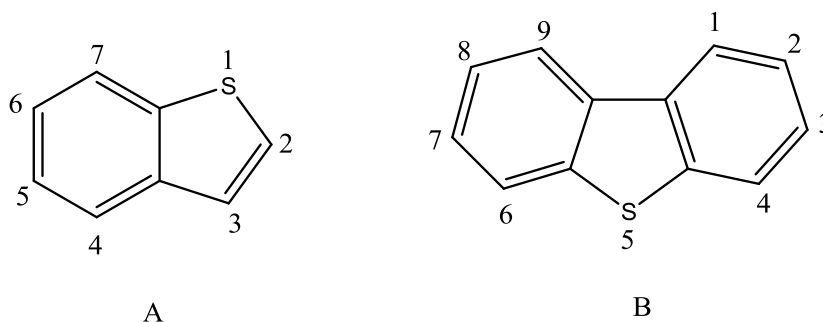
1.2.6. Hidrocarburos poliaromáticos. Los hidrocarburos del crudo tricíclico aromáticos, son representados principalmente por numerosos metil (alquil) derivados de fenantreno, como se muestra en la **Figura 8**. Los metilfenantrenos con metilo en las posiciones 2 y 5, no han sido reportados o se encuentran a nivel de trazas en el crudo. Los metilfenantrenos probablemente se originaron a partir de esteroides, debido a que moléculas 2 y 5 metilsustituidas en esteroides no se han determinado. Evidentemente, los 4-metilesteroles son precursores de 1,8-dimetil y 1,2,8-trimetilfenantrenos. Las moléculas naftenofenantreno ($C_{19}H_{18}$) y dinaftenofenantreno ($C_{24}H_{26}$), están relacionados estructuralmente con esteroides tri-aromáticos y hidrocarburos hopanoides. En la materia orgánica inicial la concentración de 1 y 9-metilnaftaleno es elevada, luego la determinación de la relación de los 2 y 3-metil con respecto a los 1 y 9-metilfenantrenos es comúnmente usada para la determinación de la madurez de la materia orgánica.

Figura 8. Estructura química de hidrocarburos poliaromáticos en el crudo. A. 1-Metilfenantreno; B. 2-Metilfenantreno; C. 3-Metilfenantreno; D. 1,8-Dimetilfenantreno; E. 1,2,8-Trimetilfenantreno.



1.2.7. Benzotiofenos. Los compuestos azufrados son conocidos en el crudo y el contenido de azufre para muchas muestras varia, entre 0.5 y 3 %. El azufre aparece en el crudo en amplias variedades moleculares, incluyendo alifáticos, tioles, mono- y disulfuros y estructuras aromáticas alquiladas tales como tiofenos y benzotiofenos. El dibenzotiofeno es un compuesto organosulfurado formado por anillos de benceno fusionados a un anillo de tiofeno central, típicamente, hace parte de la fracción pesada del crudo, y se muestra en la **Figura 9**, junto con el benzotiofeno.

Figura 9. Estructura general de los benzotiofenos. A. Benzotiofeno; B. Dibenzotiofeno.

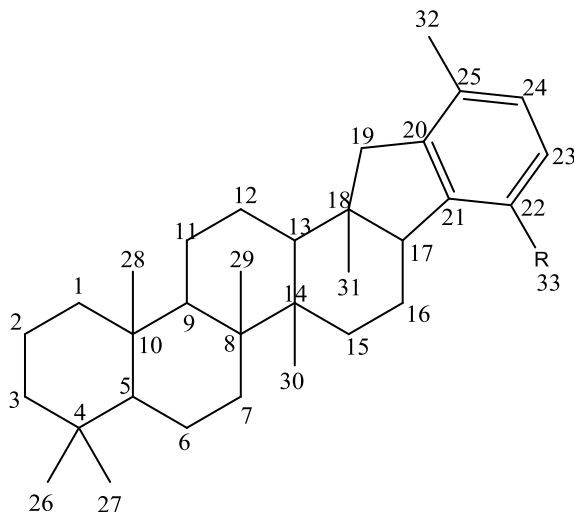


Los benzotiofenos han sido propuestos como indicadores moleculares mediante la relación con el fenantreno. Son moléculas que pueden inferir sobre el ambiente de depositación de la roca fuente del crudo, la litología y determinar el ambiente paleodeposicional de la roca fuente en términos de sus procesos microbiológicos y químicos más importantes.

1.2.8. Benzohopanos. La estructura básica de los benzohopanos se muestra en la **Figura 10**. Los benzohopanos pueden contener desde C_{32} a C_{35} , consistente con el origen propuesto mediante un proceso de ciclación de hopanoides de cadena lateral en la diagénesis temprana; seguido de un proceso de aromatización. Los crudos y butúmenes con altas concentraciones de

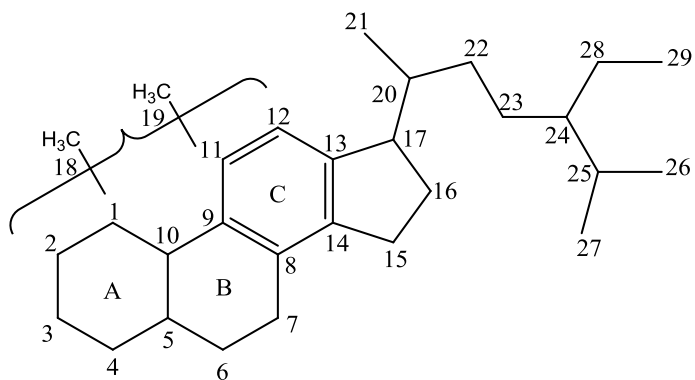
benzohopanos, se encuentran en rocas fuente evaporíticas y carbonáticas, sin embargo, en otras rocas fuente o crudos pueden estar a nivel de trazas.

Figura 10. Estructura general de los benzohopanos.



1.2.9. Esteroides monoaromáticos

Figura 11. Estructura general de un esteroide monoaromático.



En la **Figura 11**, se muestra la estructura general de los esteroides monoaromáticos, que pueden derivar exclusivamente de esteroides con una cadena lateral enlazada durante la diagénesis temprana. Los diagramas ternarios C_{27} , C_{28} , C_{29} , de esteroides monoaromáticos están relacionados con varios tipos

de fuentes. El diagrama ternario de estas moléculas aromáticas (m/z 253), es una herramienta de correlación de alta especificidad que indica la entrada de especies eucariotas en la diagénesis; que pueden ser de origen marino, terrestre o lacustre. Los crudos de origen marino, generalmente, contienen menos esteroides monoaromáticos C_{29} , en otra perspectiva, en las algas no marinas se encuentran mayores cantidades del C_{29} . Los fragmentogramas de masas (m/z 253) se usaron para correlaciones geoquímicas, particularmente, en la evaluación de la madurez del crudo.

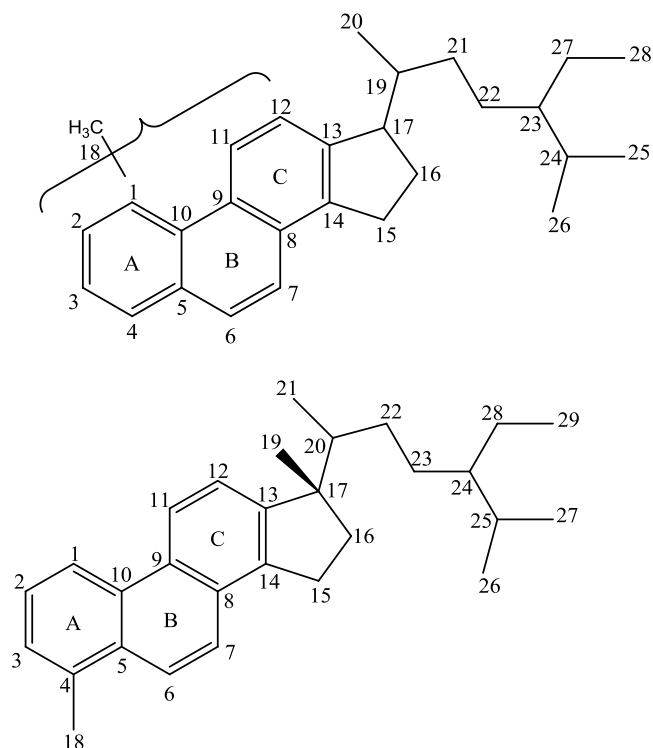
El fragmentograma basado en el monitoreo del ion en m/z 239, de la fracción de hidrocarburos monoaromáticos se ha usado como *fingerprint* para correlaciones crudo-roca y crudo-crudo. Probablemente, las estructuras son esteroides monoaromáticos que tienen una pérdida de un grupo metileno del núcleo, y algunos pueden tener reordenamientos a antrasteroides aromáticos.

1.2.10. Esteroides triaromáticos. Los esteroides triaromáticos se originan por aromatización y pérdida de un grupo metilo de los esteroides monoaromáticos. Por ejemplo, el esteroide C_{29} (monoaromático) puede ser convertido al C_{28} (triaromático). Las relaciones de esteroides triaromáticos podrían ser más sensibles a la maduración térmica que aquellos esteroides monoaromáticos o esteranos, porque los esteroides triaromáticos parecen ser productos de maduración de esteroides monoaromáticos.

Estas moléculas permiten establecer el grado de maduración de los crudos y la materia orgánica. En los procesos de catagénesis, los esteroides monoaromáticos experimentan degradación de las cadenas laterales alifáticas y se transforman en hidrocarburos aromáticos. La aromatización del anillo B es un proceso lento en los esteroides monoaromáticos (anillo C aromático), una vez se ha completado, la aromatización del anillo A procede a velocidades de reacción más altas. El resultado es la baja concentración de los esteroides diaromáticos (anillos B y C).

En la **Figura 12**, se muestran las estructuras de esteroides triaromáticos, que pueden ser detectados por GC-MS/SIM, monitoreando los iones m/z 231 y 245.

Figura 12. Estructuras generales de esteroides triaromáticos.



En el crudo, los dinosteranos triaromáticos se generan a partir de rocas fuente marina, que indican una roca fuente pre-Jurásica. Los dinosteranos triaromáticos provienen, posiblemente, del dinosterol y 4,23,24-trimetilcolesteroles relacionados estructuralmente, compuestos que caracterizan dinoflagelados marinos modernos. Los dinosteranos triaromáticos son abundantes en muestras del Mesozoico.

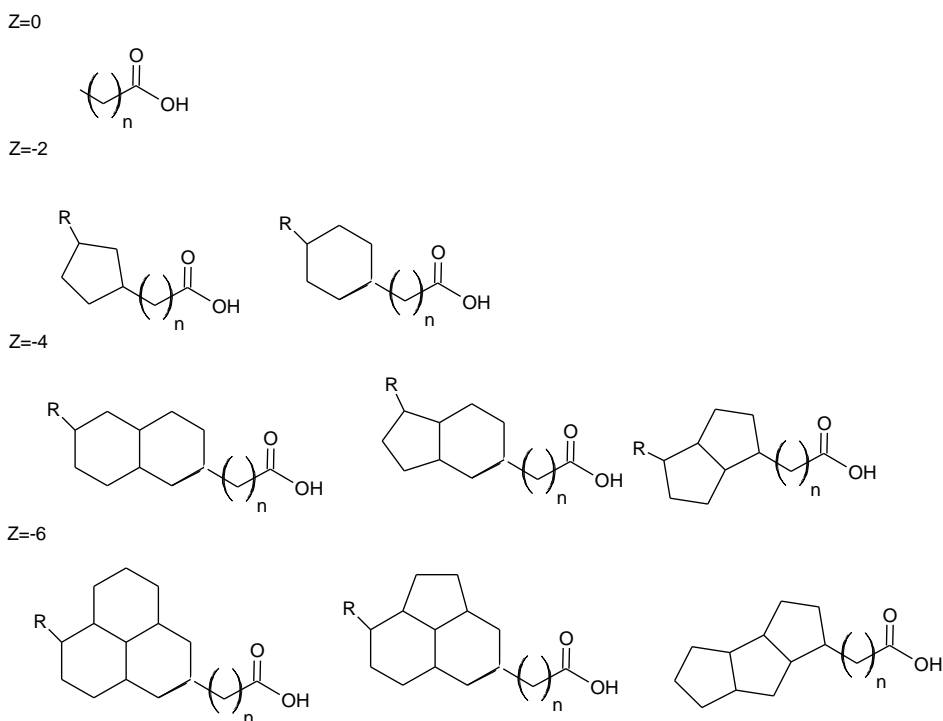
1.3. ÁCIDOS NAFTÉNICOS

1.3.1. Definición. Los ácidos nafténicos (NA) son componentes naturales del petróleo; su contenido en aceites crudos puede variar entre 0 y 4%, dependiendo de la fuente del aceite. Los NA comprenden una mezcla compleja de ácidos

carboxílicos acíclicos, alquil-sustituidos y cíclicos, con fórmula química general $C_nH_{2n+z}O_2$, en que “n” indica el número de carbonos y “Z”, el cual toma valores de cero o negativos de números enteros pares, específica la deficiencia de hidrógeno resultante de la formación de anillos. Por otra parte, el valor absoluto de Z dividido en dos, expresa el número de anillos en la estructura.

1.3.2. Estructura

Figura 13. Estructuras representativas de ácidos nafténicos con $z = 0, -2, -4, \text{ y } -6$.



En la **Figura 13**, se muestran las estructuras más conocidas de los NA. Los NA son compuestos no volátiles, químicamente estables y actúan como tensoactivos. Poseen constantes de acidez (K_a) que varían de 10^{-5} a 10^{-6} . La polaridad y no-volatibilidad de los NA aumenta con el peso molecular. Estos compuestos poseen un rango de punto de ebullición entre 250 y 350 °C, y son solubles en solventes orgánicos, aceites y en agua (50 mg.L^{-1}), a pH neutros o alcalinos.

Los NA son componentes naturales de depósitos de hidrocarburos (crudo, arenas, bitumen, entre otros). La producción de los NA es resultado de una biodegradación microbiana incompleta de hidrocarburos del crudo, o, probablemente, originados a partir de un proceso de catagénesis en curso.

1.3.3. Importancia. Los NA y naftenatos metálicos poseen una amplia gama de usos comerciales, como secadores de pintura, inhibidores de corrosión, emulsionantes, agentes tensoactivos, lubricantes, fluidos hidráulicos, en textiles y conservantes de la madera; también mejoran la adherencia de los neumáticos y las pinturas, evitan la formación de espuma en combustible para aviones y catalizan la producción de resinas de alquilo y de poliéster, entre otros. En consecuencia, hay una gran posibilidad de que los NA se transmitan al medio ambiente, como resultado de derrames accidentales y fugas naturales debido a su solubilidad en agua. Estos NA han mostrado ser tóxicos para una gran variedad de organismos, especialmente, en ambientes acuáticos.

Diversos factores bióticos y abióticos han demostrado afectar la biodegradación de los NA. La velocidad de biodegradación es afectada por la estructura química de los NA. Por ejemplo, los NA alquil-sustituidos de cadenas alifáticas, sustituciones terciarias, y metil sustituidos en anillos cicloalcanos son persistentes. También la isomería del compuesto en ácidos alicíclicos, influye en la rapidez de biodegradación. Generalmente, los NA con pesos moleculares bajos son fácilmente degradados en comparación con los compuestos de alto peso molecular. En consecuencia, compuestos con un alto peso molecular tienden a persistir en el medio ambiente y se han utilizado como marcadores biológicos para determinar el origen y la maduración de las fuentes del petróleo durante su exploración. Los factores abióticos, tales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, concentración de oxígeno, pH, salinidad, potencial *redox* y la luz solar también pueden influir en la degradación de NA.

1.3.4. Biodegradación. Durante la maduración del crudo, los microorganismos suelen degradar compuestos lineales de bajo peso molecular (< 22 carbonos), lo que incrementa la concentración de ácidos carboxílicos ramificados y cíclicos, los cuales resisten la degradación y, en consecuencia, aparecen mezclas complejas, difícilmente identificadas por cromatografía de gases. Partiendo del concepto de degradación bacteriana o microbiana, se conocen dos tipos de degradación, aeróbica y anaeróbica.

Biodegradación aeróbica: Modelos de degradación aeróbica para los NA han mostrado que, bajo cultivos enriquecidos con *rhizospheres* provenientes de especies de plantas nativas de Alberta, el proceso de biodegradación ocurre en 10 días de incubación. Se observa, a su vez, un alto índice de degradación de los NA de bajo peso molecular en comparación con los de alto peso molecular.

Biodegradación anaeróbica: La degradación anaeróbica de hidrocarburos puede ocurrir en depósitos subterráneos profundos. Las rutas metabólicas para la biodegradación del crudo se llevan a cabo mediante la metanogénesis; diversos organismos anaerobios han sido reportados en los yacimientos de petróleo. Hay pocos estudios relacionados con la biodegradación anaeróbica de NA, a pesar de que la mayoría de los estanques de arenas petrolíferas de relaves maduran, se vuelven anaeróbicos. En algunos estanques, el decrecimiento de la concentración de sulfato se asocia a la producción de metano, resultante de las actividades microbianas. Por lo tanto, si las cadenas laterales carboxiladas de NA son lo suficientemente largas, pueden ser susceptibles a metabolismos microbianos anaeróbicos. Aunque la degradación anaeróbica de NA no contribuya significativamente en la producción de metano en crudos y arenas petrolíferas, comunidades metanogénicas se encuentran activas a altas concentraciones de NA.

1.3.5. Índice de biodegradación. El decrecimiento consecuente en ácidos nafténicos acíclicos y la persistencia de ácidos carboxílicos cíclicos, está relacionado con el grado de biodegradación de los crudos. La relación A/C (ácidos nafténicos acíclicos y cíclicos) se calcula a partir de la suma de la abundancia de los ácidos acíclicos ($z = 0$) dividida por la suma de la abundancia de los ácidos nafténicos mono, di- y tricíclicos ($z = -4, -6$ y -8 , respectivamente), según la fórmula que aparece en la **Figura 14**. La relación A/C parece correlacionarse bien con el grado de biodegradación del petróleo crudo, el cual es una descripción cualitativa, a pesar de su etiqueta numérica. Por ende, la relación A/C es una medida fiable y cuantitativa del grado de biodegradación, que permite complementar la información geoquímica de los depósitos de crudo en donde se presentan procesos de mezclado.

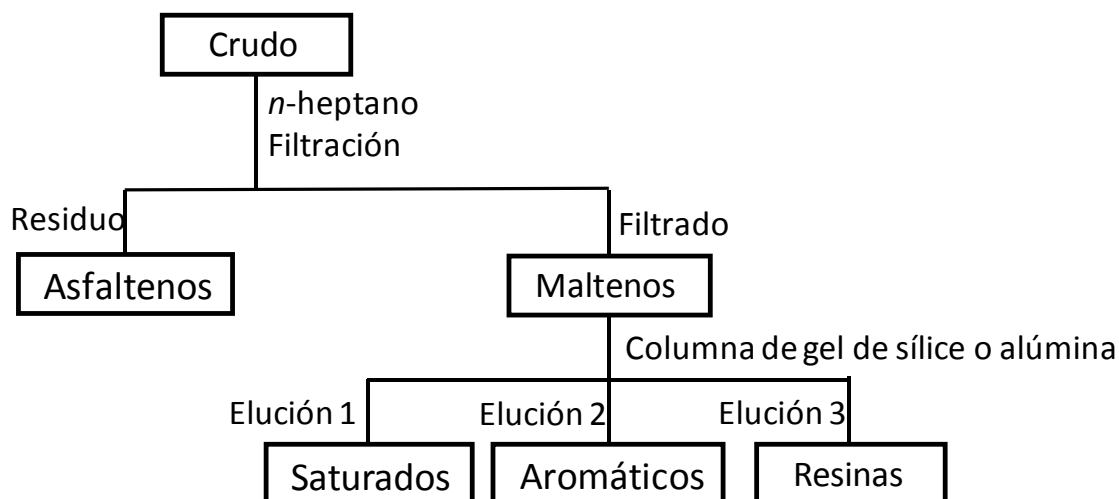
Figura 14. Fórmula de cálculo del índice de biodegradación con ácidos nafténicos.

$$A/C = \sum NAs, z=0 / (\sum NAs, z= -4,-6,-8)$$

1.4. FRACCIONAMIENTO DE CRUDO EN COLUMNA

Aunque es prácticamente imposible la identificación de cada componente individual en el crudo, el análisis por grupos de compuestos es de gran ayuda para definir la relación entre sus estructuras y las propiedades de un crudo. La separación de los componentes del crudo, para su posterior análisis, se conoce como fraccionamiento SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), la obtención de las cuatro fracciones con este procedimiento se basa en la solubilidad en solventes orgánicos; en la **Figura 15**, se muestra la ruta analítica.

Figura 15. Esquema general para el fraccionamiento de crudo.



1.4.1. Precipitación de asfaltenos. Una de las primeras etapas para el análisis de biomarcadores en crudo, consiste en la precipitación de asfaltenos, aprovechando su baja solubilidad en hidrocarburos livianos (*n*-pentano, *n*-hexano o *n*-heptano). Los maltenos, posteriormente, se fraccionan, en saturados, aromáticos y la fracción N,S,O (polar).

1.4.2. Fracción saturada. Los biomarcadores saturados más conocidos son pristano, fitano, isoprenoides, terpanos, esteranos, hopanos, diasteranos, etc., que pertenecen a la fracción saturada separada de los maltenos y han sido los más estudiados. La fracción saturada es eluida con disolventes no polares como *n*-pentano y *n*-heptano.

1.4.3. Fracción aromática. Compuestos orgánicos no polares, en la que existen sistemas de anillos polielectrónicos insaturados. Los compuestos aromáticos pueden estar conformados por uno o más anillos de seis átomos de carbono. Los compuestos de menor peso molecular nafteno-aromáticos comprenden esta fracción, generalmente son líquidos viscosos de color marrón anaranjado. Las masas moleculares promedio de esta fracción son semejantes a las de los

compuestos saturados. Tienen una alta capacidad de disolver otros hidrocarburos de alto peso molecular.

1.4.4. Fracción resinas. Compuesta por moléculas de baja volatilidad y tendencia a formar agregados, se caracteriza por la presencia de moléculas con fuerte carácter aromático y de heteroátomos como N, S y O. La mayoría de la información estructural ha sido obtenida mediante las propiedades en masa, tales como: composición elemental y la reactividad ácido y base. La abundancia de las especies nitrogenadas y oxigenadas, confiere un carácter polar y no volátil.

1.5. PARÁMETROS MOLECULARES

La estimación de las abundancias relativas y absoluta de los biomarcadores, puede llevarse a cabo mediante el monitoreo de los iones fragmento característicos en espectros de masas. Dicha información, se usa para el cálculo de los parámetros moleculares, también conocidos como relaciones diagnóstico de biomarcadores. La relación entre la concentración, altura o área de un pico cromatográfico de uno o varios biomarcadores, se denomina parámetro molecular. Los cocientes permiten la disminución de errores de tipo sistemático en la ruta analítica de obtención de los observables mencionados.

Por ejemplo, los crudos provenientes de ambientes marinos carbonatados contienen mayor cantidad de esteroides monoaromáticos que los *shale* derivados de crudos marinos. La entrada de materia orgánica terrestre es pobre en esteroides C₂₇ y C₂₈. De este modo, para un *shale* no-marino tiene una relación de esteroides mono-aromáticos $C_{29}/(C_{28}+C_{29})$ mayor que 0.5. Los crudos no-marinos tienen una alta cantidad de esteroides monoaromáticos C₂₇ y sus homólogos. Estos crudos se asocian a rocas fuente depositadas en ambientes lacustres, con un pequeño aporte de plantas terrígenas.

La aromatización del anillo C de los esteroides mono-aromática (MA) a un anillo ABC triaromático (TA) involucra la pérdida de un grupo metilo para la unión del anillo A-B. La maduración de monoaromáticos a triaromáticos da esteroides triaromáticos con un carbono menos. La relación $TA/(TA+MA)$, es aplicada para el cálculo de la madurez térmica, esta incrementa de 0 a 100 % durante el proceso. La relación también puede ser aplicada para calibración de modelos de cuencas.

El 1,2,7 trimetilnaftaleno (TMN) indica la entrada de angiospermas. Típicamente los trimetilnaftalenos (TMN) se usan en las relaciones, TDE-1 y TDE-2, que permiten diferenciar: carbono de pantano del marino, lacustre y ambientes deltaicos. $TDE-1 = 1,2,5-TMN/1,2,4-TMN$, y, $TDE-2 = 1,2,7-TMN/1,2,6-TMN$.

Los benzotiofenos pueden inferir ambiente de depositación y litología de la roca fuente del crudo. Junto con pristano y fitano, permiten la clasificación de ambientes de depósito. Estas relaciones reflejan los diferentes regímenes resultantes de los procesos microbiológicos y químicos significativos, durante la deposición y diagénesis temprana de sedimentos.

1.6. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

El análisis cromatográfico de las fracciones saturadas o aromáticas aisladas del petróleo o de roca, sedimento o esquisto, es posible mediante diversas técnicas, como, por ejemplo, cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) o con detector de masas (GC-MS). Mediante el uso de GC-FID se logra comparar de forma rápida los perfiles cromatográficos, tanto cualitativamente como cuantitativamente, aunque para este último se debe disponer de sustancias patrón de los analitos de interés. Pero, para el análisis de las fracciones saturadas o aromáticas del petróleo o de los extractos de rocas es más frecuente el uso de GC-MS, con ionización electrónica, EI (electrones de 70 eV) y un analizador cuadrupolar, en modo *full scan* (barrido completo de radiofrecuencia para el rango

de masas de m/z 50-600) o realizando la detección selectiva con el monitoreo de iones seleccionados (SIM).

1.6.1. Masas nominales y exactas. Masa nominal: Es la masa entera de la especie con el isótopo más abundante de cada uno de sus átomos constituyentes. En el caso del carbono, hidrógeno y bromo, los isótopos más abundantes son ^{12}C , ^1H y ^{16}O .

Masa exacta: A diferencia de la masa nominal, la masa exacta de una molécula o ion es la masa de todas las especies isotópicas existentes de cada uno de sus átomos constituyentes.

1.7. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Es una técnica de análisis instrumental que permite la separación de una mezcla en sus componentes individuales. Las moléculas se volatilizan y son llevados a la cabeza de la columna cromatográfica. La separación cromatográfica dependerá principalmente, de temperaturas de ebullición de cada componente o momentos dipolares, para columnas apolares o polares, respectivamente. La elución se produce por el flujo de gas de arrastre (eg. helio, hidrógeno, argón) y efecto de la temperatura, durante el recorrido por la columna cromatográfica cada analito se reparte entre la fase móvil y estacionaria. En general, los compuestos con masas moleculares inferiores a 400 Da, termoestables, volátiles y sin grupos funcionales activos (ácidos o bases), pueden ser analizados por cromatografía en fase gaseosa [54, 55]. Para columnas capilares, existen cuatro tipos de inyectores en función de la vaporización de la muestra y su transferencia hacia la columna cromatográfica: con división de flujo (*split*), sin división de flujo (*splitless*), en columna (*on-column*) y con vaporización programada por temperatura (PVT).

1.7.1. Detectores. El propósito del detector es monitorear el gas portador a medida que este emerge de la columna y generar una señal en respuesta a la masa o concentración de la sustancia analizada. En el análisis de biomarcadores

en crudo, los analizadores comúnmente usados son detector de ionización en llama (FID) y detector selectivo de masas (MSD).

Detector FID: Este detector se basa en la ionización de las moléculas arrastradas por el gas portador que salen de la columna y se oxidan en una llama hidrógeno/aire. Es un detector universal, ya que responde a la gran mayoría de compuestos orgánicos, es económico y presenta una elevada sensibilidad, además no responde a impurezas comunes del gas portador como CO₂ y H₂O.

Detector selectivo de masas: Es un detector que permite la identificación tentativa de compuestos desconocidos mediante el estudio fragmentaciones características de grupos funcionales de una molécula problema. Cuando el cromatógrafo de gases (GC) se acopla al espectrómetro de masas, los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica se ionizan mediante el uso de electrones (EI, ionización electrónica) o con un reactivo químico (CI, ionización química). Los fragmentos con relación m/z generados son enfocados y acelerados en un analizador de masas, *eg.*, cuadrupolo. Los fragmentos con diferente relación m/z generan diferente señal y se detectan dentro de un rango de masa. Los límites de detección se encuentran alrededor de 1 a 10 ng o incluso a valores más bajos, *eg.*, 10 pg.

El acoplamiento de un espectrómetro de masas a un cromatógrafo de gases, permite obtener información acerca de la estructura de un compuesto que eluye de la columna en un tiempo determinado. Los analizadores de masas que se muestran en la **Tabla 3**, pueden operar en tres modos de adquisición: universal, específico y selectivo. Con una configuración de un solo cuadrupolo, el analizador puede operar en modo universal y selectivo, y el modo específico para los sistemas *tándem*.

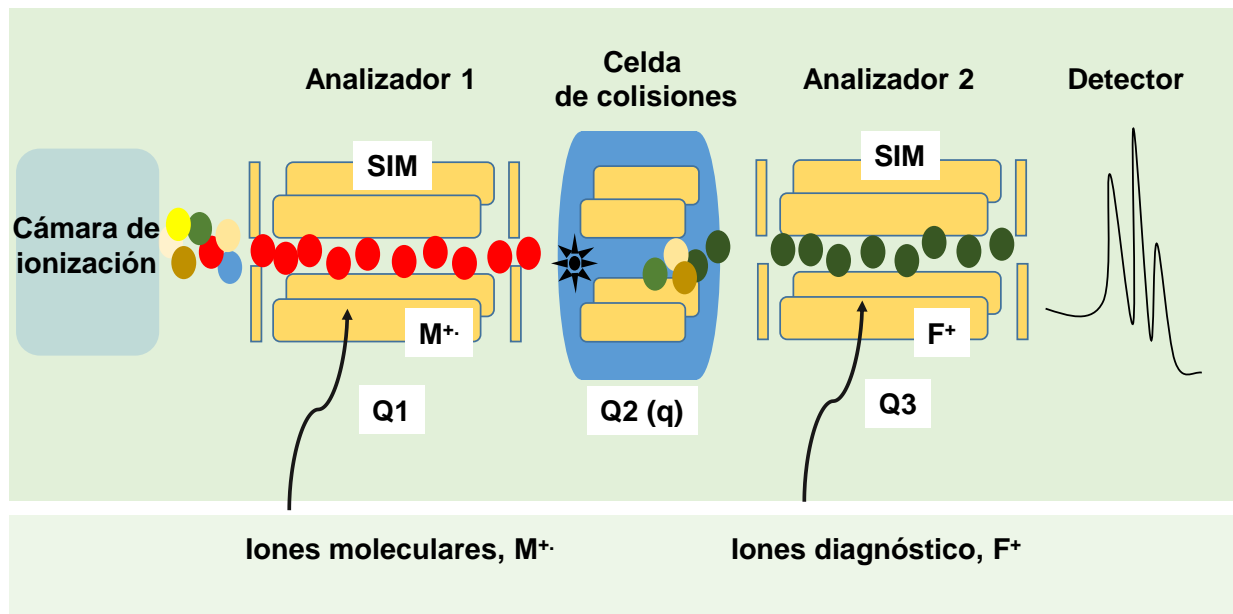
Tabla 3. Modos de adquisición de los analizadores de masas.

Modo de adquisición	Funcionamiento
<i>Full scan</i>	El MSD registra todos los iones (moleculares y fragmento) generados en la cámara de ionización para cada analito que eluye de la columna cromatográfica.
Universal	Implica el monitoreo de iones seleccionados (SIM). En el analizador cuadrupolar sólo atraviesan iones con una determinada relación masa carga (m/z).
<i>Tándem</i>	El sistema tándem hace al detector específico, dentro de los analizadores está el triple cuadrupolar (QqQ). Los modos de adquisición son <i>full scan</i> , SIM, ion-fragmento, ion-precursor, fragmento neutro, y el monitoreo de reacción múltiple (MRM).

1.8. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-QqQ-MS (MODO MRM)

El modo de adquisición MRM mostrado en la **Figura 16**, es más específico, solo hace seguimiento entre dos pares de iones, precursor y producto. El primer cuadrupolo (Q1), opera en modo SIM, filtrando el ion precursor escogido F1. El segundo cuadrupolo (Q2) no actúa propiamente como un analizador (cámara de colisiones activadas), sino que impacta a los iones previamente seleccionados en Q1, con moléculas de gas inerte (N_2) y es sometido a una diferencia de potencial, generando fragmentación del ion precursor. Los iones fragmento producidos son analizados en el tercer cuadrupolo (Q3), también operado en modo SIM (F2), que solo monitorea la masa de uno de los productos de la fragmentación de F1. En conclusión se monitorea la reacción $F1 \rightarrow F2$. Este modo es más específico, luego aumentará la relación señal-ruido (S/N).

Figura 16. Operación del GC-QqQ en el modo MRM.



1.9. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método que permite el análisis de una extensa variedad de moléculas, de altos pesos moleculares y puntos de ebullición, incluyendo termolábiles; principales restricciones de la cromatografía gaseosa. La fase estacionaria más utilizada está compuesta de gel de sílice, generalmente modificada con grupos C_8 o C_{18} . Cuando la naturaleza química de la columna es menos polar que la fase móvil, la técnica se llama en fase reversa. El orden de elución de los analitos será del más polar al menos polar y detectados mediante detectores de arreglo de diodos (DAD), fluorescencia (FLD), *time of flight* (TOF), Q-TOF, espectrometría de masas resonancia de ion ciclotrón con transformada de *Fourier* (FT-ICR-MS).

1.9.1. Detectores en cromatografía líquida de alta resolución. El detector cromatográfico debe caracterizarse por una gran sensibilidad, precisión y linealidad. Es preferible que el detector no se vea afectado por cambios en la composición de la fase móvil (gradientes), tenga un tiempo de respuesta inferior a

0.3 segundos y un volumen de celda reducido, de manera que no contribuya al ensanchamiento de los picos. En la **Tabla 4**, se muestran los detectores característicos de cromatografía líquida.

Tabla 4. Características de los principales detectores utilizados en HPLC.

Detector	Tipo	Límite de detección
Absorbancia	Selectivo	100 pg – 1 ng
Fluorescencia	Selectivo	1 – 10 pg
Índice de refracción	Universal	100 ng – 1 µg
Quimioluminiscencia	Selectivo	0,1 – 1 pg
Electroquímico	Selectivo	10 pg – 1 ng
Evaporativo de <i>light-scattering</i>	Universal	1 – 100 ng
Conductividad	Selectivo	500 pg – 1 ng
Espectrometría de masas	Universal	100 pg – 1 ng
Aerosol Cargado (CAD)	Universal	100 pg – 10 ng

Por otra parte, entre los analizadores de masas más frecuentemente en cromatografía líquida son TOF, QIT, FT-ICR y *Orbitrap*, que son útiles para la adecuada identificación de analitos con mayor peso molecular, no volátiles o térmicamente lábiles.

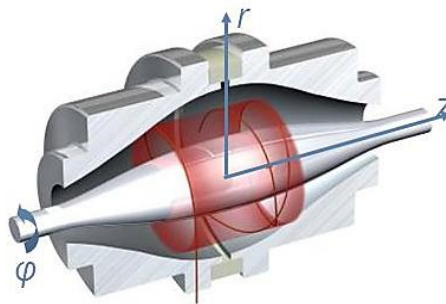
1.10. ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (*TIME OF FLIGHT*, TOF)

Es un analizador que permite la separación de moléculas protonadas o deprotonadas, según el modo de ionización. Una interfaz electrospray (ESI), desolvata las especies iónicas en fase gaseosa. Los iones a un voltaje V de signo contrario que los extrae de la cámara y los acelera con una energía cinética característica para para cada ion. Esta separación usa las diferencias de masas exactas entre cada ion para ser separados según su relación m/z , de manera que, los más ligeros “vuelan” más rápido y llegan al detector antes que los más pesados.

1.11. ANALIZADOR ORBITRAP

El analizador de masas orbitrap, se compone de un electrodo central coaxial con forma *spindle* y un electrodo externo en forma de barril. Cuando un voltaje DC es aplicado entre los dos electrodos axialmente simétricos, resulta la formación de un campo electrostático con distribución potencial. El campo generado puede ser visto como la suma de un campo cuadrupolar de trampa de iones y un campo logarítmico de un condensador cilíndrico, es decir, un campo cuadro-logarítmico (véase **Figura 17**).

Figura 17. Esquema de un analizador de masas orbitrap



Los iones entran a un cilindro cuadrupolar de radiofrecuencia (RF) en la trampa C y son almacenados allí, donde los iones van perdiendo energía como consecuencia de colisiones suaves con un baño de gases. El voltaje de RF es desacelerado y se aplica un impulso de alto voltaje en la trampa, causando una expulsión de iones ortogonal al eje curvo. A medida que el hilo de iones es dispersado en grupos de diferente relación m/z , enfoca cada grupo de iones a la entrada del analizador. Al ingresar al analizador estos grupos de iones experimentan fuertes campos radiales y axiales. Donde, el componente axial genera una aceleración e inyección por excitación y el componente radial establece un movimiento circular alrededor del electrodo central. A medida que el voltaje aumenta en el electrodo durante la inyección, el movimiento radial los comprime hacia abajo. Debido a la fuerte dependencia de las frecuencias de rotación de energía de cada grupo de iones, ángulos y posiciones, cada grupo se

extiende por la coordenada angular formando un anillo delgado giratorio. Finalmente estos voltajes se estabilizan, el amplificador diferencial detecta una corriente inducida por cada uno de estos anillos.

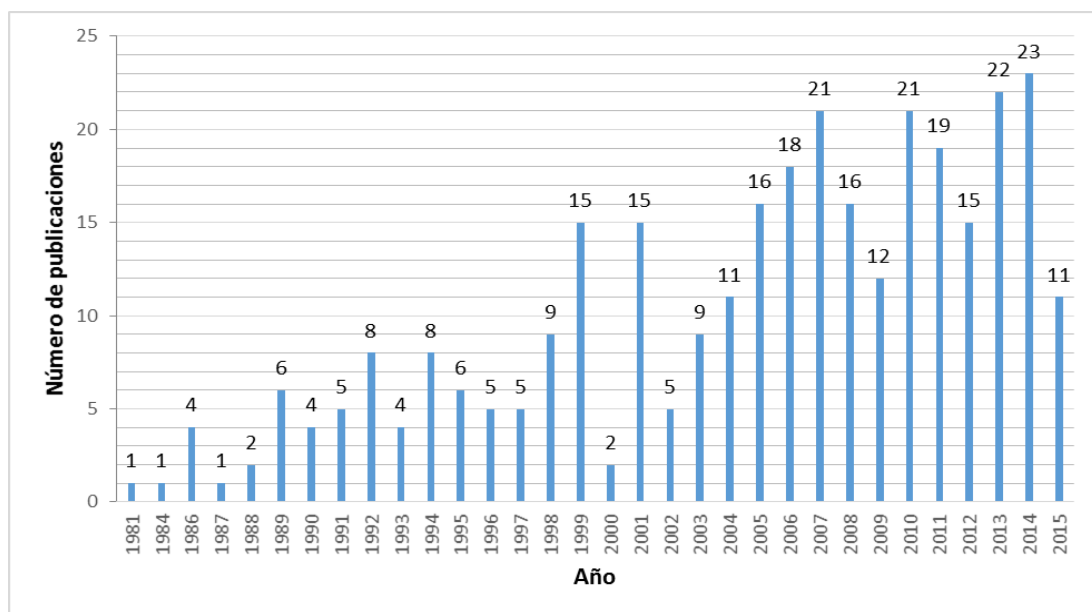
2. CIENCIOMETRÍA

La cienciometría ha permitido la evaluación de la actividad científica en el mundo, mediante la valoración de indicadores numéricos. Se puede evaluar su desarrollo y comparar las políticas científicas de países y organizaciones. Debido a que los análisis cienciométricos consideran la ciencia como una disciplina o actividad económica. Se realizó un estudio cienciométrico de la producción científica sobre los biomarcadores en crudo, usando la base de dato, Scopus (*Elsevier*).

2.1. Base de datos Scopus (Elsevier). La búsqueda en la base de datos *Scopus*, con las palabras claves: *biomarkers, aromatic, crude oil and biodegradation*, reportó 320 resultados, entre artículos (292), conferencias (18), publicaciones comerciales (5), libros (5). En la **Figura 18**, se muestra el comportamiento de la actividad científica desde el año 1981, se observa que la investigación sobre biomarcadores aromáticos en petróleo ha tenido un ritmo constante entre una y nueve publicaciones por año, hasta el año 1998, triplicándose en la última década.

Entre los años 1981-1998, se empezó a usar la geoquímica de reservorio para establecer correlaciones de roca-crudo y crudo-crudo. La alteración secundaria de los crudos se pudo determinar mediante el análisis de la fracción de hidrocarburos saturados por medio de cromatografía de gases con columnas capilares. Respecto a los hidrocarburos aromáticos se evidenció que son menos afectados por la biodegradación. Otros estudios han estado enfocados a la evaluación de los cambios generados en las fracciones saturadas y aromáticas, producto de la incubación en presencia de comunidades bacterianas hidrocarbonoclasticas aisladas de sedimentos marinos. En los compuestos aromáticos, la alteración fue preferencial hacia los compuestos monometilados.

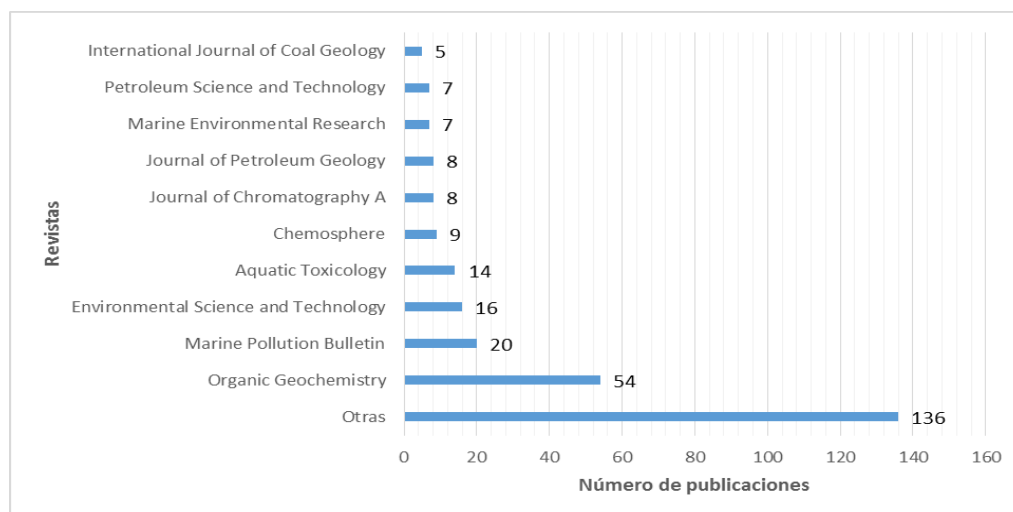
Figura 18. Relación año-número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.



Fuente: Fuente: Base de datos: Scopus. Período de observación: 1981-2016. Consulta: 18 de septiembre de 2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“biomarker AND aromatic AND crude oil OR biodegradation”).

En la última década, los estudios se han enfocado hacia la variación vertical de la geoquímica de reservorio; geoquímica de alquilbencenos; la evidencia de mezclado y crudos biodegradados. La alta resolución de la técnica de espectrometría de masas (FT-ICR-MS) ha sido usada para investigar la distribución de hidrocarburos con heteroátomos a nivel molecular, según la miscelánea de tipo de átomos, número de carbonos y equivalente de doble enlace (DBE). En la **Figura 19**, se aprecia, que la revista *Organic Geochemistry*, tiene la mayor cantidad de trabajos publicados en la investigación de *shales*, crudos, gas natural, carbones, entre otros.

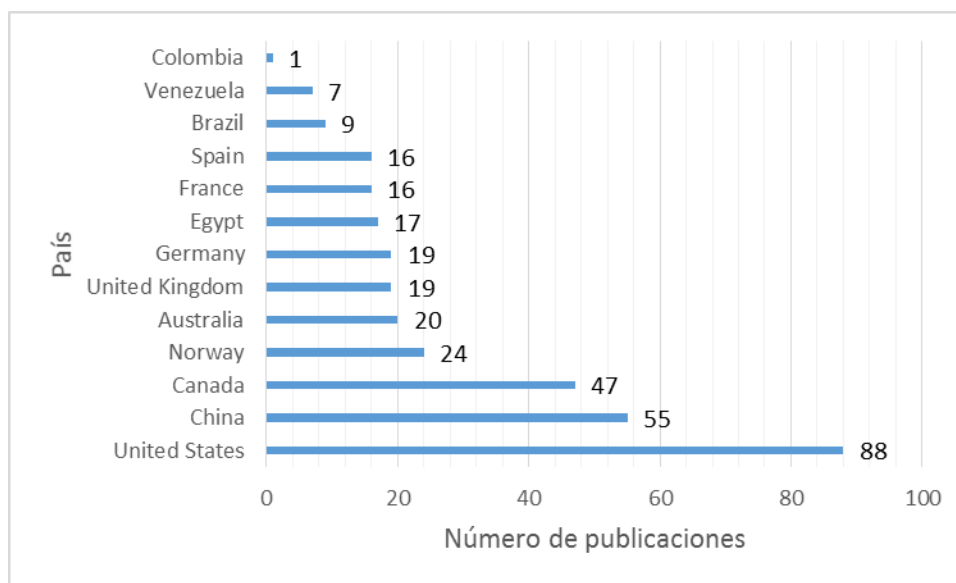
Figura 19. Relación entre las revistas científicas y el número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.



Fuente: Base de datos: Scopus. Período de observación: 1981-2016. Consulta: 18 de septiembre de 2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“biomarker AND aromatic AND crude oil OR biodegradation”).

La cromatografía en una dimensión con detectores FID, GC-MS/SIM y GC-QqQ-MS, han sido ampliamente usados para el estudio de biomarcadores no solamente saturados, sino aromáticos. El uso de acoplamientos GC-MS o GC-QqQ-MS con detectores del alta resolución FT-ICR MS, QTOF, o la cromatografía en dos dimensiones GCxGC en acople a detectores convencionales o a un detector en tándem de alta especificidad (QqQ) o a un detector de alta resolución (*Time of Flight Mass Spectrometry*, TOF-MS). Recientemente, el uso de las técnicas GC/APCI-MS (*Gas Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry*), aunque la fuente de iones fue desarrollada para el acoplamiento LC-MS. Este acoplamiento aumenta la sensibilidad del análisis y proyecta grandes resultados en el análisis de biomarcadores en petróleo.

Figura 20. Relación entre países y el número de publicaciones sobre biomarcadores aromáticos en crudo biodegradado.



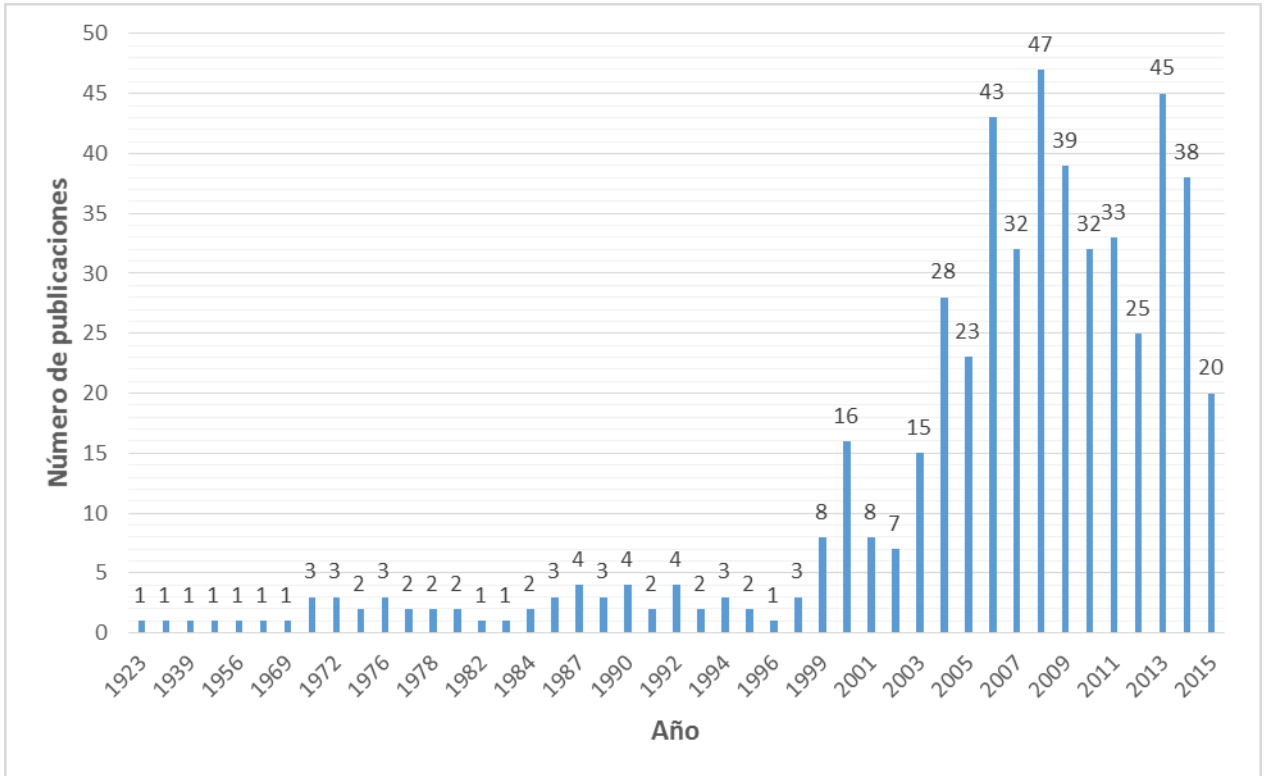
Fuente: Base de datos: Scopus. Período de observación: 1981-2016. Consulta: 18 de septiembre de 2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“biomarker AND aromatic AND crude oil OR biodegradation”).

En la **Figura 20**, se muestran los países que más han publicado sobre biomarcadores aromáticos. En los Estados Unidos, se han realizado convenios de investigación con institutos Colombianos para el entendimiento de la geoquímica de reservorio de cuencas como la de los llanos orientales, en las que se realizó análisis de biomarcadores y composición isotópica. Otros enfoque han sido, por ejemplo, el estudio de la superfamilia de genes del citocromo P450 (CYP) que fue identificado en los copépodos que fueron expuestos a crudos y a las formas alquiladas de PAH, los resultados sugirieron la detoxificación de PAH en copépodos marinos.

En la base de datos *Scopus*, con palabras claves de búsqueda: *naphthenic acids* and *crude*, se encontraron 518 resultados, entre artículos (310), conferencias (162), *reviews* (10), notas (9), revisión de conferencias (6), entre otros (21). En la

Figura 21, se muestra el comportamiento de la actividad científica desde el año 1923, se observa que a partir del año 1999 el interés por el estudio de los ácidos nafténicos en crudo, ha tenido un aumento considerable.

Figura 21. Relación entre año y el número de publicaciones sobre ácidos nafténicos en crudo.

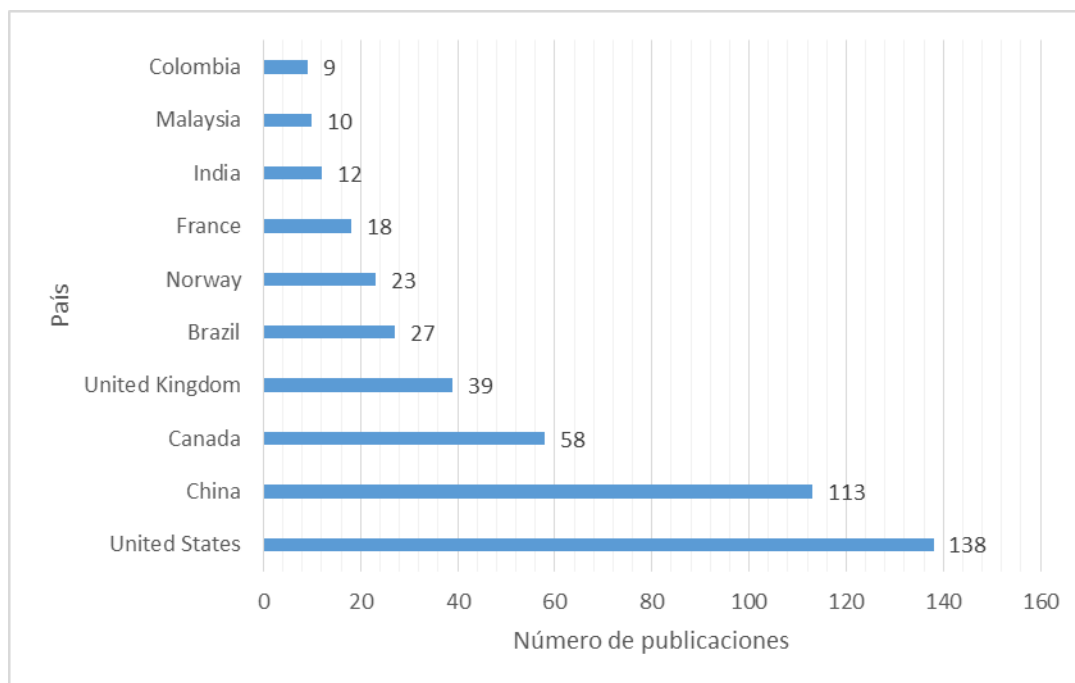


Fuente: Base de datos: Scopus. Período de observación: 1923-2015. Consulta: 18 de septiembre de 2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“naphthenic acids AND crude”).

Los ácidos nafténicos han sido identificados como las especies responsables de la corrosión, en los estudios de caracterización se han usado técnicas instrumentales como microscopia óptica, microscopia de fuerza atómica y espectroscopia Raman. En donde se han identificado geotita, magnetita y hematita como productos de corrosión de los ácidos nafténicos. La correlación entre corrosión

nafténica y los valores de número total de ácidos (TAN), ha sido evaluada por FT-ICR-MS (ESI) modo negativo; se ha encontrado una alta concentración de especies de ácidos nafténicos con un amplio rango DBE (1 a 17) para crudos con alto efecto corrosivo. Una serie de muestras de crudo relacionadas genéticamente, que habían sido degradados en condiciones anaeróbicas fueron analizados por FT-ICR MS, el incremento de la biodegradación de los crudos, influyó sobre la abundancia relativa de estas especies N,S,O. El cambio sobre las especies O₂, permitió establecer un índice de biodegradación.

Figura 22. Relación de países y el número de publicaciones sobre ácidos nafténicos en crudo.



Fuente: Base de datos: Scopus. Período de observación: 1923-2015. Consulta: 18 de septiembre de 2016. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“naphthenic acids AND crude”).

De acuerdo con la **Figura 22**, EE.UU y China han sido los países que más han publicado sobre ácidos nafténicos. En Colombia, se han realizado ocho

publicaciones, el tema principal es la corrosión. Se ha simulado en el efecto de la presión en las líneas de transferencia sobre la corrosión, mediante métodos espectroscopicos de Infrarrojo cercano y métodos quimiométricos.

3. GENERALIDADES DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO

La sección cretácica del norte de Sur América contiene una de las mejores rocas generadoras en el mundo, que probablemente generaron la mayor parte del crudo encontrado en Colombia, Ecuador y Venezuela. La mayoría de los investigadores se refieren a estos sedimentos ricos en materia orgánica, como la formación La Luna y la describen como una roca generadora típica marina, algal, rica en carbonatos.

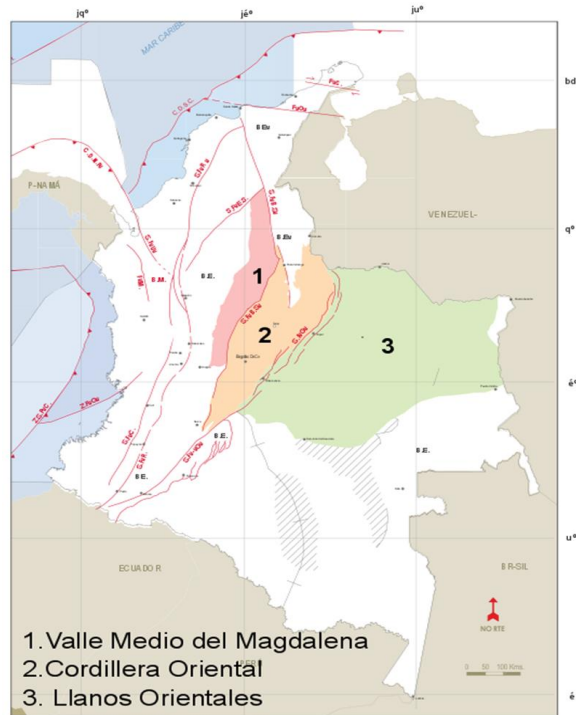
La cuenca los Llanos es una depresión topografía ubicada en el noreste de Colombia, representando la más grande provincia productora de crudo y gas. Cubre una extensión de 225.603 km², conformando parte de las regiones de Meta, Casanare y Arauca. Considerada la más grande cuenca petrolífera del país, con 2 campos gigantes (Caño Limón y Rubiales), 2 campos mayores (Apiay y Castilla) y más de 80 campos menores.

La cuenca del VMM, comprende una depresión alargada, que se encuentra situada en la parte central de Colombia entre las cordilleras Central y Oriental, envuelve un área aproximada de 34.000 km². Es la segunda cuenca petrolífera más importante del país, con 51 campos. Finalmente, la cuenca Cordillera Oriental, comprende una depresión alargada, que envuelve un área aproximada de 60.000 km², localizada entre el valle del río Magdalena y la cuenca Cenozoica de los Llanos. Ésta cuenca tiene 10 campos (8 de petróleo y 2 de gas).

3.1. LOCALIZACIÓN

Las muestras de crudo para el desarrollo del presente proyecto (10), fueron aportadas por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), dentro de un convenio de cooperación UIS-Ecopetrol-2015. En la **Figura 23**, se muestra la ubicación geográfica de las cuencas de interés analítico.

Figura 23. Ubicación geográfica por cuencas de las muestras de crudo.



Tomado de: *Organic Geochemistry Atlas of Colombia*, 2010.

3.2. ANTECEDENTES

En el año 1979, se estableció que las aguas de lavado y la biodegradación afectan la composición de hidrocarburos aromáticos, se estimó que más del 20% de las reservas de petróleo del mundo han sido alteradas o destruidas por degradación bacteriana. Cinco años más tarde, se reportó la existencia de nuevos microorganismos que degradan crudo bajo condiciones estrictamente anóxicas y que la cantidad de crudo biodegradado excede el crudo convencional. Hacia 1997, se estableció que los compuestos aromáticos se biodegradan en su orden: alquilnaftalenos>naftalenos>benzotiofenos>fenantrenos>dibenzotiofenos.

Los efectos de la biodegradación en la cuenca de los Llanos Orientales, fue estudiada en el año 1991, para un total de 35 pozos. La gravedad API, porcentaje de compuestos N,S,O, concentración de azufre, ausencia o disminución de

n-alcanos y presencia de hopanos desmetilados, se usaron para estimar biodegradación. Desde el año 1996 hasta el 2006, se han desarrollado diferentes estudios en la cuenca Llanos Orientales, que han permitido reconocer la existencia de diferentes rocas generadoras, del cretácico terciario, al menos dos pulsos de carga de hidrocarburos y un evento de biodegradación, que permitieron estimar variaciones sobre el sistema petrolífero de la cuenca. Estudios similares se han desarrollado en la cuenca VMM.

El análisis de diamantoides en la cuenca VMM permitió distinguir las *facies* de roca fuente, mediante el uso de diamantoides, y un interés por gases termogénicos. En el año 2010, usando GC-MS/SIM se reportó la ocurrencia y distribución de diamantoides en 22 muestras de crudo procedentes de la cuenca Llanos Orientales, para comprender fenómenos de madurez y biodegradación y el efecto sobre la composición de los crudos, y la medición de la madurez térmica mediante el índice de metilfenantreno (MPI-1) y dibenzotiofenos de la fracción aromática.

En general, la mayoría de análisis geoquímicos en muestras de crudo han sido desarrollados mediante GC-MS. Recientemente, se ha usado la técnica GCxGC-TOF-MS para realizar prospecto de crudos en la cuenca VMM, obteniendo alta madurez térmica y parámetros de roca fuente. Actualmente, la determinación de compuestos polares (N,S,O) y su relación con índices de biodegradación en crudos, es ampliamente estudiada mediante cromatografía líquida con detector FT-ICR-MS.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES Y REACTIVOS

4.1.1. Reactivos y solventes. *n*-hexano, diclorometano, ácido fórmico, trifluoruro de boro en metanol, hidróxido de sodio, gel de sílice, ácido clorhídrico y tolueno, todo grado reactivo; acetonitrilo y metanol (grado reactivo y LC-MS), todos provenientes de Merck (Darmstadt, Alemania). *n*-pentano proveniente de J.T. Baker (Center Valley, PA 18034, EE.UU.). Formiato de amonio de Sigma Aldrich (St. Louis, EE.UU.). El agua tipo I, se obtuvo de la purificación de agua destilada en un sistema Millipore®.

Los gases para cromatografía: helio, nitrógeno, aire, de alta pureza (4.5 A.P) suministrados por Linde Colombia. El hidrógeno fue obtenido de un sistema generador de hidrógeno mediante electrólisis de agua tipo I.

4.1.2. Material de referencia certificado. Las sustancias de referencia utilizadas para el desarrollo del proyecto se muestran en la **Tabla 5**. Los estándares deuterados en 2 y 3 posiciones, se usaron como estándares internos en el método de análisis de biomarcadores aromáticos, y los ácidos 1-adamantanocarboxílico; 6-fenilhexanoico, se usaron como estándares internos en el análisis de las fracciones polares de las muestras de crudo biodegradadas.

Tabla 5. Material de referencia certificado de biomarcadores aromáticos y ácidos nafténicos.

Referencia	Compuesto	Pureza, %	Lote
0983.21-10-IO	d_3C_{21} Esterano monoaromático (5 α (H)/5 β (H))	87	1378

0984.20-10-IO	d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático	>98.5	1379
0860.29-100-IO	C ₂₉ Esterano monoaromático (C)	52.6 y	465
	(5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃))	22.5 (*)	
106399-25G	Ácido 1-adamantanocarboxílico	99	1443353
333603-1G	Ácido 6-fenilhexanoico	98	STBC5854V
CDS003428	Ácido 4-butilciclohexanocarboxílico	98	B02338872
70340-250ML	Mezcla técnica de ácidos nafténicos	---	BCBQ4271V

*Corresponde a la mezcla de los respectivos isómeros. Proveedores: Chiron SA (Esteranos aromáticos C₂₉, d₃C₂₁ y d₂C₂₀), y Sigma-Aldrich (ácidos carboxílicos).

4.1.3. Material de laboratorio. En el desarrollo de la parte experimental se usó balanza analítica (± 0.01 mg, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza); *transferpette* 0.5-10, 2-20, 20-200 y 100-1000 μ L y *dispensette* 1-10 mL Brand (Wertheim, Alemania); agitador vórtice (IK[®], Guangzhou, China); baño termostatado de enfriamiento RA 12 (Lauda, Königshofen, Alemania); espectrómetro FT-IR Cary 630 (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EE.UU.); agitador magnético con calentamiento MSH 300 (Boeco, Hamburgo, Alemania); ultrasonido S30H (ELMA, Singen, Hohentwiel, Alemania).

Pipetas aforadas (5 mL); pipetas volumétricas (5 y 10 mL); tubos de ensayo; balones de fondo redondo (30, 100 y 250 mL); pipeta volumétrica, de 5 mL; vasos de precipitados, de 100, 50 y 10 mL; balones aforados, de 100, 50, 2, 1mL; Brand (Wertheim, Alemania); viales 1.5 mL, tapas, septa (AT, California, EE.UU.); pipeta *Pasteur*, en vidrio de soda, punta fina y estirada; de 2 mL de capacidad; dimensiones: \varnothing interior punta-1 mm, \varnothing interior-7 mm, longitud tubo de aspiración-25 mm, longitud punta-25 mm, longitud total-225 mm; pipeteador de cremallera para pipetas, de caucho, con capacidad de aspiración de 0-10 mL; espátula; cronómetro; vial tapa a rosca de 1.5 mL de capacidad, con tapa y *septum* de silicona blanca-PTFE; *micro*-viales de 200 μ L de capacidad, para

viales de 1.5 mL de capacidad; puntas plásticas para micropipetas Brand (Wertheim, Alemania).

4.2. MUESTRAS DE CRUDO

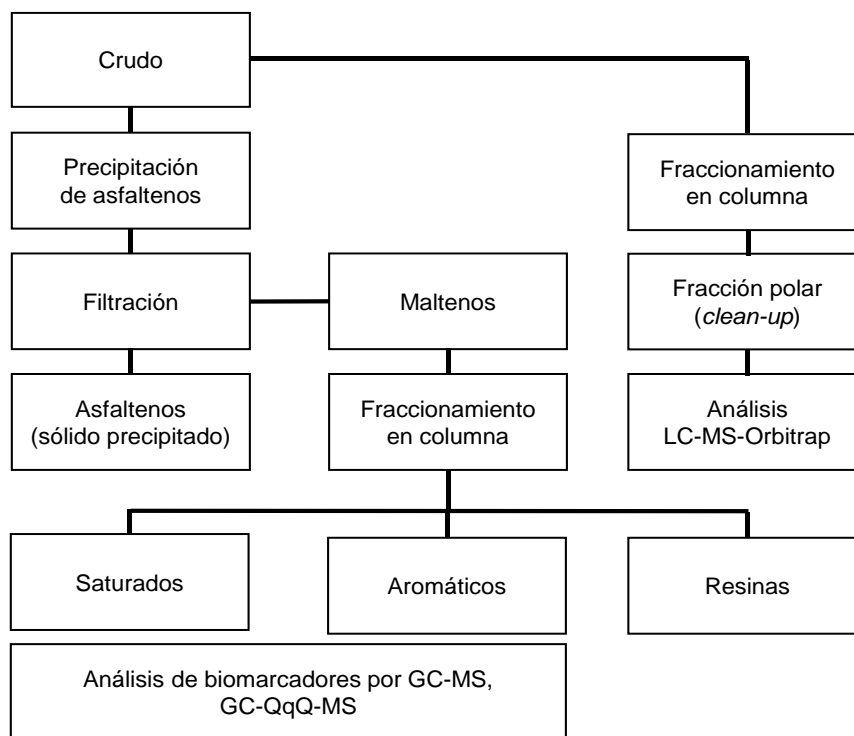
Dentro del convenio marco de cooperación UIS-Ecopetrol, se definieron 10 muestras de crudo, que presentan diferentes niveles de biodegradación, y provienen de diferentes cuencas, en la **Tabla 6**, se muestra la relación de muestras de crudo.

Tabla 6. Listado de muestras de crudo provenientes de diferentes cuencas de la geografía Colombiana.

Código de muestra	Cuenca
C-GQ-1	
C-GL-1	Valle Medio del Magdalena
C-LI-107	
C-MSTB	Cordillera Oriental
C-GTQ-22	
C-Ch-170	
C-R-444	Llanos Orientales
C-R-147	
C-R-357	
C-R-807	

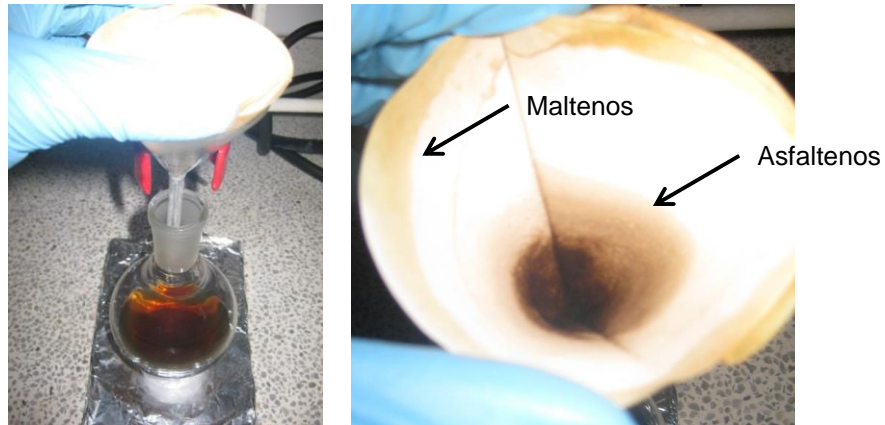
4.3. OBTECIÓN DE MALTENOS Y ASFALTENOS

Figura 24. Esquema general de análisis de biomarcadores aromáticos y productos de biodegradación en el crudo.



4.3.1. Precipitación de asfaltenos. El procedimiento general para el análisis geoquímico se muestra en la **Figura 25**. La precipitación de asfaltenos se realizó con base en el procedimiento descrito en la norma ASTM D6560-12. Los 500 mg de crudo se mezclaron con *n*-pentano (20 mL), la mezcla se sometió a calentamiento con reflujo por 1 h, seguido de reposo por 1.5 h, y filtración por gravedad (papel de filtro grado 42, capacidad de retención 2.5 µm).

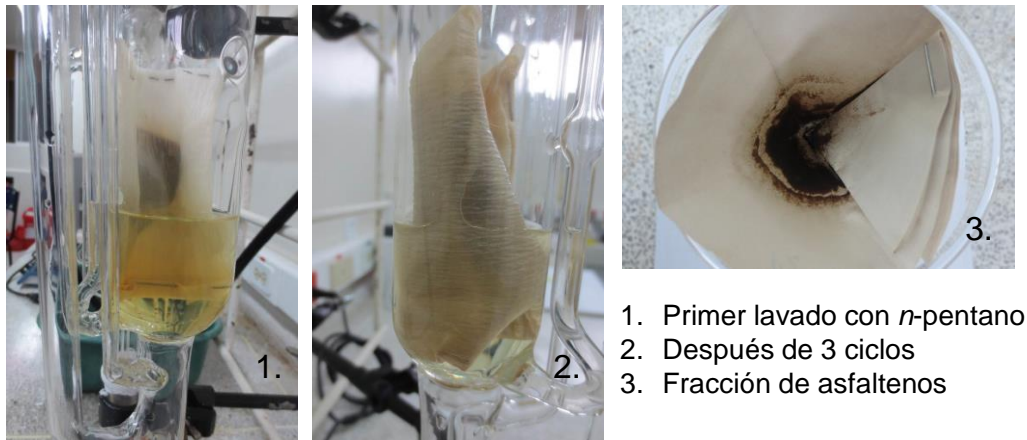
Figura 25. Filtración de asfaltenos.



Relación crudo:*n*-pentano (1:20)

4.3.2. Separación de maltenos. La obtención de una fracción completa de maltenos, se realizó con la extracción repetitiva en un equipo *Soxhlet*, usando *n*-pentano como solvente. En la **Figura 25**, se muestran los asfaltenos obtenidos en una de las muestras de crudo, posterior a la extracción *Soxhlet*. Los asfaltenos fueron obtenidos con diclorometano como solvente (**Figura 26**).

Figura 26. Obtención de maltenos y asfaltenos con *n*-pentano y diclorometano, respectivamente.



4.4. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE ELUCIÓN

Los maltenos (solubles en *n*-pentano), fueron concentrados a sequedad con corriente de gas nitrógeno. Una parte de los maltenos (ca. 20, 50, 100 y 500 mg) fue fraccionada en columna de elución con gel de sílice (ca. 1 y 15 g), previamente activada a 190 °C por 4 h. La elución de las fracciones se realizó con diferentes solventes (*n*-hexano, *n*-hexano:diclorometano, *n*-hexano:acetato de etilo, metanol:diclorometano), y se estableció la mezcla de solventes que permitió obtener relaciones moleculares reproducibles para la muestra de crudo de laboratorio de referencia (C-GQ-1), en la fracción aromática.

Cada una de las fracciones saturadas fue tratada con zeolita ZSM-5, y disuelta en *n*-hexano (50 µL). En el caso de las fracciones aromáticas, a cada una se adicionó 5 µL de cada solución de estándares deuterados: d_3C_{21} (10 µg/mL) y d_2C_{20} (10 µg/mL) esteranos monoaromático y triaromático respectivamente, y se adicionaron 40 µL de tolueno.

4.5. ELIMINACIÓN DE *n*-PARAFINAS CON ZEOLITA ZSM-5

En el cálculo de relaciones moleculares se determinaron los biomarcadores saturados a saber: pristano y fitano. Debido a que son indispensables para generar gráficos de relaciones moleculares entre dibenzotiofeno y fenantreno (eg. DBT/Phen). A cada fracción saturada de crudos se realizó remoción de *n*-parafinas, mediante el uso de zeolita ZSM-5. De acuerdo con las condiciones encontradas en un diseño experimental 2⁴. Finalmente, cada fracción fue disuelta en ciclohexano (mL), la solución fue adicionada sobre zeolita ZSM-5 (2.3 g) y dispersada con gel de sílice (0.2 g). El tiempo de sorción fue de 55 minutos, y posteriormente la mezcla sólida se empacó en una columna de vidrio, la fracción saturada enriquecida en isoprenoides (pristano y fitano) fue obtenida por elución con ciclohexano (5 mL).

4.6. FRACCIONAMIENTO DE CRUDO PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NAFTÉNICOS – ENSAYOS PRELIMINARES

4.6.1. Cromatografía líquida en columna abierta. La complejidad de las muestras de crudo biodegradado puede generar contaminación en los sistemas de detección (eg. LC-Orbitrap-MS). Para el análisis de productos de biodegradación en el crudo, se realizaron pruebas preliminares con los estándares internos metilados con trifluoruro de boro en metanol, y analizados por GC-FID.

La obtención de la fracción polar más promisoría para el análisis de productos de biodegradación, se obtuvo mediante la determinación del porcentaje de recuperación de los estándares internos, ácidos: 1-adamantanocarboxílico y 6-fenilhexanoico, monitoreados como metilésteres de los respectivos ácidos por GC-FID. En las pruebas preliminares de elución se utilizó la muestra de crudo C-GQ-1. En una pipeta *Pasteur* se adicionó gel de sílice (ca. 0.6 g), seguidamente se incorporó la muestra de crudo (ca. 30 mg) dispersada en gel de sílice. En la elución de fracciones se usó diclorometano (3 mL), y solventes polares: etanol:agua (7:3 v/v); hidróxido de sodio 1 % p/v en etanol e hidróxido de sodio 1% en metanol (ca. 3 mL). Cada fracción metanólica o etanólica, fue concentrada a sequedad con corriente de gas nitrógeno y posteriormente metilada con BF_3 /metanol (70°C, 1 h). La recuperación de los estándares internos, se realizó con base en áreas de metilésteres y en muestras de diferente gravedad API°.

4.6.2. Limpieza de fracción polar. Debido a la complejidad de las muestras de crudo biodegradado, las fracciones polares obtenidas, fueron descontaminadas (moléculas no ionizables) mediante extracción líquido-líquido con diclorometano (2 mL) y agua tipo I (2 mL), vórtice (20 s), centrífuga (<2 min). La fase orgánica se desechó, posteriormente se ajustó el pH (< 2), ácido clorhídrico concentrado (ca. 3 gotas). A continuación, se realizó extracción líquido-líquido con diclorometano (2 mL) y *n*-hexano (2 mL), se mezclaron las fases orgánicas y se

concentró a sequedad. El extracto fue reconstituido con formiato de amonio 5 mM en metanol (1 mL), y posteriormente se inyectó 1 μ L al equipo LC-Orbitrap-MS (modo negativo).

4.7. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

4.7.1. Análisis de biomarcadores aromáticos por GC-MS/SIM. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* (AT) 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas (MSD 5973, AT) operado en modo de barrido completo de radiofrecuencias (*fullscan*) y SIM. La columna empleada en el análisis fue DB5-MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60m x 0.25 mm x 0.25 μ m]. La inyección se realizó en el modo *splitless*. En la **Tabla 7**, se muestran algunas de las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de biomarcadores aromáticos y saturados (isoprenoides) en el crudo, y en el **ANEXO 1**, se muestran algunos de los iones característicos por familias de biomacadores aromáticos.

Tabla 7. Método cromatográfico para el análisis de biomarcadores aromáticos por GC-MS/SIM.

Inyector automático	Volumen de inyección	1 μ L
Puerto de inyección	<i>Split</i>	<i>Splitless</i>
	Temperatura, °C	300
Columna	Especificaciones	60 m x 250 μ m x 0.25 μ m
	Presión, psi	21.65
	Flujo, mL/min	1
	Parámetros de adquisición del MS	<i>Solvent delay</i> , min
	Temperatura cámara de ionización, °C	230°C

	Temperatura del analizador, °C		
			150°C
	(142.00)	(178.00)	(206.00)
Parámetros SIM (<i>m/z</i>)	(156.00)	(184.00)	(231.00)
	(168.00)	(191.00)	(245.00)
	(170.00)	(198.00)	(253.00)

*La programación de temperatura junto con otras variables se omitieron por asuntos de confidencialidad dentro del convenio de cooperación UIS-ICP.

4.7.2. Cromatografía de gases – Analizador triple cuadrupolar (GC-QqQ). Los biomarcadores presentes en la fracción aromática y saturada (isoprenoides) del crudo se analizaron en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890N* acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo (QqQ) *Agilent Technologies 7000*, operado en el modo MRM. El procesamiento de los datos se hizo con el programa *MassHunter Qualitative Analyses B.05.00*.

4.7.3. Cuantificación de biomarcadores aromáticos analizados con GC-MS y GC-QqQ-MS. Los biomarcadores presentes en la fracción aromática se cuantificaron aplicando el método de estandarización interna. El esterano triaromático (d_2C_{20}) y monoaromático (d_3C_{21}), se usaron como estándares internos.

4.8. ANÁLISIS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN CRUDO POR LC-ORBITRAP-MS

Los compuestos polares se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC), *Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.)* equipado con una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC3000). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna *Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.)*;

100 x 2.1mm x 1.9 μm de tamaño de partícula) a 30°C. En modo negativo, la fase móvil fue una solución acuosa 5mM de formiato de amonio (A) y metanol con 5mM de formiato de amonio (B). El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas Orbitrap (*Exactive Plus*, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.) a través de una interfaz de electronebulización (ESI) en modo negativo, con voltaje de cono de -3.5 kV.

Se usó nitrógeno como gas secante. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 80-1000. El analizador Orbitrap fue calibrado con las soluciones de referencia certificadas: cafeína (C6035, Sigma-Aldrich); MRFA (M1170, Sigma-Aldrich); UltramarkTM 1621 *Mass Spec.* (AB172435, ABCR GmbH & Co. KG); *n*-butilamina (471305, Sigma-Aldrich); dodecilsulfato de sodio (L4509, Sigma-Aldrich); taurocolato de sodio hidratado (T4009, Sigma-Aldrich). La identificación de los compuestos se confirmó usando el modo del cromatograma de iones extraídos (EIC) y medición de masas exactas.

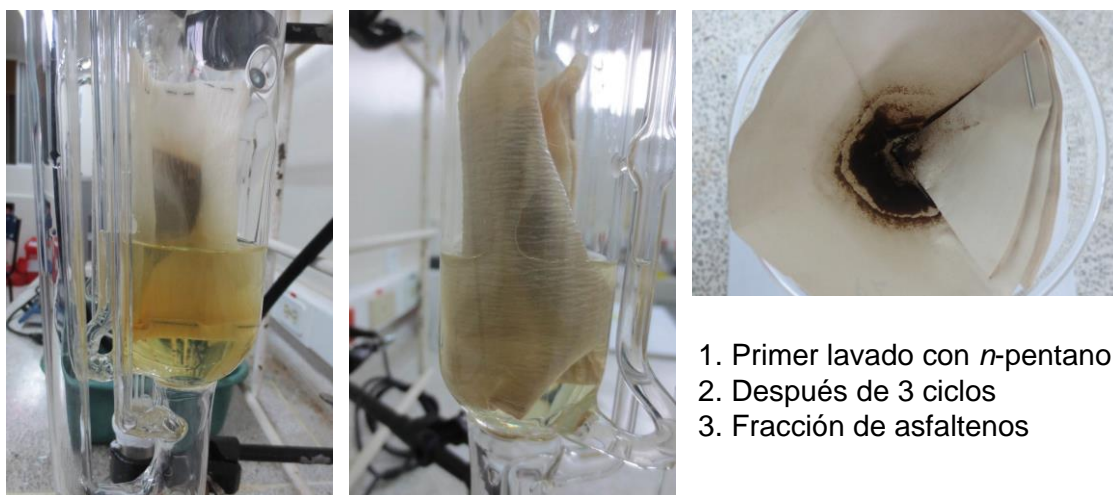
5. RESULTADOS

5.1. DETERMINACIÓN DE MALTENOS Y ASFALTENOS

El contenido de asfaltenos y maltenos en las muestras de crudo biodegradado fue determinado por gravimetría. La cantidad de asfaltenos fue determinada mediante la precipitación en hidrocarburo lineal (*n*-pentano), a pesar de que la norma ASTM D6560 indica el uso de *n*-heptano, como solvente de precipitación. El *n*-pentano, selectivamente podría favorecer la precipitación de algunas resinas. Sin embargo, para el propósito de este trabajo de investigación, los biomarcadores aromáticos son igualmente extraídos tanto con *n*-pentano, como *n*-heptano. Los tiempos de preparación de muestra son menores cuando se usó *n*-pentano.

La obtención de una fracción completa de maltenos, se realizó con la extracción repetitiva en un equipo *Soxhlet*, usando *n*-pentano como solvente. En la **Figura 27**, se muestran los asfaltenos obtenidos en una de las muestras de crudo, posterior a la extracción *Soxhlet*. Los asfaltenos fueron obtenidos con diclorometano como solvente, y los maltenos quedaron solubilizados en *n*-pentano.

Figura 27. Obtención de maltenos y asfaltenos con *n*-pentano y diclorometano, respectivamente.



En la **Tabla 8**, se muestran los porcentajes de asfaltenos y maltenos determinados con base en las normas ASTM D6560 y D2007. Entre las muestras de crudo biodegradado procedentes de las tres cuencas Colombianas, se observa que la muestra de crudo con el menor porcentaje de maltenos fue C-GTQ-22 (59.1 ± 0.7), seguida de la muestra identificada como C-R-357 (68.8 ± 0.5). Aquellas con mayor contenido de asfaltenos fueron: C-R-357 (23.7 ± 0.2), C-MSTB (21.3 ± 0.4) y C-Ch-170 (18.4 ± 0.3). La biodegradación afectó drásticamente a las muestras procedentes de la cuenca Llanos Orientales, y en menor grado a los crudos procedentes de la cuenca Magdalena Medio. La biodegradación, implica una menor concentración de biomarcadores saturados y aromáticos. Por esto la importancia de la determinación de las fracciones saturadas, aromáticas y de resinas, a partir de maltenos.

Tabla 8. Porcentajes (p/p) de maltenos y asfaltenos en muestras de crudo.

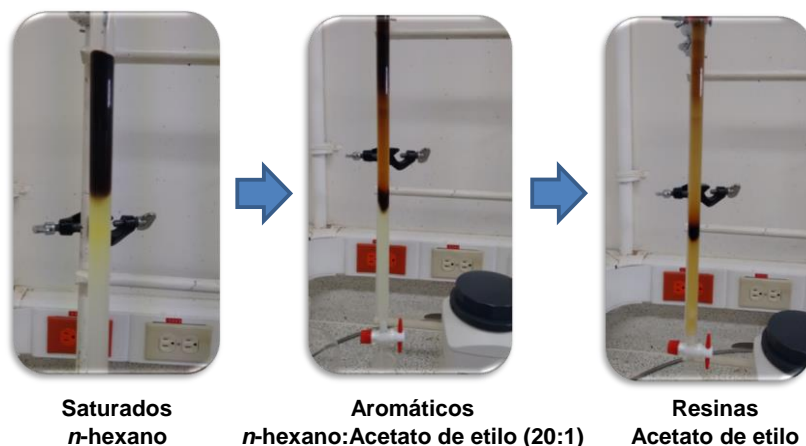
Muestra	% (p/p), $\bar{X} \pm s$		% (p/p) _{normalizado} , $\bar{X} \pm s$	
	Maltenos	Asfaltenos	Maltenos	Asfaltenos
C-GQ-1	95.0 ± 0.8	1.7 ± 0.3	98.2 ± 0.4	1.8 ± 0.4
C-GTQ-22	59.1 ± 0.7	12.4 ± 0.2	82.6 ± 0.4	17.4 ± 0.4
C-R-444	84.1 ± 0.2	13.6 ± 0.3	86.0 ± 0.2	14.0 ± 0.2
C-Ch-170	71.7 ± 0.5	18.4 ± 0.3	79.6 ± 0.3	20.4 ± 0.3
C-R-807	76.2 ± 0.6	13.5 ± 0.4	84.9 ± 0.4	15.1 ± 0.4
C-R-357	68.8 ± 0.5	23.7 ± 0.2	74.4 ± 0.5	25.6 ± 0.2
C-R-147	80.5 ± 0.6	13.3 ± 0.2	85.8 ± 0.5	14.2 ± 0.3
C-GI-1	89 ± 7	4.39 ± 0.06	95.3 ± 0.4	4.7 ± 0.4
C-LI-107	92 ± 2	3.2 ± 0.4	96.6 ± 0.4	3.4 ± 0.4
C-MSTB	70.9 ± 0.6	21.3 ± 0.4	76.9 ± 0.5	23.1 ± 0.2

n=2

5.2. FRACCIONAMIENTO EN COLUMNA DE ELUCIÓN

El fraccionamiento del crudo en columna de elución, usualmente implica el uso de grandes cantidades de solventes: *n*-hexano (ca. 60 mL); *n*-hexano:diclorometano (ca. 40 mL), y metanol-diclorometano (1:1 V/V, ca. 40 mL). Algunos métodos de reducción de cantidades de solventes han sido reportados, el uso de *n*-pentano, *n*-pentano-diclorometano (7:3 V/V), y diclorometano:metanol (95:5 V/V), para eluir compuestos saturados, aromáticos, y resinas, respectivamente. Sin embargo, pruebas preliminares basadas en la norma ASTM-D2007, se muestran en la **Figura 28**, en las que se usaron columnas de elución con gel de sílice (ca. 15 g), y diferentes cantidades de crudo.

Figura 28. Fracciones eluidas en el fraccionamiento de crudo en columna.



Fuente: [2].

El crudo de referencia, Campo C-GQ-1, proviene de la cuenca Valle Medio del Magdalena. Las pruebas de fraccionamiento en columna se realizaron para establecer la condición de elución que permitiera obtener las fracciones (% p/p) de saturados, aromáticos y de resinas, sin diferencia significativa respecto a los valores históricos obtenidos en el ICP. En la **Tabla 9**, se muestran los porcentajes de asfaltenos, y maltenos (saturados, aromáticos y resinas) para la muestra fraccionada de crudo proveniente de Campo C-GQ-1.

En el fraccionamiento en columna de los maltenos, se tomaron como porcentajes de referencia, los obtenidos con el crudo proveniente de Campo C-GQ-1. Los porcentajes de saturados observados en el fraccionamiento en columna con una carga de columna de 500 mg de maltenos, indicaron que se estaban eluyendo cantidades importantes de aromáticos, y se obtenía un resultado muy alto de saturados.

Los porcentajes de saturados y aromáticos, obtenidos al usar cargas de columna de 30 y 50 mg de maltenos, fueron semejantes en los experimentos A-E, excepto C, que está a una diferencia $> 10\%$ ($A > 49+4$). Sin embargo, los porcentajes obtenidos de resinas en los experimentos A-D, fueron inferiores al valor esperado (22 ± 2). La condición de elución E, permitió eluir completamente las resinas. Los porcentajes de asfaltenos, fueron obtenidos luego de filtración en papel franja azul (4-10 μm) y lavar con *n*-pentano. En los experimentos A-E, los maltenos y asfaltenos fueron obtenidos con extracción *Soxhlet*, con *n*-pentano y diclorometano respectivamente.

La condición que permitió obtener valores dentro del rango de referencia (datos ICP) para los porcentajes de saturados, aromáticos y resinas, fue el uso de diclorometano:metanol (1:1 v/v). Debido a la solubilidad de anillos poliaromáticos condensados con algunos heteroátomos (N,S,O) en metanol y diclorometano, que combina dos tipos de interacciones intermoleculares: puente de hidrógeno y dipolos inducidos.

Tabla 9. Estudio de los porcentajes de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos del crudo proveniente de Campo C-GQ-1, obtenidos con diferentes condiciones de elución.

Condiciones	A	B	C	D	E	Ref.
Peso, mg	500	100	50	50	20	20
Fracción						
Saturados, %	55,5	48,8	44,5	53,7	50,9	49 ± 2
Aromáticos, %	23,0	21,1	21,7	29,2	20,6	22 ± 3
Resinas, %	8,5	2,8	2,7	8,7	20,4	22 ± 2
Asfaltenos, %	0,8	1,0	0,8	0,7	0,7	0,6 ± 0,1

Elución de resinas. A: acetato de etilo. B y C: diclorometano. D-E: diclorometano: metanol (1:1 V/V). Ref. Tolueno: metanol (1:1 V/V).

El fraccionamiento en columna desarrollado en el laboratorio, implica el uso de grandes cantidades de solventes: *n*-hexano, 60 mL; *n*-hexano:acetato de etilo (20:1), 100 mL; y acetato de etilo, 70 mL. Otros métodos de fraccionamiento para obtener saturados, aromáticos y resinas, se han hecho con *n*-pentano (4 mL), *n*-pentano- diclorometano (7:3, 4 mL), y diclorometano:metanol (95:5, 4 mL) respectivamente. En esta investigación, se propuso el fraccionamiento en columna pequeña así: saturados (*n*-hexano, 4 mL); aromáticos (*n*-hexano:acetato de etilo (20:1), 4 mL); resinas (1. diclorometano: metanol (1:1), 3 mL. 2. diclorometano, 3 mL). En la **Figura 29**, se muestran las etapas para el fraccionamiento de los maltenos.

Figura 29. Etapas del fraccionamiento de maltenos en columna pequeña.

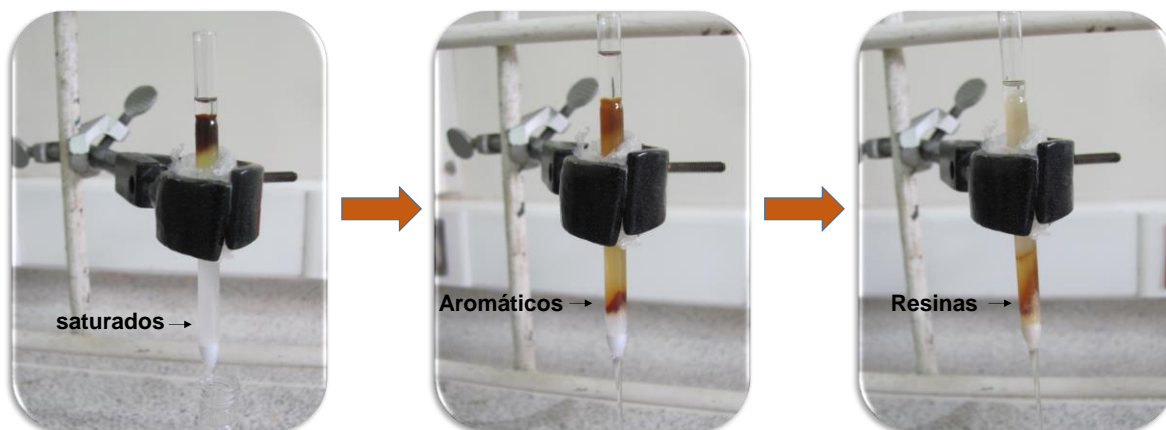


Tabla 10. Comparación de los porcentajes de saturados, aromáticos y resinas obtenidos por cromatografía en columna de elución pequeña (B) y grande (A).

Fracción	Columna A (SiO ₂ , ca.15 g), n=3					Columna B (SiO ₂ , ca. 1 g), n=3				
	1	2	3	\bar{x}	s	1	2	3	\bar{x}	s
Saturados, %	48.0	49.2	50.2	49	1	49.2	44.0	46.3	47	3
Aromáticos, %	24.3	23.3	22.1	23	1	23.3	22.1	25.4	24	2
Resinas, %	21.2	22.2	21.8	21.7	0.5	22.2	24.5	21.5	23	2

La comparación de los datos, se realizó con base en el método de comparación de dos medias (**Tabla 10**). Para dos grados de libertad, se calculó el parámetro estadístico *t-student*, $t_{(n-1), 0.95} = 2.92$. Los valores de *t-student* calculados para las medias de los porcentajes de las fracciones saturadas, aromáticas y resinas fueron 2.80, -0.46 y -1.27 respectivamente, y están en el rango de ± 2.92 . Con los valores calculados, se demuestra que no existe diferencia significativa al usar cualquiera de los métodos de fraccionamiento de maltenos.

5.2.1. Análisis de fracciones por FT-IR. En la **Figura 30**, se muestran los espectros infrarrojo (IR), tomados a la fracción saturada obtenida con el fraccionamiento en columna grande (SiO_2 , ca. 15 g) y la fracción saturada obtenida con una columna que requiere 15 veces menos cantidad de SiO_2 . Las bandas características de tensión del grupo metino (-CH), se observan en las bandas de 2854, 2922 y 2954 cm^{-1} . La flexión correspondiente al grupo metileno (1458 cm^{-1}), y en 1376 y 722 cm^{-1} , las bandas de flexión y balanceo del grupo metilo respectivamente, confirmaron estructuras hidrocarbonadas saturadas.

Las bandas características de compuestos aromáticos en la región (IR), aparecen en la **Figura 31**. Entre estas, se aprecia la tensión del enlace =C-H (2958 cm^{-1}). Las cuatro bandas en 810, 870, 1047 y 1237 cm^{-1} , corresponden a la vibración del anillo aromático, y en 1602 y 1743 cm^{-1} , los sobretonos característicos de anillos aromáticos di- y tri-sustituidos. En la **Figura 32**, se muestra la comparación de los espectros IR para la fracción de resinas, obtenida con diferentes cantidades de gel de sílice. En el espectro son característicos los sobretonos de compuestos aromáticos en 1566 y 1702 cm^{-1} , las bandas en la región desde 800 hasta 1250 cm^{-1} , no son tan intensas como en la fracción aromática.

Figura 30. Comparación de los espectros IR de la fracción saturada de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (rosado) y columna pequeña (verde).

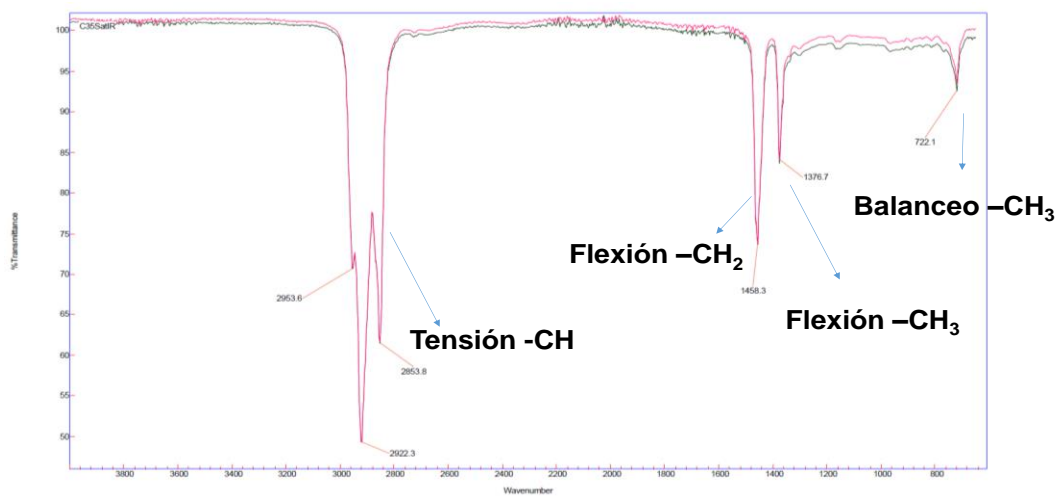


Figura 31. Comparación de los espectros IR de la fracción de aromáticos de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (verde) y columna pequeña (morado).

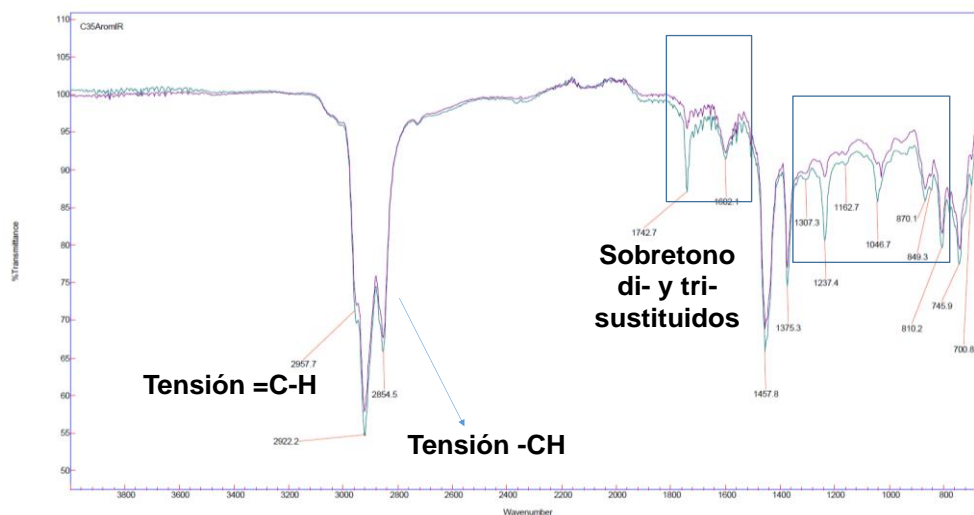
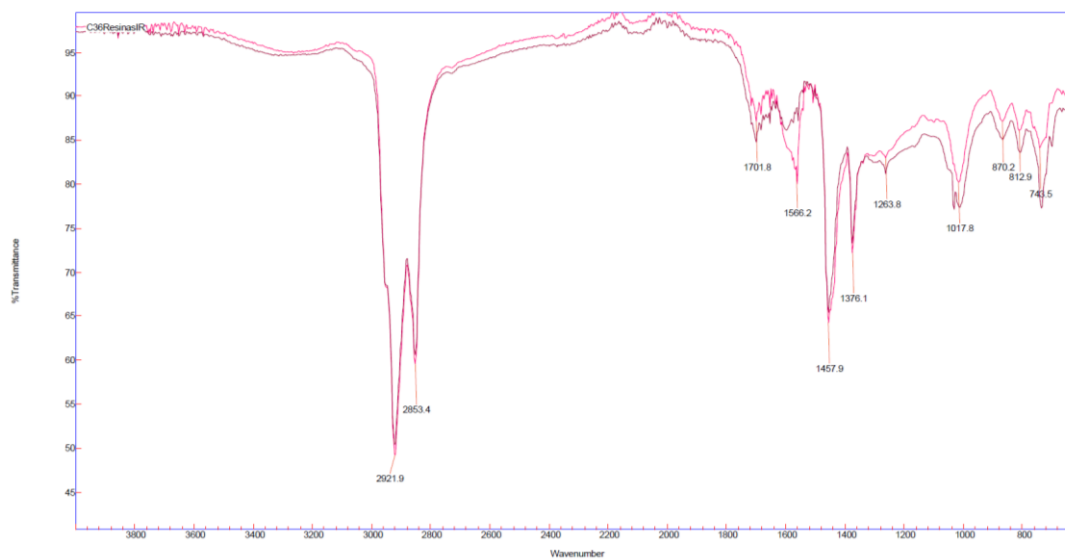


Figura 32. Comparación de los espectros IR de la fracción de resinas de crudo C-GQ-1 obtenida con columna grande (marrón) y columna pequeña (rosado).



El fraccionamiento en columna de elución del crudo, usualmente implica el uso de grandes cantidades de solventes: *n*-hexano (ca. 60 mL); *n*-hexano:diclorometano (ca. 40 mL), y metanol-diclorometano (1:1 V/V, ca. 40 mL). Algunos métodos de reducción de cantidades de solventes han sido reportados. El uso de *n*-pentano,

n-pentano-diclorometano (7:3 V/V), y diclorometano:metanol (95:5 V/V), para eluir compuestos saturados, aromáticos, y resinas, respectivamente.

Las fracciones saturadas, aromáticas y de resinas, fueron obtenidas por cromatografía de elución en columnas pequeñas (pipeta *Pasteur*). Los maltenos fueron fraccionados con las condiciones mostradas en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Solventes o mezclas de elución para obtención de fracciones saturadas, aromáticas y polares a partir de maltenos.

Fracción	Solvente o mezcla de elución	Cantidad, mL
Saturados	<i>n</i> -hexano	4 mL
Aromáticos	<i>n</i> -hexano:diclorometano (9:1 v/v)	4 mL
Resinas	1. Diclorometano	3 mL
	2. Diclorometano: metanol (1:1 v/v)	3 mL

La fracción de saturados fue obtenida con *n*-hexano con un volumen de elución (4 mL). Sin embargo, el uso de *n*-pentano:diclorometano (7:3 v/v), requiere condiciones más controladas, para evitar su evaporación en el proceso de fraccionamiento. La mezcla *n*-hexano:diclorometano, fue usada en diferentes proporciones. En la **sección 5.5.1**, se muestra el efecto de la mezcla de solventes sobre la concentración de biomarcadores aromáticos determinada, y la relación en volumen que permitió obtener los correspondientes biomarcadores, con resultados similares a los obtenidos por el sistema de cromatografía líquida de presión media (MPLC).

Los porcentajes de maltenos y asfaltenos, para las muestras provenientes de C-Ch-170, C-R-444, C-GTQ-22 y C-GQ-1 (crudo de referencia), se muestran en la **Tabla 12**. El crudo proveniente de Campo C-GQ-1 tiene el porcentaje más alto de

maltenos (95.0 ± 0.8), y así mismo, el valor más bajo en % (p/p) de asfaltenos. Esto permite inferir que la gravedad API° del crudo de C-GQ-1, tendrá el valor más alto comparado con los otros crudos. En su orden los crudos más pesados, de mayor a menor, serán: C-Ch-170, C-GTQ-22, C-R-444 y C-GQ-1. El crudo proveniente de C-Ch-170, tendrá la gravedad API° más baja entre los crudos analizados, un $18.4 \pm 0.3\%$ de asfaltenos. C-R-444 y C-GTQ-22, tienen porcentajes p/p de asfaltenos similares; sin embargo, la cantidad de maltenos es mayor en la muestra de crudo proveniente de C-R-444. Luego el crudo C-GTQ-22 será más pesado que el crudo C-R-444. Respecto a los métodos de precipitación y obtención de maltenos y asfaltenos, puede concluirse que tienen una precisión bastante alta, las desviación estándar estuvieron entre 0.2-0.3 para asfaltenos, y en el rango de 0.2-0.8 para los maltenos.

Tabla 12. Porcentajes (p/p) de las fracciones SARA (Saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) de muestras de crudo.

Muestra	% (p/p), $\bar{X} \pm s$ (n=2)			
	Saturados	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
C-GQ-1	49 ± 2	25 ± 1	24 ± 3	1.9 ± 0.4
C-GTQ-22	34.6 ± 0.2	23 ± 1	24 ± 1	18.0 ± 0.2
C-R-444	48 ± 4	25 ± 3	11 ± 1	16.0 ± 0.1
C-Ch-170	20.7 ± 0.7	25.3 ± 0.5	33 ± 2	20.8 ± 0.3
C-R-807	49.3 ± 0.2	27 ± 2	9.2 ± 0.6	14.5 ± 0.4
C-R-357	47.4 ± 0.8	25 ± 1	10 ± 2	18 ± 1
C-R-147	46.9 ± 0.5	25.6 ± 0.7	11.7 ± 0.3	15.8 ± 0.7
C-GI-1	43.24 ± 0.06	24.3 ± 0.2	27.1 ± 0.2	5.44 ± 0.06
C-LI-107	44.1 ± 0.4	24.7 ± 0.6	27.8 ± 0.1	3.30 ± 0.08
C-MSTB	22.3 ± 0.4	19.4 ± 0.5	30.6 ± 0.4	27.7 ± 0.2

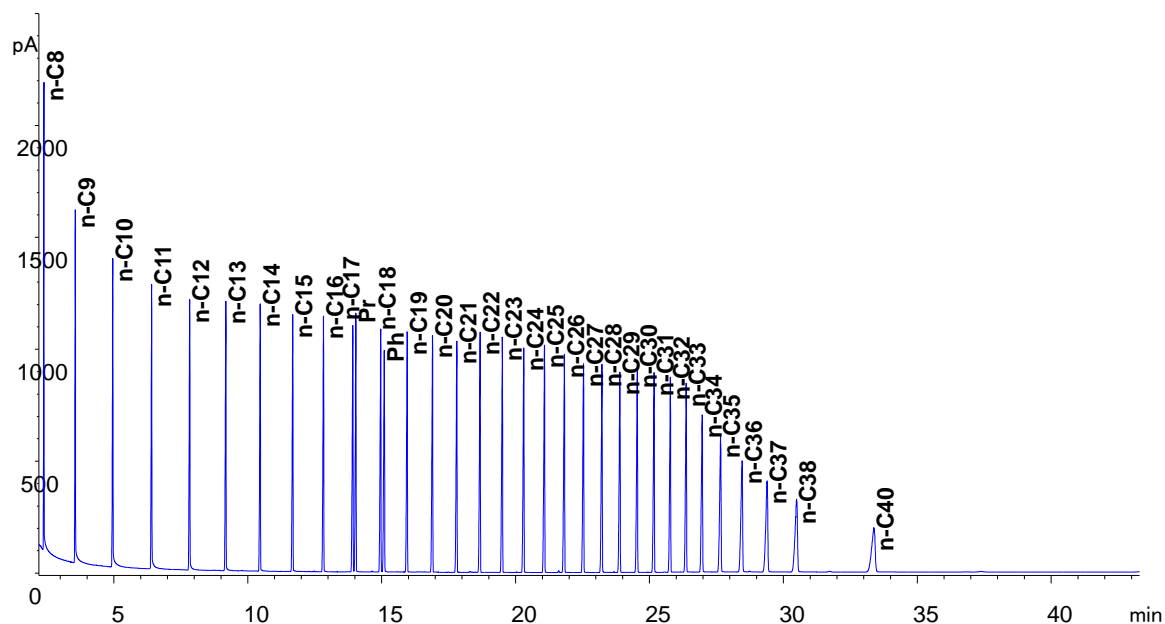
De acuerdo con la **Tabla 12**, La cantidad de compuestos saturados y aromáticos es similar entre las muestras del crudo de referencia (C-GQ-1), y las muestras procedentes de la misma cuenca VMM. Sin embargo, el efecto de la biodegradación se observa en la disminución del porcentaje de compuestos saturados: C-Ch-170 > C-MSTB > C-GQ-1, en orden descendiente sigue el orden inverso de biodegradación. La cantidad de resinas es más alta en C-Ch-170, que ostenta ser la muestra con el mayor nivel de biodegradación, respecto a la muestra de referencia no biodegradada: C-GQ-1. De ahí que el crudo de C-Ch-170 sea denominado crudo pesado, y la concentración de biomarcadores saturados y aromáticos sea más baja con respecto a las otras muestras.

El porcentaje de compuestos aromáticos en las muestras de crudo analizadas, es semejante; se encuentra entre 24.3-25.3 por ciento. Los porcentajes infieren que la maduración de la materia orgánica se encuentra o ha superado la ventana de generación, y existen condiciones (*in-situ*) en algunas muestras (eg. C-Ch-170) que propician el proceso de biodegradación, debido a la disminución de moléculas (eg. saturadas) que son más fácilmente biodegradadas con respecto al aumento de la aromaticidad en una estructura química.

5.3. ANÁLISIS *WHOLE OIL*

En el análisis de crudo total (*whole oil*), se compararon la cantidad de parafinas de diferente peso molecular, en algunas muestras de crudo. Los tiempos de retención de los hidrocarburos lineales se determinaron con el análisis de una mezcla patrón de *n*-parafinas (*n*-C₈-C₄₀) mediante GC-FID (**Figura 33**). La mezcla de referencia certificada contiene los isoprenoides pristano y fitano.

Figura 33. Perfil cromatográfico de hidrocarburos lineales C₈-C₄₀, con pristano y fitano, obtenido por GC-FID columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm).



En la **Figura 34**, se muestra el perfil cromatográfico *whole oil* obtenido por GC-FID, de la muestra de crudo proveniente de Campo C-GQ-1. Un perfil abundante en parafinas de bajo peso molecular (C₈-C₂₀), y disminución en parafinas >C₂₀, indica que el crudo tuvo aporte de materia orgánica mayoritariamente de origen marino. El origen del crudo C-GQ-1 es semejante al del crudo C-GTQ-22. Según la **Figura 35**, la proporción de parafinas de bajo peso molecular es más alta que la cantidad de hidrocarburos superiores (>C₂₀). Sin embargo, entre los crudos C-GQ-1 y C-GTQ-22, la cantidad de hidrocarburos es más alta en C-GQ-1. Sin embargo, al comparar los perfiles cromatográficos *whole oil* de las muestras de crudo C-Ch-170, C-R-444 y C-GTQ-22, se observa que muchas de las *n*-parafinas no hacen parte de los crudos, específicamente en C-R-444 y C-Ch-170. Debido a esto, los porcentajes de compuestos saturados determinados previamente, son coherentes con un efecto de biodegradación sobre crudos que tempranamente llegaron a la ventana de generación, C-Ch-170,

C-R-444 y C-GTQ-22 (**Figura 35**), en su orden iniciando por el crudo más biodegradado hasta el crudo con mayor cantidad de *n*-parafinas.

Figura 34. Perfil cromatográfico *whole oil* de crudo proveniente de Campo C-GQ-1 obtenido por GC-FID, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

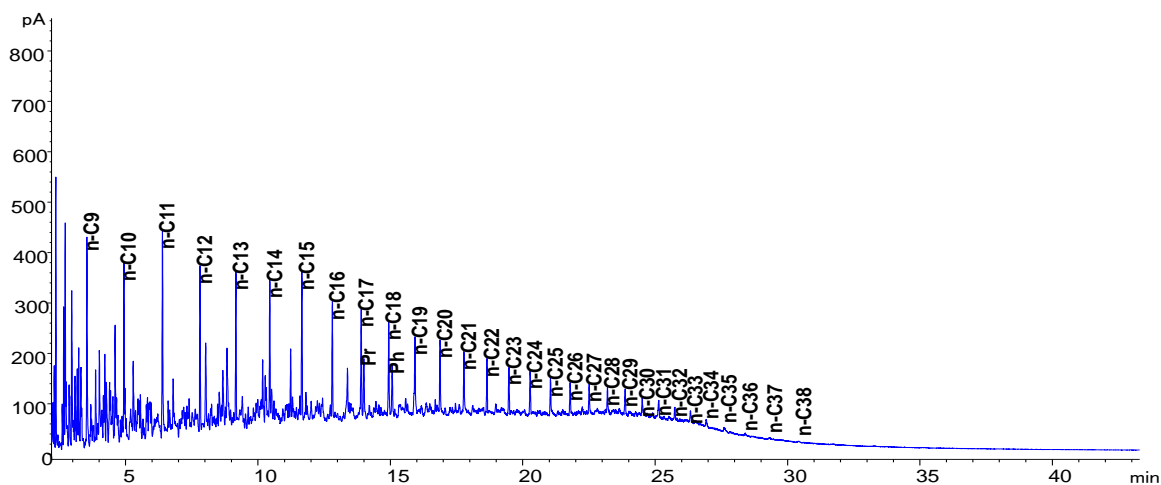
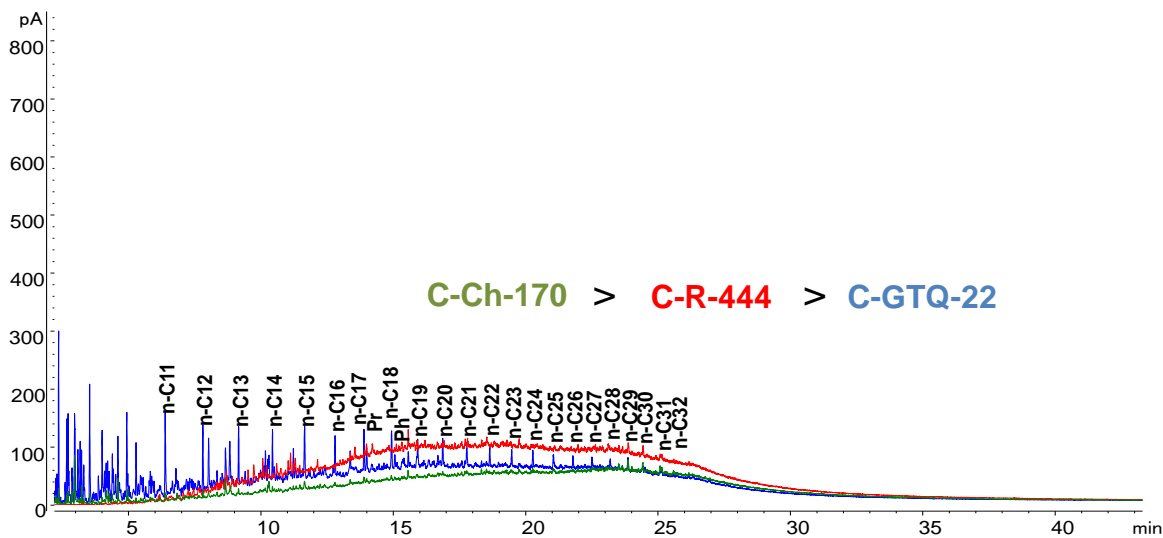


Figura 35. Perfil cromatográfico *whole oil* de muestras de crudo, verde: C-Ch-170, rojo: C-R-444, azul: C-GTQ-22, obtenidos por GC-FID, columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).



El análisis de biomarcadores aromáticos, requiere el análisis de dos isoprenoides importantes en el análisis geoquímico, a saber: pristano y fitano, que junto a fenantreno y dibenzotiofeno, permiten establecer litofacies clásticas o siliciclásticas, y los ambientes de depositación de la roca fuente que dio origen al crudo analizado.

5.4. FRACCIÓN SATURADA

La relación pristano/fitano ha sido utilizada como indicativo de las condiciones óxido-reductoras que predominaron en el proceso de sedimentación. Estos isoprenoides, derivados de la cadena fitol de la clorofila, pueden sufrir procesos de oxidación o reducción. Esto depende del potencial redox en el ambiente de sedimentación; en condiciones muy reductoras, predomina el isoprenoide fitano (C₁₈); en condiciones menos reductoras puede ocurrir la oxidación a ácido fitánico y posterior descarboxilación y formación de pristano (C₁₇). Consecuentemente, la relación pristano/fitano puede ser utilizada como indicadora de condiciones óxido-reductoras del ambiente de sedimentación. En las muestras estudiadas, las relaciones pristano/fitano presentaron valores entre 1.5-1.6, lo que indica predominio de pristano, y permite inferir un ambiente de sedimentación moderadamente reductor.

Figura 36. Cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5: [5%-fenil-(metilpolisiloxano), (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)] de la fracción saturada de crudo tratada con diferentes adsorbentes. Azul: Patrón de hidrocarburos. Rojo: Tamiz molecular 5Å. Verde: Zeolita Cubana. Magenta: ZSM-5.

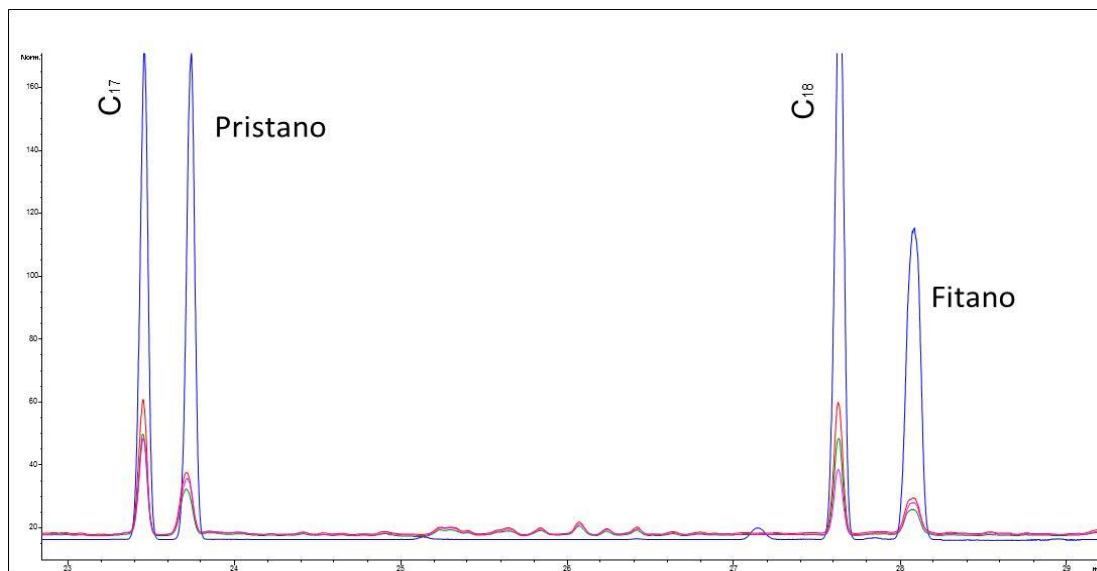
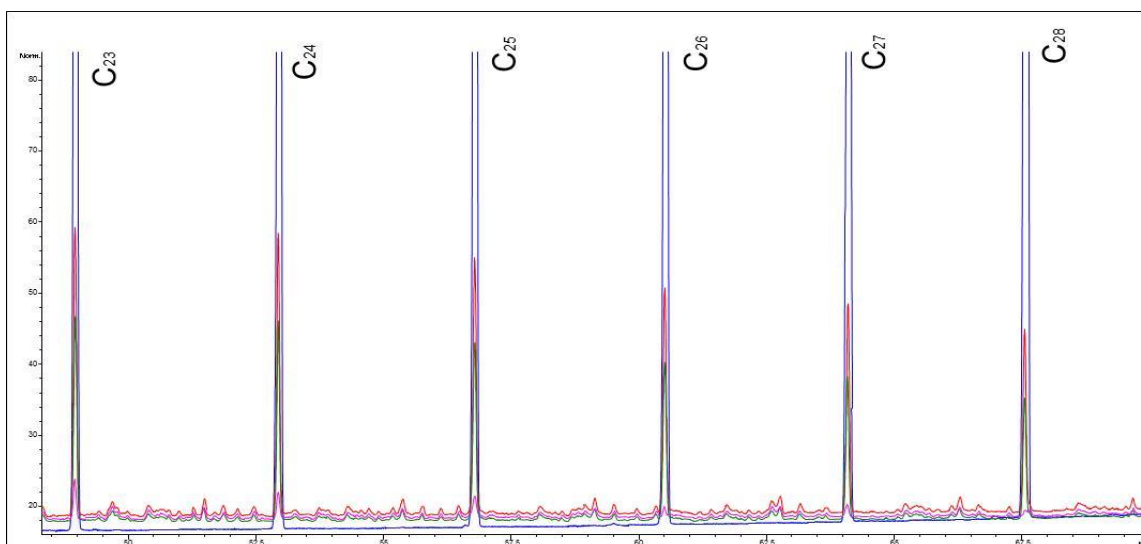


Figura 37. Cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5: [5%-fenil-(metilpolisiloxano), (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)] de la fracción saturada de crudo tratada con diferentes adsorbentes. Azul: Patrón de hidrocarburos. Rojo: Tamiz molecular 5Å. Verde: Zeolita Cubana. Magenta: ZSM-5.



La concentración de los biomarcadores saturados (pristano y fitano) en la fracción saturada, es posible mediante el uso de tamices moleculares. La zeolita natural cubana contiene: Clinoptilolita (40%); mordenita (40%); calcita, cuarzo, feldespato (20%). La composición química de la zeolita natural cubana (eg. Tasajeras): SiO₂ (68%); Al₂O₃ (11%); Fe₂O₃ (3%); CaO (3%); Na₂O (1%); K₂O (2%); MgO (1%) y H₂O (10%). El tamaño de los poros en la zeolita natural cubana está en el rango de 4-7 Å. De acuerdo con las **Figuras 36-37**, se observa que la zeolita ZSM-5, presentó la mayor adsorción de hidrocarburos lineales, con respecto a los otros materiales. En la **Tabla 13**, se muestran las variables y niveles para un diseño factorial 2⁴, para aumentar la concentración de pristano y fitano en la fracción saturada.

Tabla 13. Variables y niveles para el diseño factorial 2⁴ en el tratamiento de la fracción saturada del crudo con zeolita ZSM-5.

Variables	Niveles		
	-1	0*	1
Cantidad de zeolita (X1), g	0.5	1.25	2
Cantidad de gel de sílice (X2), g	0	1	2
Tiempo de sorción (X3), min	20	40	60
Volumen de ciclohexano (X4), mL	5	10	15

* El nivel 0, corresponde al centro de coordenadas del experimento para determinar la estabilidad del experimento.

Los valores del observable en el experimento: $Y_{exp} = (\sum \text{Áreas de HC lineales})^{-1}$, se muestran en la **Tabla 14**. La región de hidrocarburos desde C₁₇ a C₄₀ se consideró para la sumatoria. El coeficiente de variación para evaluar la estabilidad del experimento fue de 3.1 %. El experimento 20 aportó más información al modelo.

Tabla 14. Matriz de experimentos para el diseño factorial 2^4 en el tratamiento de la fracción saturada del crudo con zeolita ZSM-5.

No. Exp.	X1	X2	X3	X4	Y _{exp.}
1	-1	-1	-1	-1	43.30804
2	-1	-1	-1	1	42.47865
3	-1	-1	1	-1	52.25832
4	-1	-1	1	1	40.56311
5	-1	1	-1	-1	33.41702
6	-1	1	-1	1	30.49885
7	-1	1	1	-1	31.44589
8	-1	1	1	1	62.85557
9	1	-1	-1	-1	9.52795
10	1	-1	-1	1	16.65768
11	1	-1	1	-1	5.10485
12	1	-1	1	1	2.974
13	1	1	-1	-1	11.56164
14	1	1	-1	1	15.95275
15	1	1	1	-1	13.54698
16	1	1	1	1	21.8918
17	0	0	0	0	16.85269
18	0	0	0	0	17.49822
19	0	0	0	0	17.94458
20	1.5	1.5	-1	2	14.66375

X1: cantidad de zeolita. X2: cantidad de gel de sílice. X3: tiempo de sorción. X4: volumen de ciclohexano.

El modelo obtenido para el diseño experimental 2^4 en el tratamiento con zeolita ZSM-5 de la fracción saturada:

$$Y = 0.0816875 + 0.056582*x_1 - 0.0343003*x_2 + 0.0287488*x_3 - 0.0368006*x_1*x_2 + 0.0309795*x_1*x_3 - 0.0343344*x_2*x_3 - 0.0328144*x_1*x_2*x_3$$

El modelo obtenido tiene coeficientes de correlación R^2 : 0.9794. - R^2 ajustada: 0.9588, que indican que los valores que pueda predecir el modelo en la zona de exploración del experimento tienen un ajuste mayor que 0.95.

Las mejores condiciones para la remoción de hidrocarburos lineales con zeolita ZSM-5 de la fracción saturada fueron: cantidad de zeolita, X1: 2.3 g, cantidad de gel de sílice, X2: 0.2 g, tiempo de sorción, X3: 55 min, y el volumen de elución (ciclohexano) puede ser cualquiera comprendido en el rango de 5 – 15 mL.

Las zeolitas para separar los hidrocarburos ramificados y cíclicos de la fracción saturada son la Faujasita, ZSM-5, mordenita y linde tipo A. La zeolita ZSM-5 permite retener hidrocarburos lineales inclusive mayores de C_{20} y en tiempos más cortos.

Los hidrocarburos lineales fueron retenidos por la zeolita ZSM-5. La disminución de las señales de hidrocarburos se muestra en el cromatograma de la **Figuras 38**. Se muestra la disminución de los picos cromatográficos de los hidrocarburos lineales en más de un 90 %. Los compuestos cíclicos y ramificados permanecieron en la fracción. Este tamizaje de compuestos resultó útil en el análisis GC-QqQ-MS para la búsqueda de biomarcadores: pristano y fitano.

Figura 38. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25 μ m) para el crudo A. 1. Fracción saturada. 2. Fracción saturada con tratamiento zeolita ZSM-5. 3. Patrón de hidrocarburos.

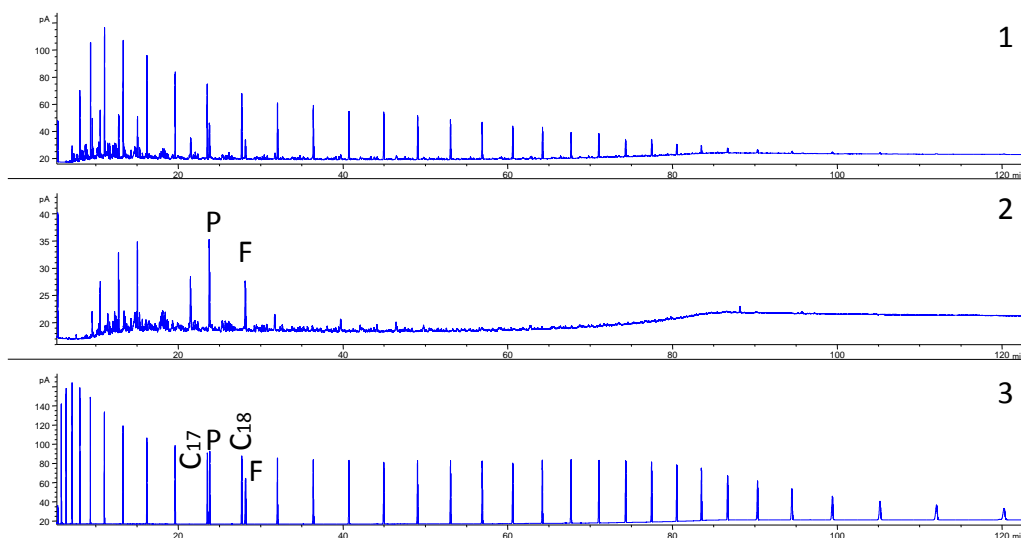
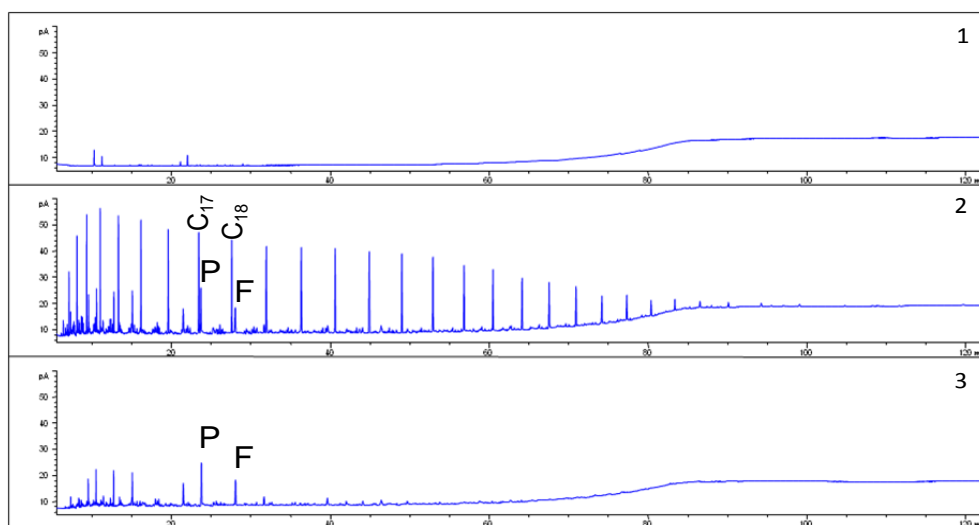


Figura 39. Cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5: [5%-fenil-(metilpolisiloxano), (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)] de la fracción saturada de crudo. 1. Blanco de procedimiento. 2. Sin tratamiento con zeolita ZSM-5. 3. Con tratamiento con zeolita ZSM-5. P: Pristano, F: Fitano.



Las mejores condiciones para la remoción de hidrocarburos lineales con zeolita ZSM-5 de la fracción saturada fueron, cantidad de zeolita, X1:2.3 g, cantidad de gel de sílice, X2: 0.2 g, tiempo de sorción, X3: 55 min, y el volumen de elución (ciclohexano) puede ser cualquiera comprendido en el rango de 5 – 15 mL. Las condiciones encontradas aplican para tratar la fracción saturada con zeolita ZSM-5. El hidrocarburo lineal C₂₇, se encontró en la fracción saturada tratada con las mejores condiciones para remover hidrocarburos lineales con zeolita ZSM-5; no se logró la remoción total. Sin embargo, se minimizó la cantidad de hidrocarburos lineales a alrededor del 99.9% de remoción (**Figura 39**).

Figura 40. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25µm) de la fracción saturada del crudo con tratamiento de zeolita ZSM-5. Evaluación de la repetibilidad del tratamiento con zeolita, C-GI-1 (A,B y C).

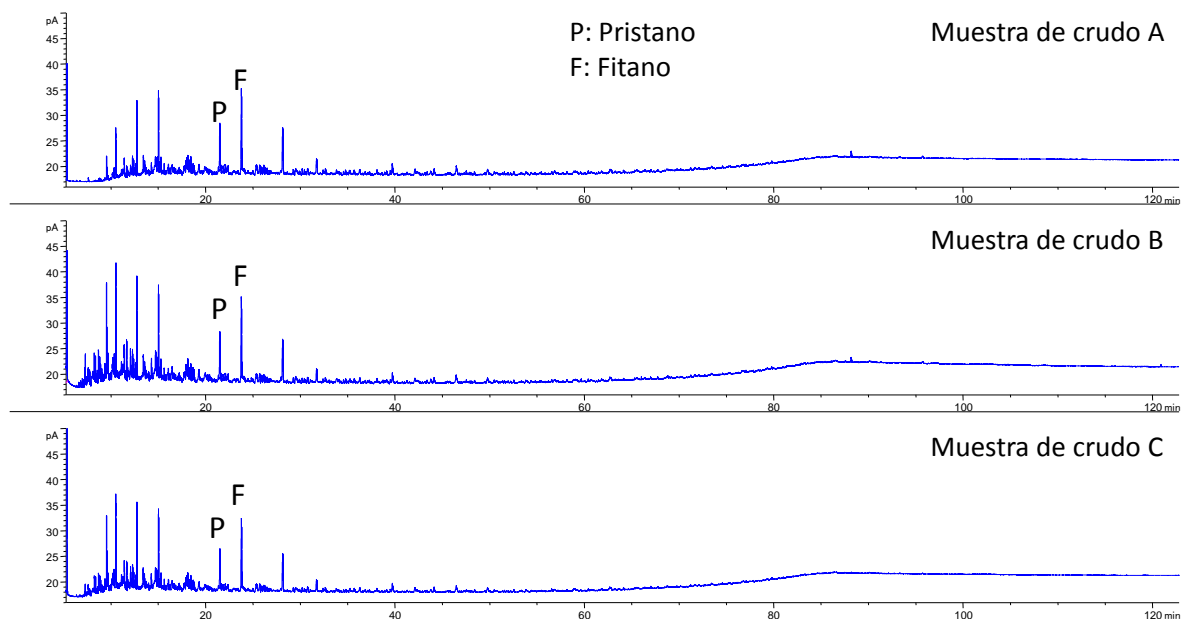
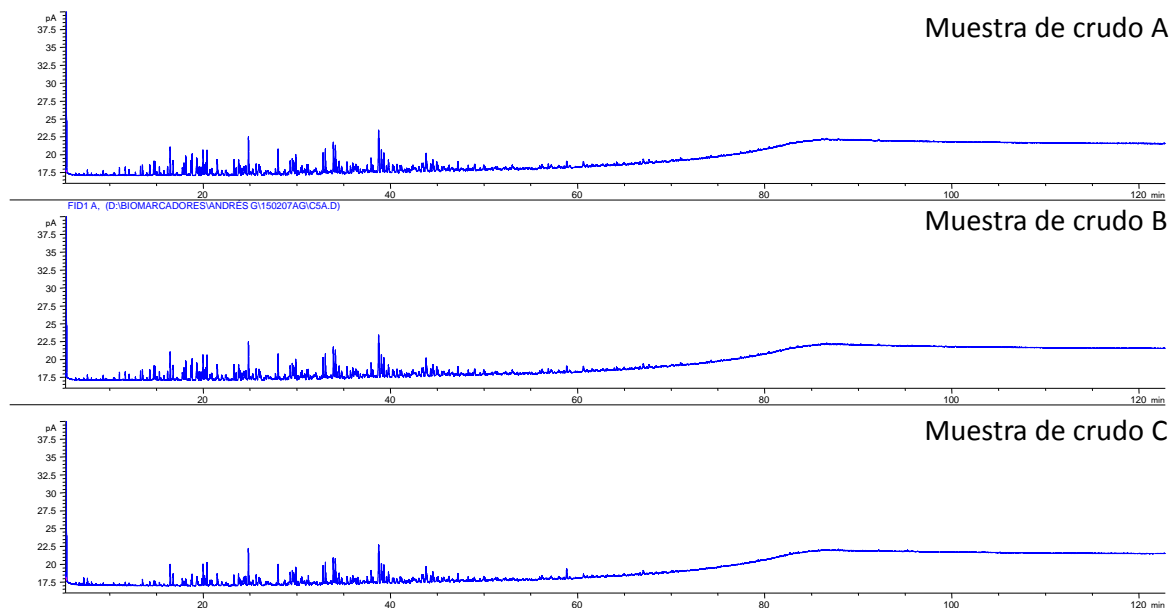
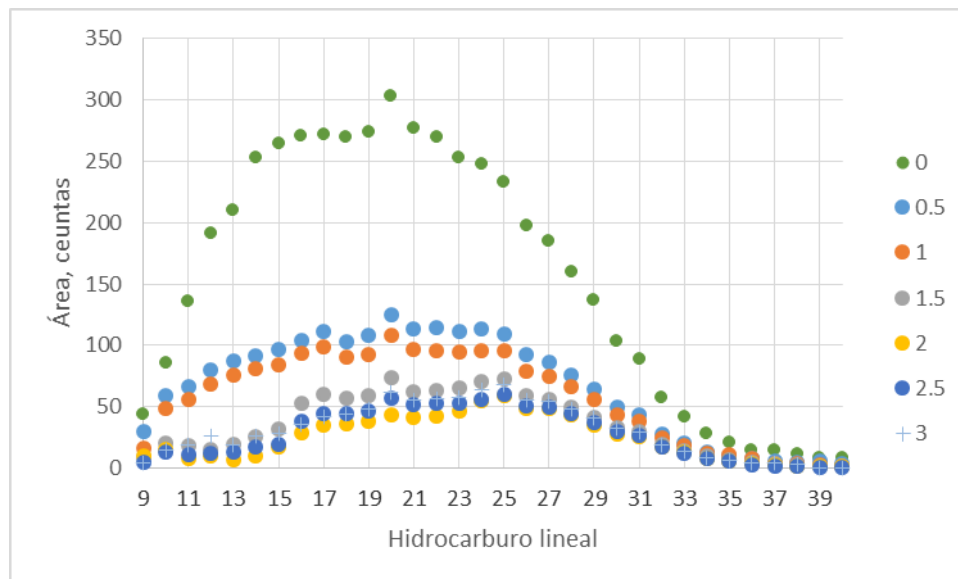


Figura 41. Cromatograma obtenido por GC-FID en columna apolar (60m x 0.25mm x 0.25 μ m) de la fracción aromática del crudo. Evaluación de la repetibilidad con el crudo C-GI-1 (A,B y C).



En el tratamiento al crudo con zeolita ZSM-5, antes del fraccionamiento en columna, el crudo (1 g) se disolvió en ciclohexano (1 mL), la solución obtenida fue adicionada sobre una cantidad de zeolita ZSM-5 activada (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 g), seguido de ultrasonido (15 min). El tiempo de sorción fue de 60 min. Posteriormente, se adicionó gel de sílice (ca. 2 g). Se utilizó una columna de elución (1 cm *d.i.*) que contenía gel de sílice activada (25 cm de altura), empacada con *n*-hexano. A la columna se adicionó la mezcla proveniente del paso de sorción y dispersión en gel de sílice. Posteriormente, se eluyó la fracción saturada con *n*-hexano (60 mL).

Figura 42. Comportamiento del área cromatográfica de hidrocarburos lineales, según el tratamiento del crudo con diferentes cantidades de zeolita ZSM-5 (0 - 3 g), y posterior fraccionamiento en columna.



En la **Figura 42**, se muestra el comportamiento de la adsorción de hidrocarburos lineales del crudo directamente sobre la zeolita ZSM-5. Se puede apreciar que al aumentar la cantidad de zeolita ZSM-5 desde 0.5 a 2 g, la cantidad de hidrocarburos lineales disminuye, y la eficiencia de adsorción se vuelve casi constante de 2 a 3 g de zeolita ZSM-5. Sin embargo, no se logra disminuir la totalidad de hidrocarburos lineales, con la misma eficiencia de remoción que se obtuvo en el tratamiento de la fracción saturada con zeolita ZSM-5.

Los compuestos orgánicos del crudo que pertenecen a las fracciones aromáticas, resinas y asfaltenos, tienen algunos sustituyentes alquilo lineales. Estos extremos pueden introducirse en las secciones tubulares longitudinales de la zeolita ZSM-5, y saturarla, evitando que hidrocarburos lineales de bajo peso molecular sean aquellos que ocupen los espacios dentro de la zeolita.

El comportamiento de la adsorción de hidrocarburos sobre la zeolita ZSM-5 cambia la tendencia para hidrocarburos desde C_{11} hasta C_{32} . Con 2.5 y 3 g de zeolita, la cantidad de hidrocarburos lineales retenida en la zeolita ZSM-5 disminuye, comparada con el experimento de 2 g de zeolita.

En la preparación de las columnas de elución para tratar el crudo con zeolita ZSM-5 (previo al fraccionamiento), al aumentar la cantidad de zeolita desde 0.5 a 1.5 g se observó la disminución de la cantidad de hidrocarburos lineales desde C_9 hasta C_{40} . Sin embargo desde C_{11} hasta C_{32} la adsorción de hidrocarburos lineales usando 2 y 2.5 g de zeolita ZSM-5 decreció respectivamente. Una explicación, radica en que el tiempo que se requiere para la elución en columna de los hidrocarburos no retenidos en la zeolita, aumenta con la cantidad de zeolita, por ejemplo, 72 h para la elución de la fracción saturada obtenida del crudo tratado previamente con zeolita ZSM-5 (2.5 g). De hecho, la tendencia para la adsorción de hidrocarburos lineales sobre la zeolita ZSM-5, es decreciente desde C_{11} hasta C_{32} , con el aumento de la cantidad de zeolita: 2, 2.5 y 3 g.

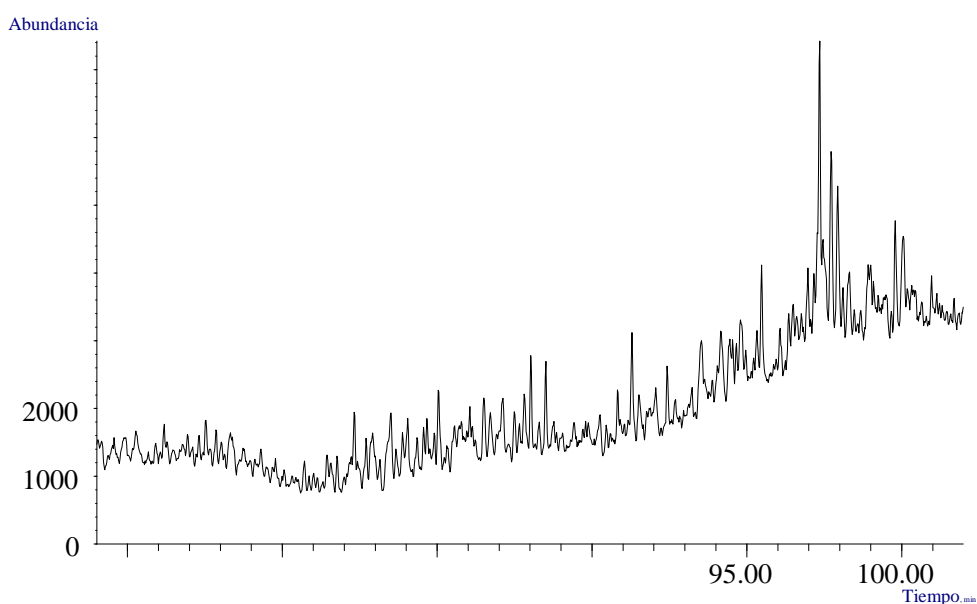
5.5. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS EN CRUDO

La selectividad en el proceso de fraccionamiento de crudo en columna de elución, se determinó con base en las relaciones moleculares calculadas con biomarcadores aromáticos. Con base en los espectros de masas de las familias de biomarcadores, a saber: metilnaftalenos, benzohopanos, fenantrenos, benzotiofenos, esteranos monoaromáticos y triaromáticos, fueron propuestas una serie de transiciones entre ion molecular - ion fragmento e ion fragmento-ion fragmento, con diferentes energías de cámara de colisiones activadas, que permitieran determinar biomarcadores aromáticos en muestras de crudo biodegradadas, y posteriormente cuantificar con el uso de estándares deuterados.

5.6. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-MS/SIM

Los iones con relación m/z mostrados en la **Tabla 7 (Sección 4.7.1)**, fueron usados para el análisis de biomarcadores aromáticos en la fracción correspondiente. Los perfiles de corrientes iónicas extraídas para cada familia de biomarcadores aromática se muestran en el **ANEXO 2**. Las corrientes iónicas son semejantes a los perfiles obtenidos en el método estandarizado por el ICP. Sin embargo, los esteranos monoaromáticos, no fueron detectados con la condición de elución: saturados (60 mL *n*-hexano), aromáticos (100 mL *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v), como se muestra en la **Figura 43**.

Figura 43. Corriente iónica extraída (m/z 253) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV).



El crudo C-GQ-1 (referencia), fue utilizado para establecer perfiles característicos de todas las familias de biomarcadores aromáticos. La elución de biomarcadores aromáticos fue probada con diferentes mezclas de elución, y mediante análisis

GC-QqQ-MS de las fracciones. En el **ANEXO 3**, se muestran las corrientes iónicas extraídas para las familias de biomarcadores aromáticos en una de las muestras de crudo con mayor nivel de biodegradación: C-MSTB.

La condición *n*-hexano-diclorometano (9:1 v/v), para la elución de biomarcadores aromáticos, permitió la obtención de esteranos monoaromáticos (*m/z* 253). En la **Tabla 15**, se muestra la comparación de las relaciones moleculares para biomarcadores aromáticos determinadas en el ICP con el método estandarizado de fraccionamiento con cromatografía líquida de presión media (MPLC), con respecto a la condición de fraccionamiento de crudo desarrollada en este proyecto. Los valores adimensionales calculados para cada una de las metodologías de fraccionamiento son semejantes, es decir, la condición de fraccionamiento en columna pequeña requirió menor cantidad de solventes.

Tabla 15. Comparación entre los parámetros obtenidos para los biomarcadores aromáticos obtenidos mediante GC-MS/SIM.

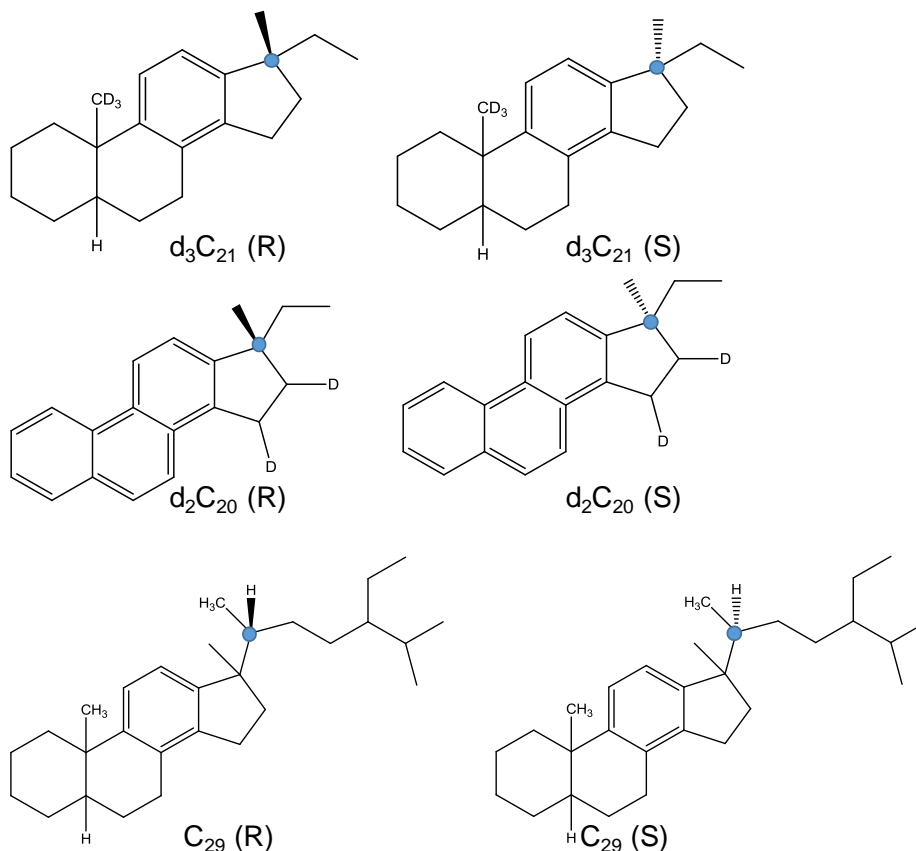
Parámetro	MPLC GC-MS/SIM (ICP)	Fraccionamiento en columna, GC-QqQ-MS (MRM)
(C20+C21)/S TAS	0,37	0,41
TAS #1 20/20+27	0,62	0,66
TAS #2 21/21+28	0,63	0,69
%26 TAS	25,15	28,28
%27 TAS	36,50	34,71
%28 TAS	38,34	37,01
C28/C26 20S TAS	1,63	1,41
C28/C27 20R TAS	1,05	1,07
Dia/Regular C27 MAS	1,22	1,31

%27 MAS	40,15	40,20
%28 MAS	39,99	40,33
%29 MAS	19,86	19,47
(C21+C22)/S MAS	0,73	0,70
TAS/(MAS+TAS)	0,79	0,79
TA28/(TA28+MA29)	0,17	0,21
Índice dinosteroide	0,47	0,45
C4/C3+C4 Mester	0,73	0,66
MPI-1	0,77	0,71
Rc(a) if Ro < 1.3 (Ro%)	0,83	0,80
Rc(b) if Ro > 1.3 (Ro%)	1,84	1,87
MPI-2	0,85	0,80
DNR-1	3,72	4,44
DNR-2	2,53	2,90
TNR1	1,16	1,11
TDE-1	3,66	4,06
TDE-2	0,48	0,44
MDR	2,75	3,00
Rm (Ro%)	0,74	0,75
MDR23	1,09	0,96
MDR1	0,71	0,68
DBT/Fenantreno	0,63	0,67

5.7. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS POR GC-QqQ-MS

5.7.1. Método DFT para predicción de orden de elución

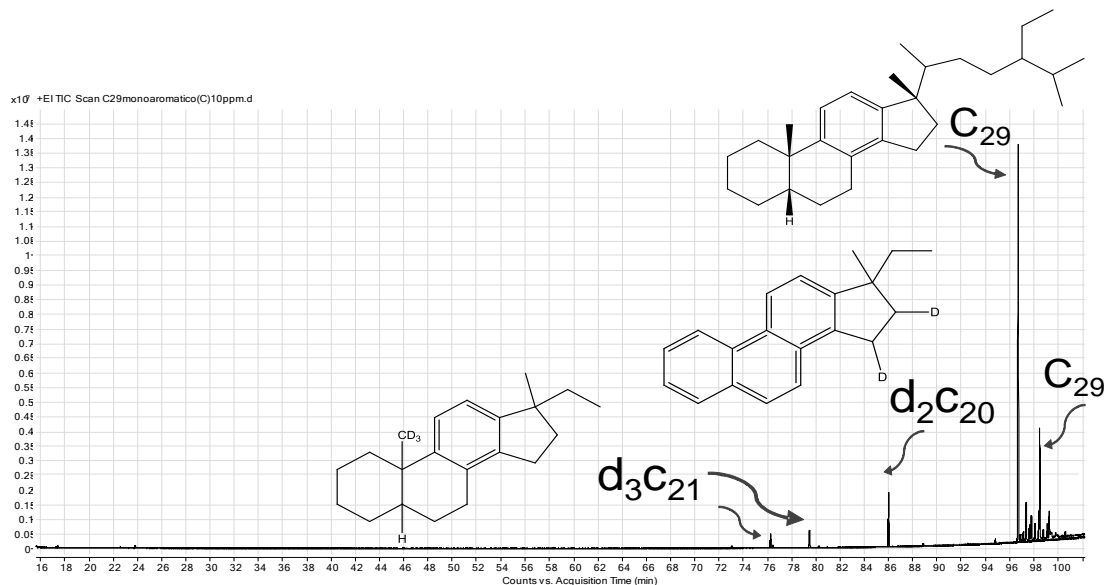
Figura 44. Estructura química de estándares de referencia certificados de esteranos monoaromáticos y triaromáticos.



Con el programa de cálculo *Gaussian 09* y método de teoría de funcional de carga (DFT), se realizó el cálculo del momento dipolar de los materiales de referencia certificados de biomarcadores aromáticos mostrados en las **Figura 44**. La corrida por GC-MS en modo de adquisición *full scan*, permitió determinar el orden de elución de los diferentes esteranos, según se muestra en la **Figura 45**. Sin embargo, en el caso de los esteranos monoaromáticos d_3C_{21} y C_{29} , se obtuvieron

dos picos cromatográficos, que corresponden a los estereoisómeros R y S; pero no hay certeza acerca del orden de elución.

Figura 45. Perfil cromatográfico obtenido para la superposición de corrientes iónicas totales obtenidas por GC-QqQ-MS (modo *full scan*) de esteranos aromáticos de referencia.

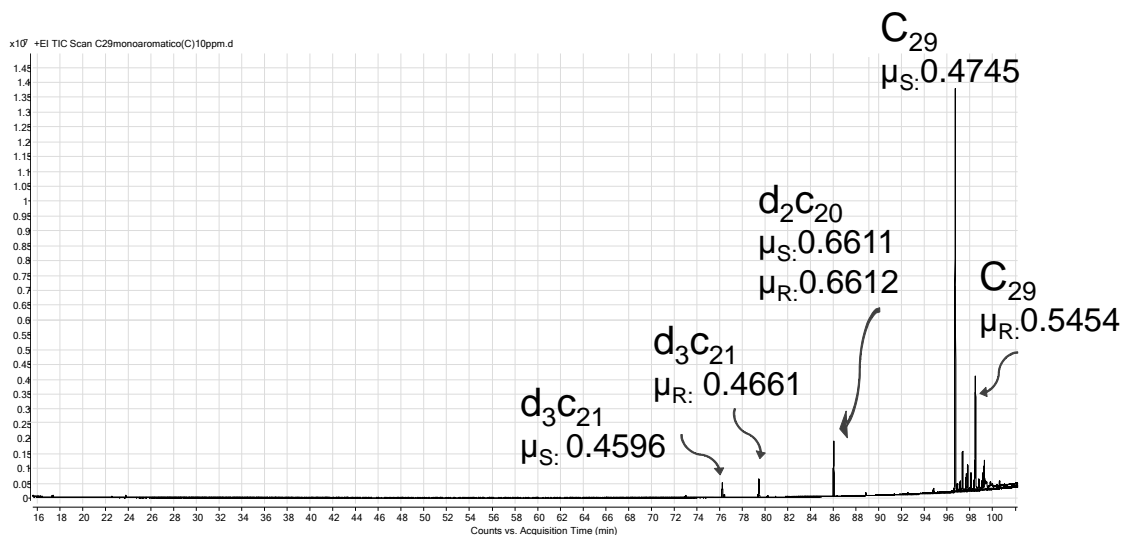


El cálculo de propiedades físicas o químicas de las moléculas puede ser disminuido por el uso de métodos semi-empíricos, que en menor tiempo optimizan la geometría de una estructura química. Las estructuras químicas de los esteranos mono- y triaromáticos de estándares de referencia, fueron pre-optimizadas con el método semi-empírico MP6. Posteriormente, con las coordenadas X,Y,Z de las estructuras pre-optimizadas, y usando el método computacional basado en la teoría del funcional de carga (DFT), con el funcional híbrido B3LYP, en estado basal con orbitales virtuales restringidos y un set de bases 6-31G(d,p), se obtuvieron los momentos dipolares para cada uno de los estereoisómeros. En la **Tabla 16**, se muestran los valores predichos con el método computacional DFT.

Tabla 16. Momentos dipolares calculados con el método computacional DFT para esteranos mono- y triaromáticos.

Compuesto	μ , Debye
d_3C_{21} (R) esterano monoaromático	0.4661
d_3C_{21} (S) esterano monoaromático	0.4596
d_2C_{20} (R) esterano triaromático	0.6612
d_2C_{20} (S) esterano triaromático	0.6611
C_{29} (R) esterano monoaromático	0.5454
C_{29} (S) esterano monoaromático	0.4745

Figura 46. Perfil cromatográfico obtenido para la superposición de corrientes iónicas totales obtenidas por GC-QqQ-MS (modo *full scan*) de esteranos aromáticos de referencia y momento dipolar calculado con el método DFT.



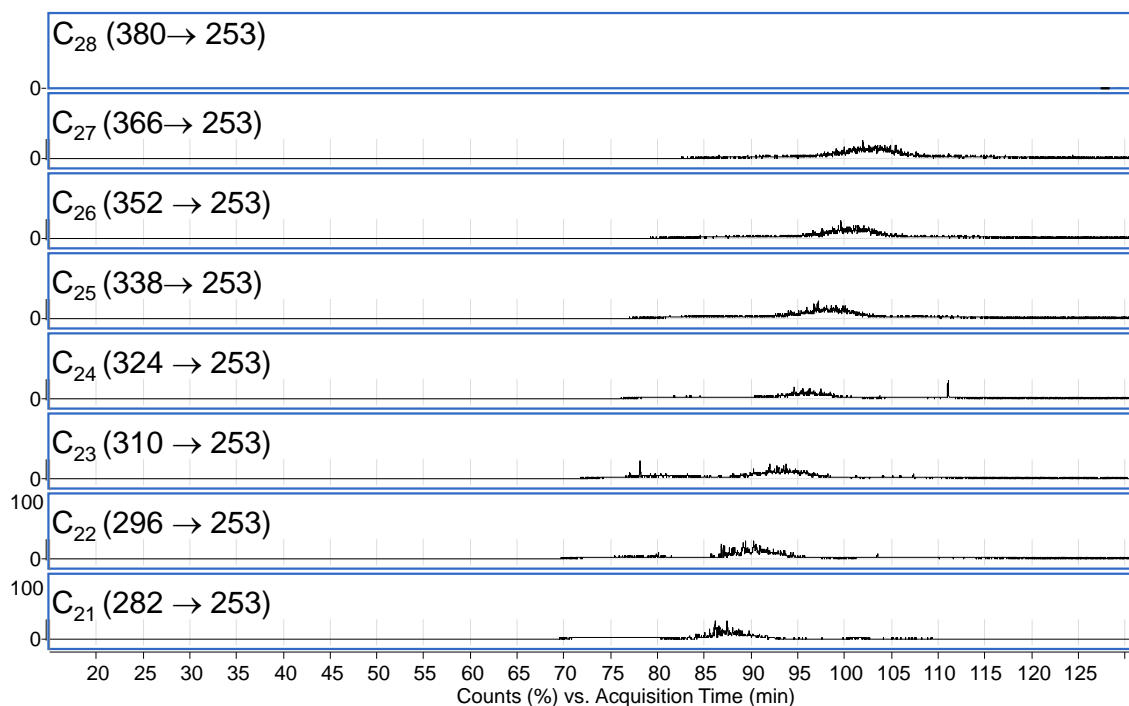
En la **Figura 46**, se muestra la correlación que existe entre el tiempo de retención para los isómeros S y R con el momento dipolar calculado (método computacional)

para cada uno de los esteranos. La columna cromatográfica utilizada en el análisis de los estándares, contiene 5 por ciento de divinilbenceno (DVB). El isómero que tendrá mayor retención en la columna cromatográfica, será aquel con el valor más alto de momento dipolar calculado. En los esteranos monoaromáticos, se encontró que los isómeros S presentaron valores más bajos de momento dipolar con respecto a los isómeros R, en cada caso, que infiere un orden de elución en la columna cromatográfica (DB5-MS). Sin embargo, los valores de momento dipolar determinados con los métodos computacionales (DFT) para el estero triaromático d_2C_{20} , R (0.6612) y S (0.6611), mostraron diferencia en la última cifra (diez milésima). De ahí que en el perfil cromatográfico (**Figura 46**) se observe un solo pico cromatográfico para el estero triaromático d_2C_{20} .

5.8. DETERMINACIÓN DE TRANSICIONES MRM PARA EL ANÁLISIS DE BIOMARCADORES AROMÁTICOS

5.8.1. Transiciones MRM. Los esteranos monoaromáticos, seguidos de los benzohopanos, guardan estrecha relación estructural con biomarcadores saturados. La cantidad de crudo o el volumen de elución fueron determinantes en la concentración de esteranos monoaromáticos determinada en cada condición de elución. En las **Figuras 47 y 48**, se muestra la comparación de los perfiles de esteranos monoaromáticos obtenidos mediante columna (ca. 15 g gel de sílice) eluidos con *n*-hexano: acetato de etilo 20:1 v/v (100 mL) partiendo de 500 mg de crudo, y esteranos monoaromáticos obtenidos en columna de elución (ca. 0.6 g gel de sílice) eluidos con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL) partiendo de 30 mg de crudo. Se observan algunas señales que no son características del perfil típico de esteranos monoaromáticos, es decir, la condición de elución de la fracción saturada (previa a aromáticos) los eluye o la mezcla de solventes y volumen son insuficientes.

Figura 47. Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 500 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (100 mL).



Las proporciones de la mezcla de elución (*n*-hexano:acetato de etilo) de biomarcadores aromáticos fueron utilizadas para la búsqueda de una condición que permitiera la obtención de todos los productos de degradación de materia orgánica en su proceso de diagénesis y catagénesis: específicamente, esteranos monoaromáticos. En las **Figuras 49-50**, se muestran los perfiles cromatográficos de esteranos monoaromáticos para las condiciones de elución *n*-hexano:acetato de etilo en relaciones 100:5 y 100:6 v/v, las fracciones obtenidas con relaciones 100:7, 100:8, 100:9 y 100:10, aumentaron la coloración, indicando mayor presencia de compuestos de alto peso molecular (eg. resinas) que contaminan el sistema cromatográfico. De acuerdo con los perfiles de esteranos monoaromáticos eluidos con proporciones 100:5 y 100:6 v/v de *n*-hexano:acetato de etilo, los esteranos monoaromáticos retenidos en la gel de sílice, eluyeron con la fracción

saturada. Así, la elución de saturados debe ser controlada, y la elución de biomarcadores aromáticos con una mezcla de solventes y cantidad adecuada, que permita la obtención de los compuestos de interés, sin contaminación por la siguiente fracción: resinas.

Figura 48. Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL).

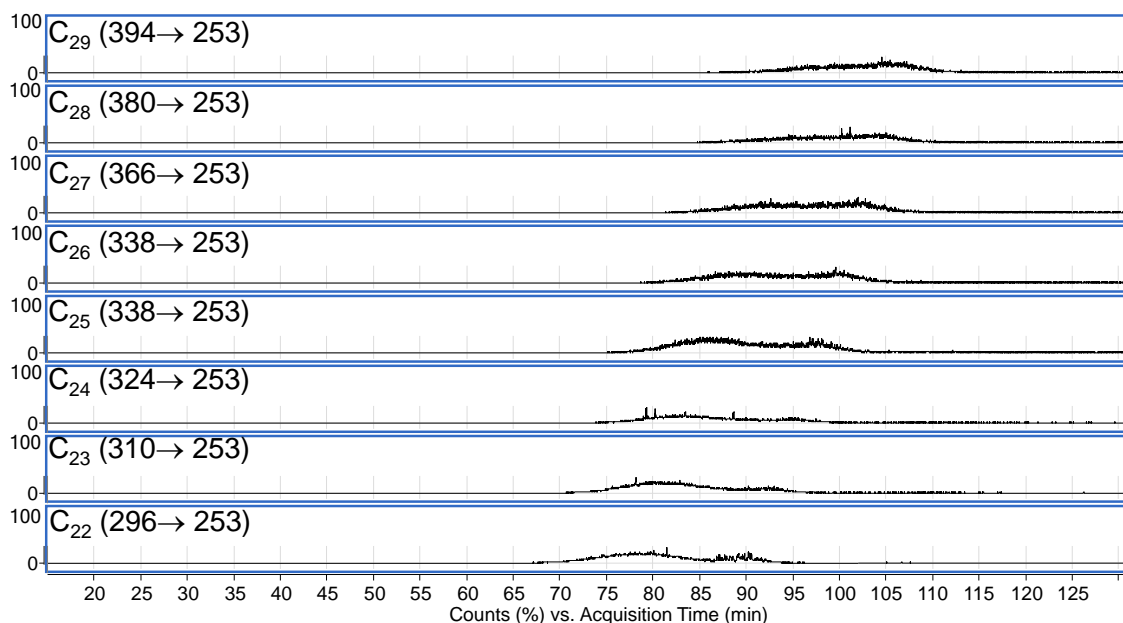


Figura 49. Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 100:5 v/v (4 mL). 1. C₂₉. 2. C₂₈. 3. C₂₇.

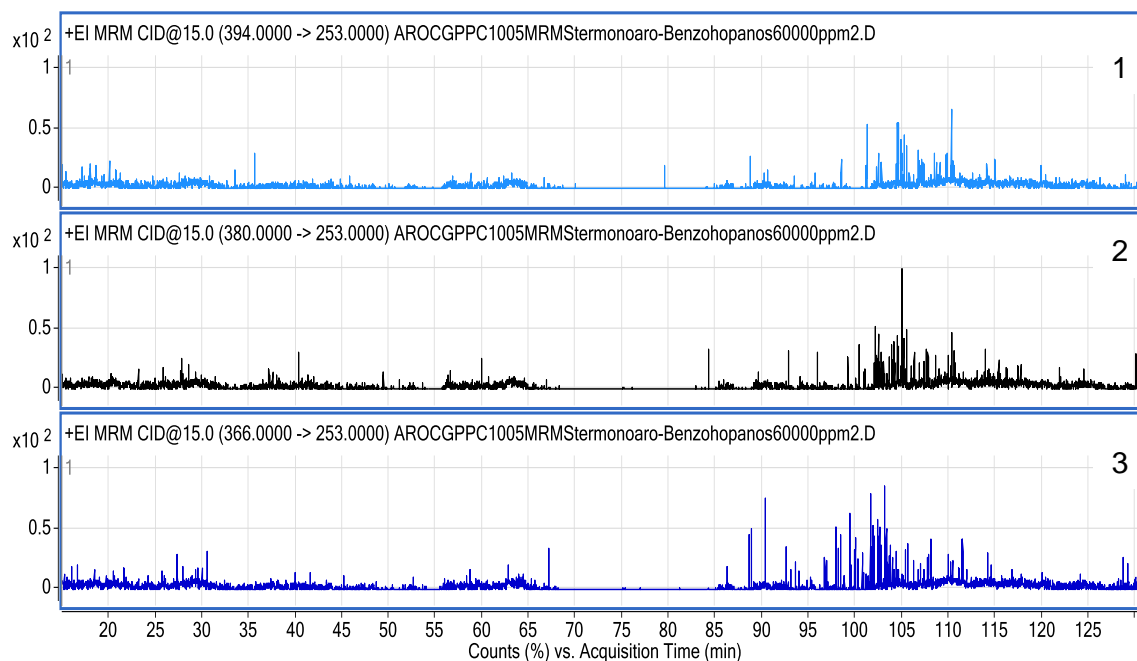
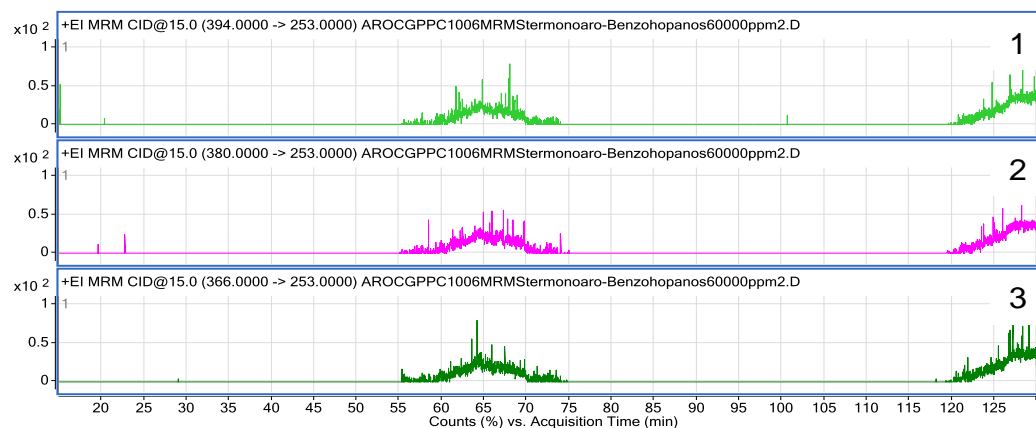
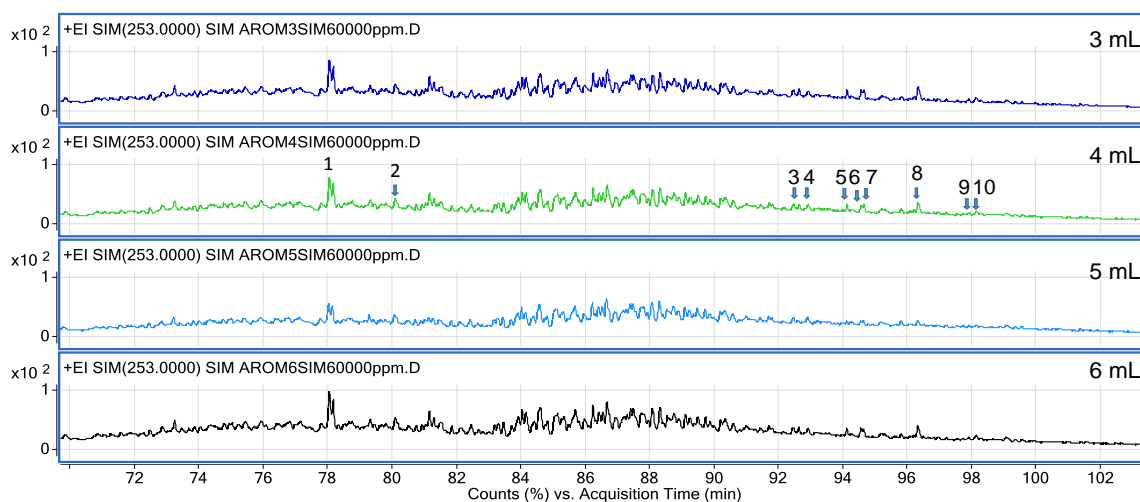


Figura 50. Fragmentogramas de masas (MRM) $M^+ \rightarrow F^+$ de esteranos monoaromáticos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 100:6 v/v (4 mL). 1. C₂₉. 2. C₂₈. 3. C₂₇.



La mezcla *n*-hexano:diclorometano fue usada para obtener una fracción aromática que incluyera los esteranos monoaromáticos. Se probaron diferentes proporciones (9:1, 8:2, 7:3 y 6:4 v/v); las fracciones obtenidas en su orden, aumentaron la coloración. En el sistema cromatográfico fue inyectada la fracción obtenida con la proporción 9:1. En la **Figura 51**, se muestran los perfiles obtenidos para los principales esteranos monoaromáticos.

Figura 51. Fragmentograma de masas de esteranos monoaromáticos (*m/z* 253) de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:diclorometano 9:1 v/v (3, 4, 5 y 6 mL). 1. MA21 2. MA22. 3. MAB27S. 4. MAD27S. 5. MADB27R. 6. MAA27S. 7. MADB28S. 8. MADB28R. 9. MAA29S. 10. MADB29R. 11. MAA29R.



El análisis por espectrometría de masas en modo de adquisición MRM, permitió establecer que la condición *n*-hexano:diclorometano 9:1 v/v con un volumen entre 4 y 6 mL, eluye los esteranos monoaromáticos. Sin embargo, es difícil distinguir los esteranos con las transiciones específicas en función del número de átomos de carbono. Por ende, el estudio se enfocó en una transición (MRM) que permitiera

aumentar la relación señal-ruido, mediante el estudio de transiciones con esteranos monoaromáticos y triaromáticos deuterados.

En el análisis de metilbenzotiofenos, se propuso una transición $M^+ \rightarrow F^+$ (198 \rightarrow 183), correspondiente a la pérdida del radical metilo ($CH_3\bullet$), que se muestra en la **Figura 52**, en el perfil se observan varias señales, en que difícilmente se puede distinguir a los metilbenzotiofenos. Sin embargo, la pérdida del radical $HS\bullet$ (33 unidades), en algunas moléculas ha sido descrita, con la transición $M^+ \rightarrow F^+$ (198 \rightarrow 165); la especificidad de la transición es alta. Se obtuvieron tres picos cromatográficos completamente resueltos, que corresponden en su orden a: DBT4M (4-metildibenzotiofeno), DBT23M (2+3)-metildibenzotiofenos y DBT1M (1-metildibenzotiofeno).

Figura 52. Fragmentograma de masas (MRM) de benzotiofenos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de ca. 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL). 1. DBT4M. 2. DBT23M. 3. DBT1M.

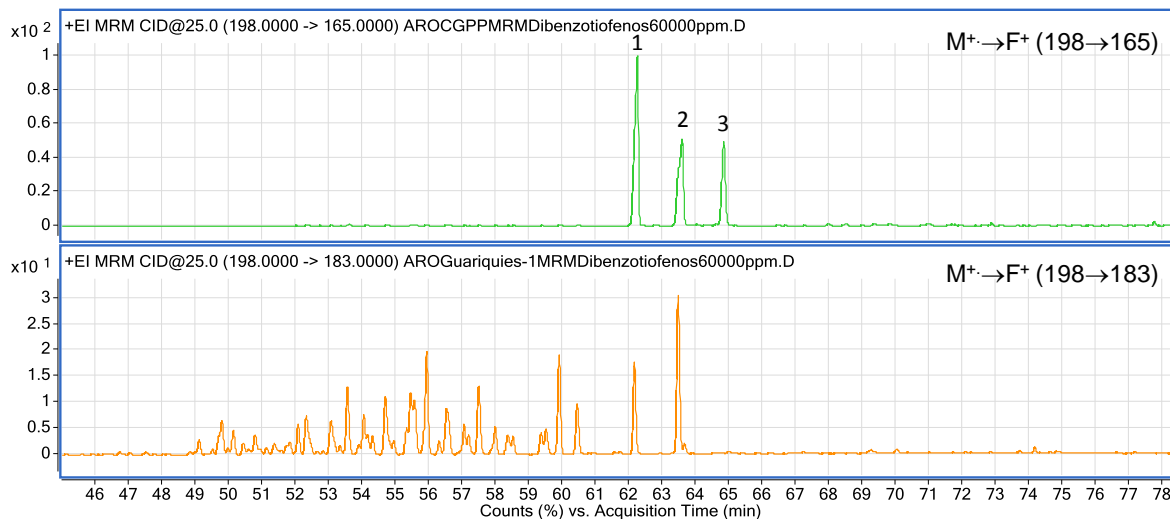
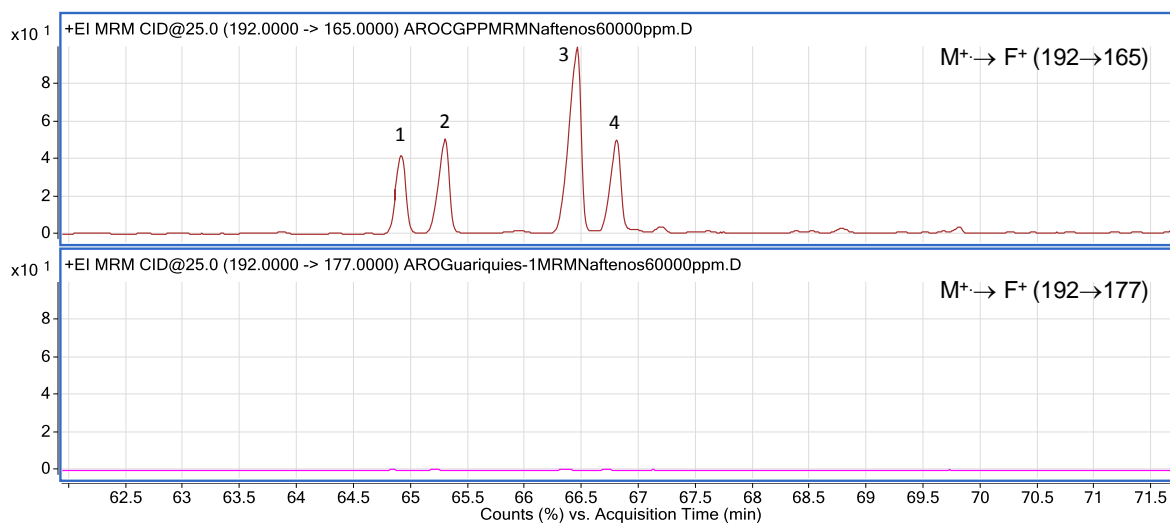


Figura 53. Fragmentograma de masas (MRM) de metilfenantrenos de la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1 (EI, 70 eV), obtenida mediante fraccionamiento de ca. 30 mg de crudo y elución con *n*-hexano:acetato de etilo 20:1 v/v (4 mL). 1. 3-Metilfenantreno. 2. 2-Metilfenantreno. 3. 9-Metilfenantreno. 4. 1-Metilfenantreno.



En la **Figura 53**, se muestra la corriente iónica obtenida para metilfenantrenos, con dos transiciones diferentes. La transición $M^+ \rightarrow F^+$ (192 \rightarrow 165), muestra mayor abundancia para los picos cromatográficos, debido a su intensidad en el espectro de masas de los metilfenantrenos. Sin embargo, el análisis con la transición $M^+ \rightarrow F^+$ (192 \rightarrow 177), que corresponde a pérdida de radical metilo (CH_3^\bullet), es de menor intensidad comparada con la transición con pérdida de un fragmento de 27 unidades a partir del ion molecular. Por consiguiente, con la transición $M^+ \rightarrow F^+$ (192 \rightarrow 165), es posible la detección de concentraciones más bajas de metilfenantrenos en muestras de crudo biodegradado.

En el análisis de la fracción aromática, se realizó el análisis de los materiales de referencia certificados de los compuestos mostrados en la **Tabla 17**, de *Chiron AS*. Los compuestos C_{21} y C_{20} , poseen 3 y 2 átomos de deuterio en su estructura molecular, respectivamente. En modo de adquisición MRM existen transiciones

específicas para las masas moleculares de estos compuestos, y no coinciden con los biomarcadores aromáticos del crudo. Por lo tanto, se usaron para establecer las condiciones de análisis por GC-QqQ-MS (MRM) y estimar la concentración de los biomarcadores aromáticos en las muestras de crudo.

Tabla 17. Material de referencia certificado para análisis de biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS.

Referencia	Compuesto	Pureza, %	Lote
0983.21-10-IO	d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H))	87	1378
0984.20-10-IO	d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático	>98.5	1379
0860.29-100-IO	C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃))	52.6 y 22.5 (*)	465

*Corresponde a la mezcla de los respectivos isómeros.

En la determinación de la transición para el modo MRM, fue necesario el estudio de los estándares aromáticos en modo de adquisición *full scan* y SIM. En la **Figura 54**, se muestra el perfil cromatográfico obtenido en modo *full scan* por GC-MS. El análisis de los respectivos espectros de masas, permite sugerir algunos iones para el análisis por el modo de adquisición SIM. Los espectros de masas se observan en las **Figuras 55-56**.

Figura 54. Corriente iónica total (TIC) de estándares de aromáticos obtenida por GC-MS, modo de adquisición: *full scan*, rango de masas: 50-550.

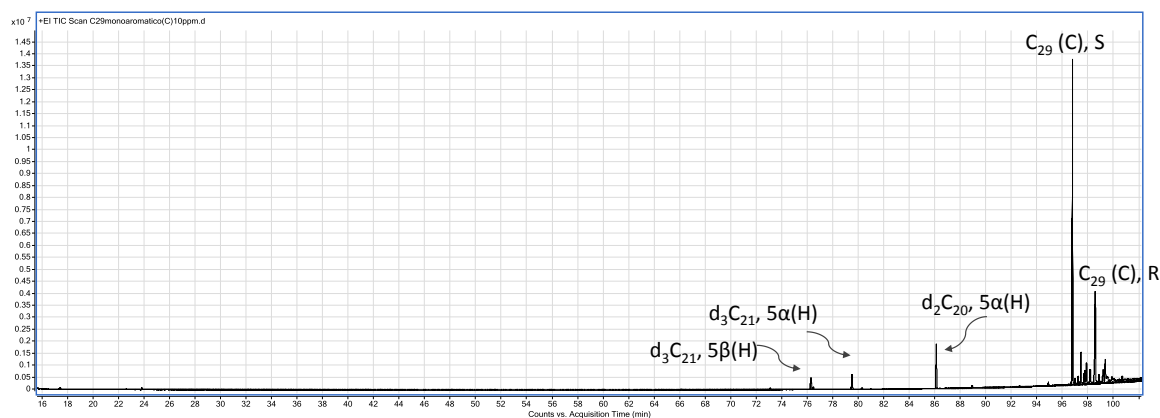


Figura 55. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: *full scan*, rango de masas: 50-550, C₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH₃)/5α(H)/10α(CH₃)).

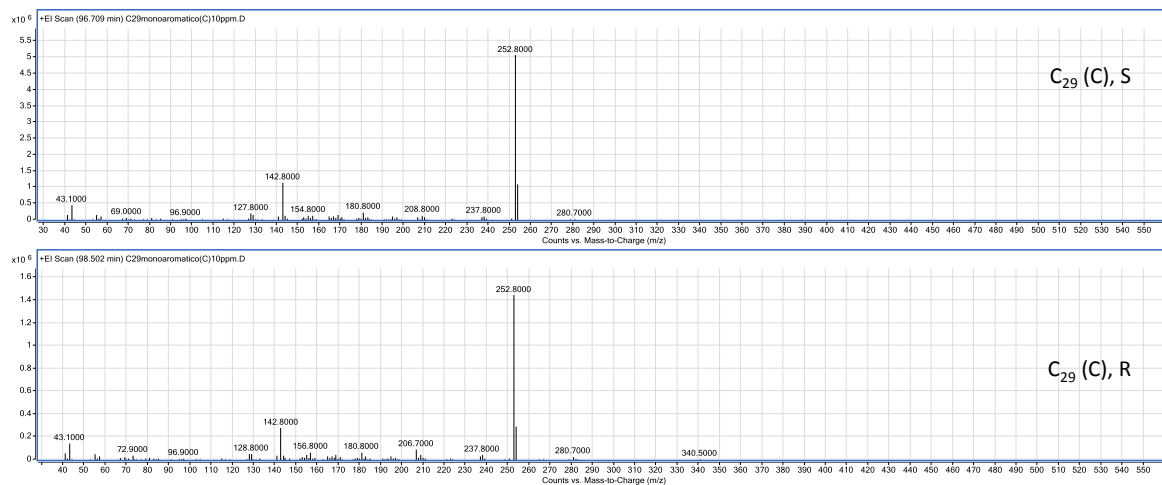


Figura 56. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: *full scan*, rango de masas: 50-550. d_2C_{20} Esterano triaromático.

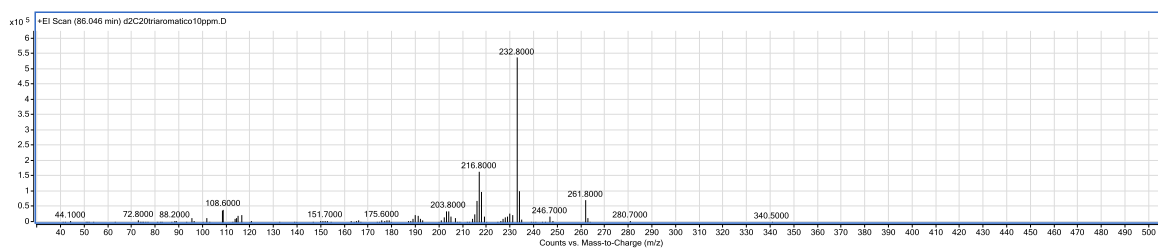
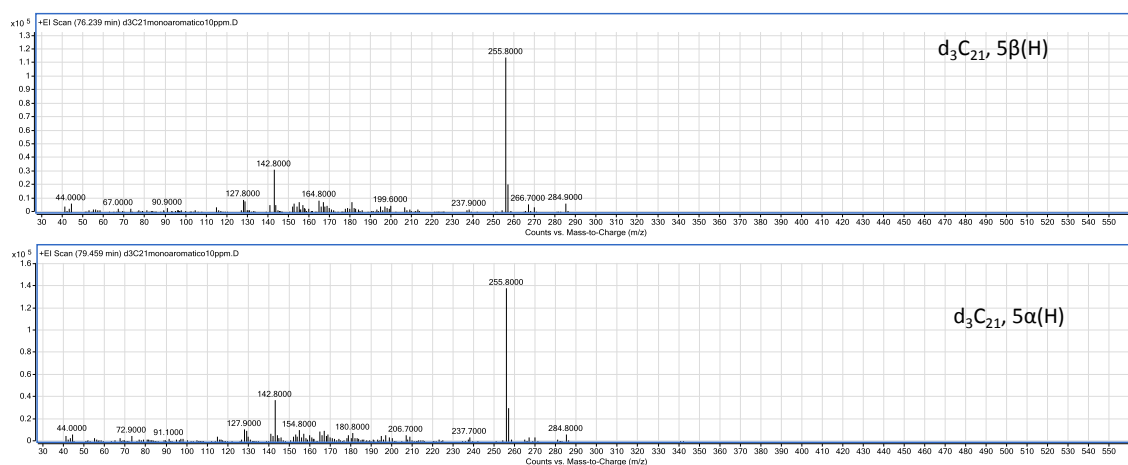


Figura 57. Espectros de masas obtenidos por GC-MS, modo de adquisición: *full scan*, rango de masas: 50-550 d_3C_{21} Esterano monoaromático ($5\alpha(H)/5\beta(H)$).



La sensibilidad aumentó en el análisis de los patrones de referencia certificados utilizando el modo de adquisición SIM. Los perfiles cromatográficos, para el estándar C29 (C) y los respectivos compuestos deuterados se muestran en las **Figuras 58-60**. El listado de iones utilizados para el modo SIM, fue extraído del espectro de masas obtenido a 70 eV, de cada uno de los patrones de referencia certificados, como se muestra en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Iones usados en el análisis de MRC de aromáticos en el modo de adquisición SIM.

Compuesto	Iones SIM, <i>m/z</i>
d_3C_{21} Esterano monoaromático (5 α (H)/5 β (H))	129, 143, 155, 200, 256, 285
d_2C_{20} Esterano triaromático	109, 152, 204, 217, 247, 233, 262
C_{29} Esterano monoaromático (C) (5 β (H)/10 β (CH ₃)/5 α (H)/10 α (CH ₃))	128, 143, 181, 209, 238, 253

Figura 58. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición *full scan* y SIM, para C_{29} esterano monoaromático (C) (5 β (H)/10 β (CH₃)/5 α (H)/10 α (CH₃)).

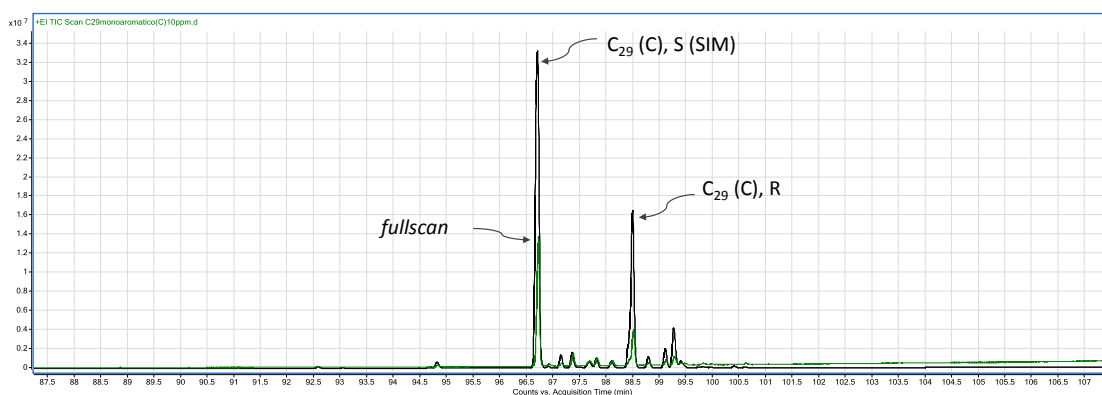


Figura 59. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición *full scan* y SIM, para d_2C_{20} esterano triaromático.

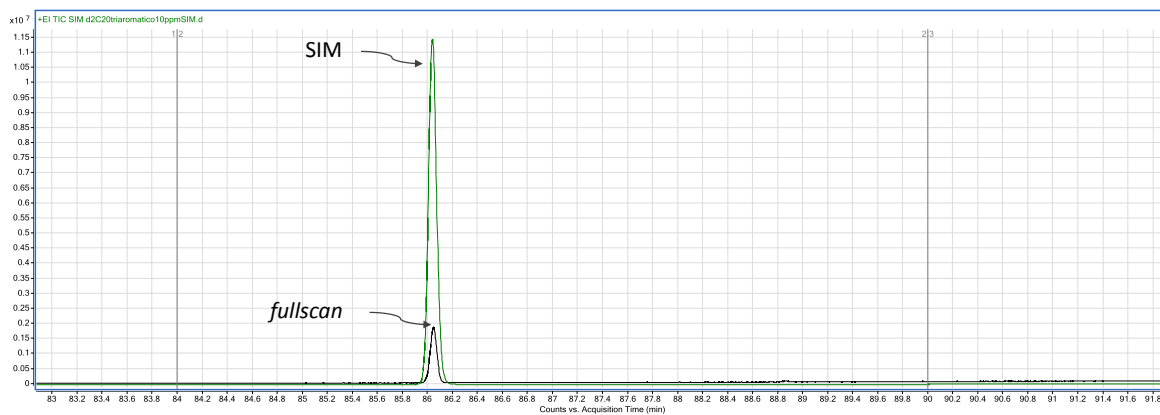


Figura 60. Comparación de los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-MS en los modos de adquisición *full scan* y SIM, para d_3C_{21} Esterano monoaromático ($5\alpha(H)/5\beta(H)$).

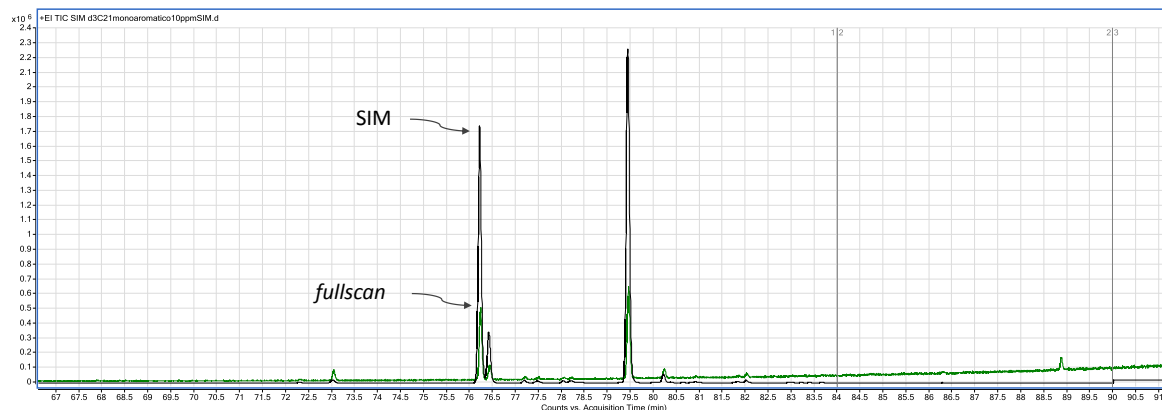
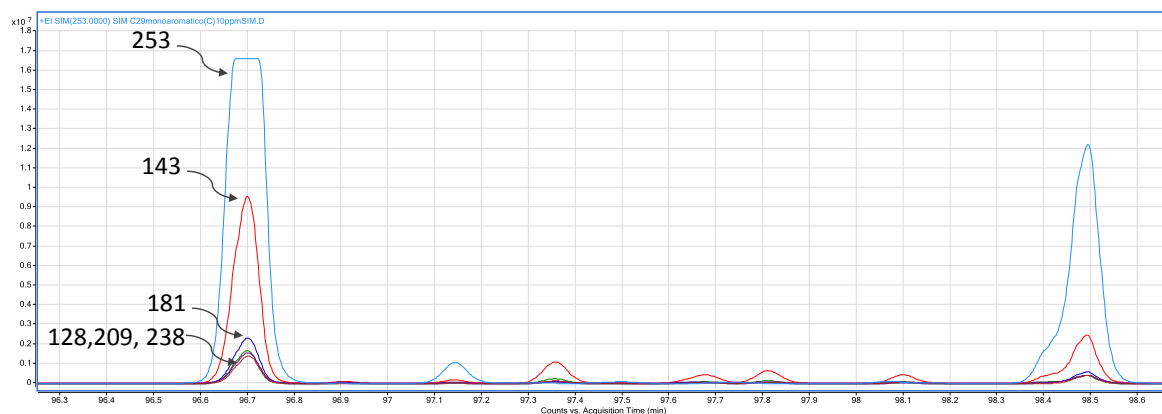


Figura 61. Corrientes iónicas extraídas con diferentes m/z para el compuesto de referencia C_{29} Esterano monoaromático (C) ($5\beta(H)/10\beta(CH_3)/5\alpha(H)/10\alpha(CH_3)$) (EI, 70 eV).



En las **Figuras 61-63**, se muestra la abundancia de pico cromatográfico para cada uno de los materiales de referencia certificados, según el ion seleccionado. Con las relaciones m/z 253, 233 y 256, se obtiene la mayor área para los compuestos, C_{29} esterano monoaromático (C) ($5\beta(H)/10\beta(CH_3)/5\alpha(H)/10\alpha(CH_3)$), d_2C_{20} esterano triaromático y d_3C_{21} esterano monoaromático ($5\alpha(H)/5\beta(H)$), respectivamente. Cada uno de los iones seleccionados en el modo SIM,

corresponde al ion pico de base en el espectro de masas de cada sustancia de referencia.

Figura 62. Corrientes iónicas extraídas con diferentes m/z para el compuesto de referencia d_2C_{20} Esterano triaromático (EI, 70 eV).

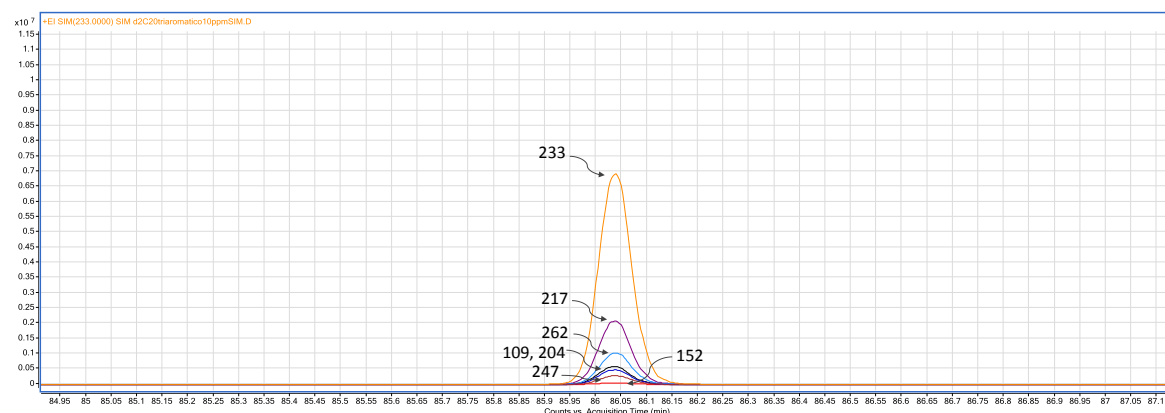
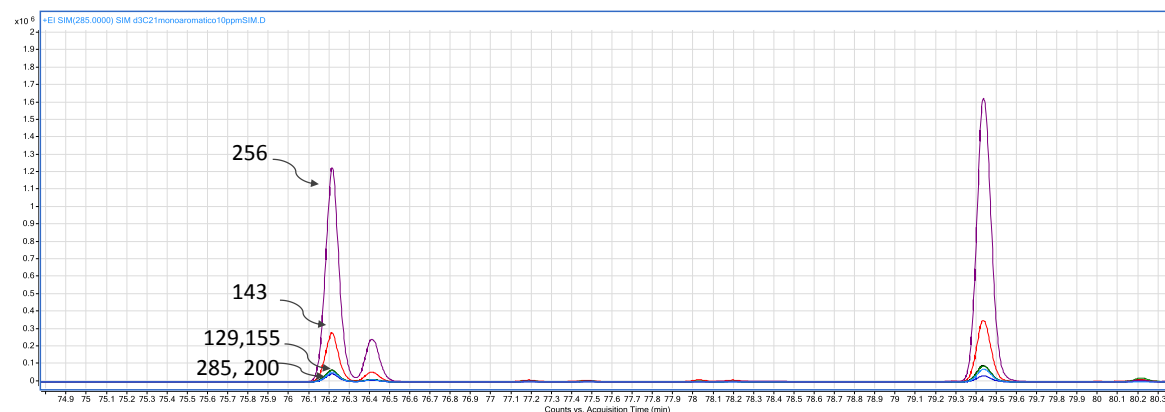


Figura 63. Corrientes iónicas extraídas con diferentes m/z para el compuesto de referencia d_3C_{21} Esterano monoaromático ($5\alpha(H)/5\beta(H)$) (EI, 70 eV).

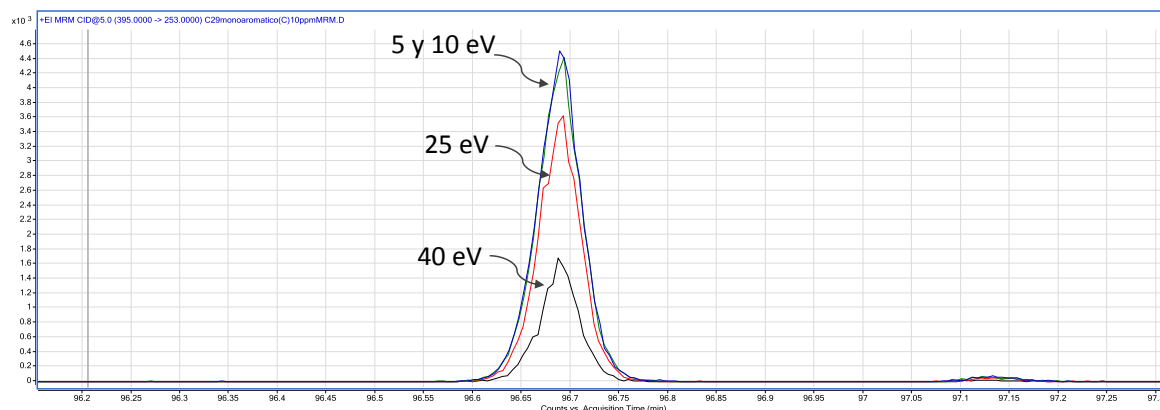


La selección de las transiciones para los materiales de referencia de aromáticos, se realizó con base en la abundancia de los picos cromatográficos obtenidos por GC-MS/SIM, las transiciones propuestas para el análisis por el modo de adquisición MRM se muestran en el **Tabla 19**.

Tabla 19. Transiciones y energías de cámara de colisiones activadas para el análisis de estándares aromáticos en el modo de adquisición MRM.

Compuesto	Ion precursor, m/z	Ion producto, m/z	Energía, eV
d_3C_{21} Esterano monoaromático (5 α (H)/5 β (H))	285	256	
d_2C_{20} Esterano triaromático	262	233	5,10,25 y 40
C_{29} Esterano monoaromático (C) (5 β (H)/10 β (CH ₃)/5 α (H)/10 α (CH ₃))	394	253	

Figura 64. Fragmentogramas de masas (MRM, 394→253) obtenidos para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia C_{29} esterano monoaromático (C) (5 β (H)/10 β (CH₃)/5 α (H)/10 α (CH₃)) (EI, 70 eV).



En las **Figuras 64-66**, se muestra el comportamiento de cada una de las transiciones probadas en el modo de adquisición MRM, a diferentes energías de la cámara de colisiones activadas. En la **Tabla 20**, se muestra la energía con que se obtuvo la mayor área de pico cromatográfico. En general, los esteranos obtenidos en la fracción saturada pueden ser analizados con una energía en la cámara de colisiones activadas de 5 eV. Los esteranos con el anillo C aromático, presentan un comportamiento similar, con 5 eV. Se obtuvo la mejor respuesta para d_3C_{21} y

C₂₉ Esterano monoaromático (C). Sin embargo, la estabilidad conferida por tres anillos aromáticos condensados, requiere 10 eV, para generar la interrupción de la aromaticidad y romper el anillo que permita obtener el fragmento m/z 233, de la molécula d₂C₂₀.

Figura 65. Fragmentogramas de masas (MRM, 262→233) obtenidos para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia d₂C₂₀ esterano triaromático (EI, 70 eV).

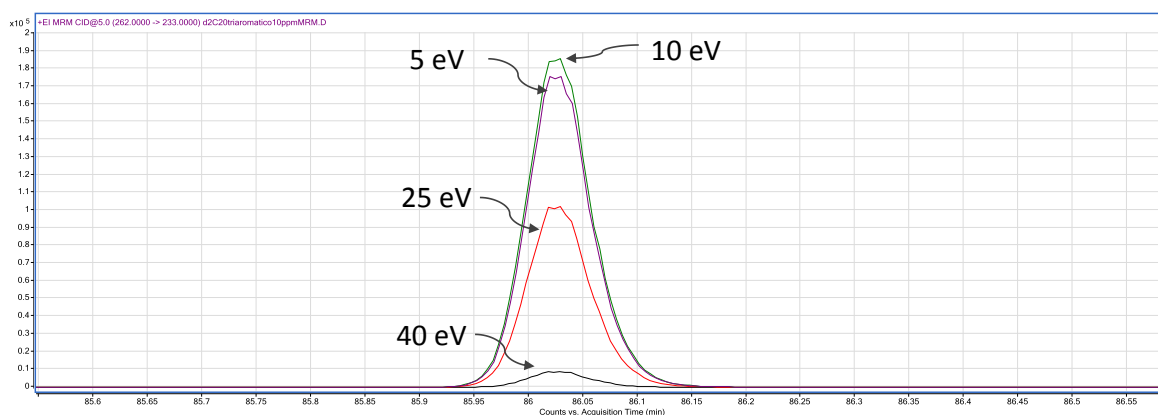


Figura 66. Fragmentogramas de masas (MRM, 285→256) obtenido para varias energías de la cámara de colisiones por GC-QqQ para el compuesto de referencia d₃C₂₁ esterano monoaromático (5 α (H)/5 β (H)) (EI, 70 eV).

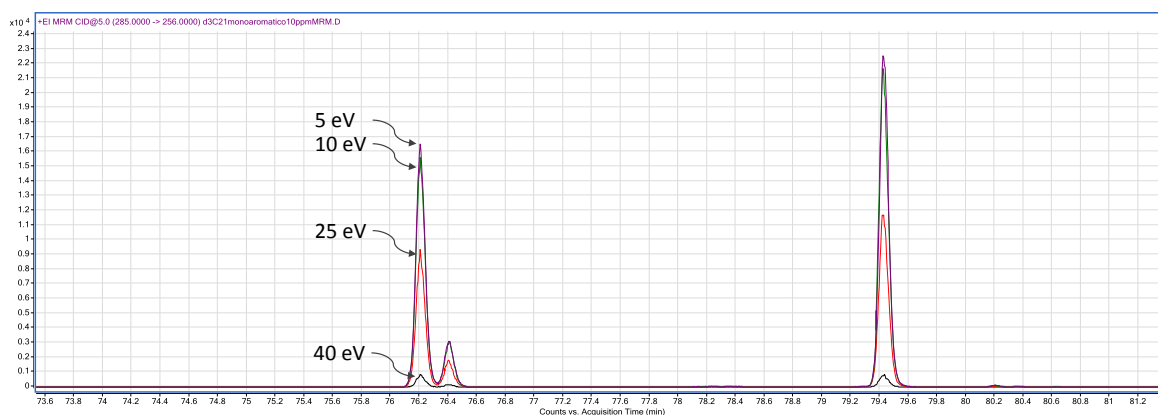


Tabla 20. Energía de cámara de colisiones activadas para el análisis de estándares aromáticos por GC-QqQ-MS en modo de adquisición MRM.

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Energía, eV
d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H))	285	256	5
d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático	262	233	10
C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH3)/5α(H)/10α(CH3))	394	253	5

Se realizó un estudio entre las posibles transiciones del ion precursor y un ion fragmento. Adicionalmente, se monitorearon las transiciones entre otros fragmentos y sus respectivos productos de fragmentación, usando una energía de cámara de colisiones activadas de 10 eV. La selección de las transiciones para los materiales de referencia de aromáticos, se realizó con base en la abundancia (área) de los picos cromatográficos obtenidos por GC-MS (modo MRM), para las transiciones propuestas.

Figura 67. Áreas cromatográficas de esterano C₂₉ monoaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre M⁺→F⁺ y F⁺→F⁺.

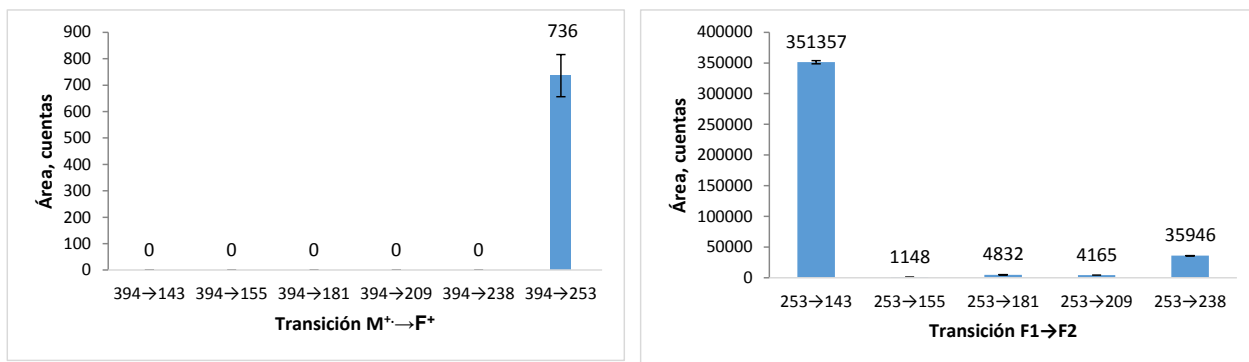


Figura 68. Áreas cromatográficas de d_2C_{20} esterano triaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre $M^+ \rightarrow F^+$ y $F^+ \rightarrow F^+$.

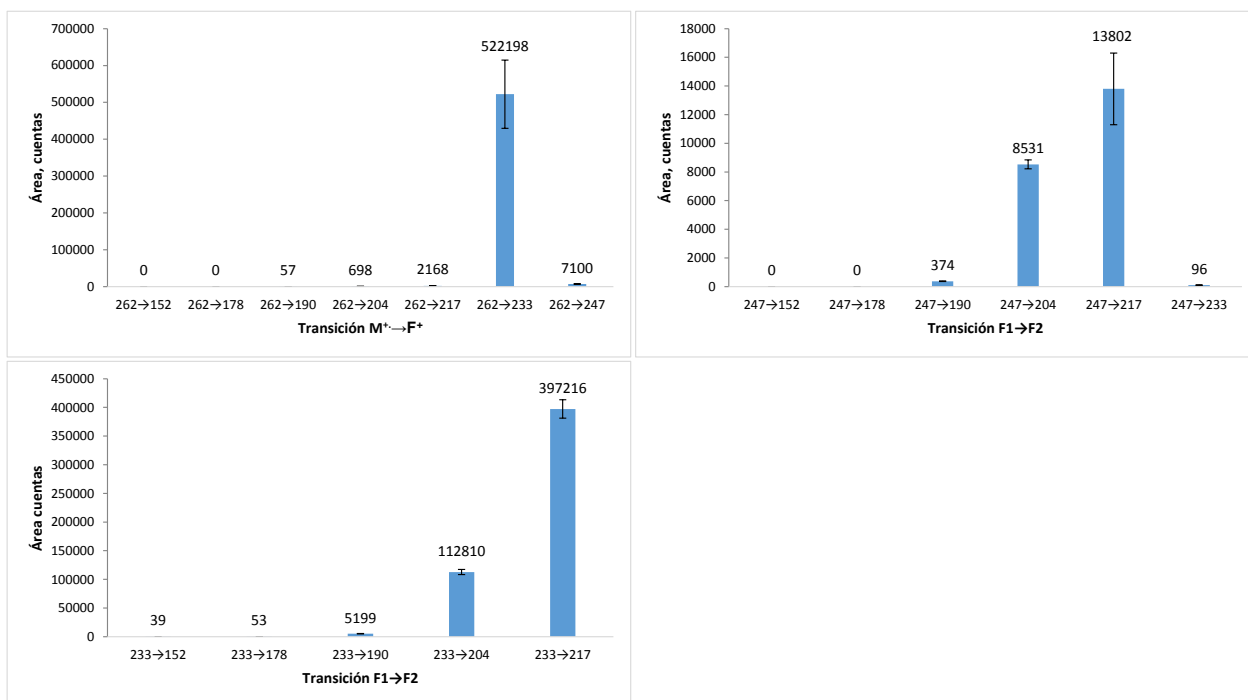
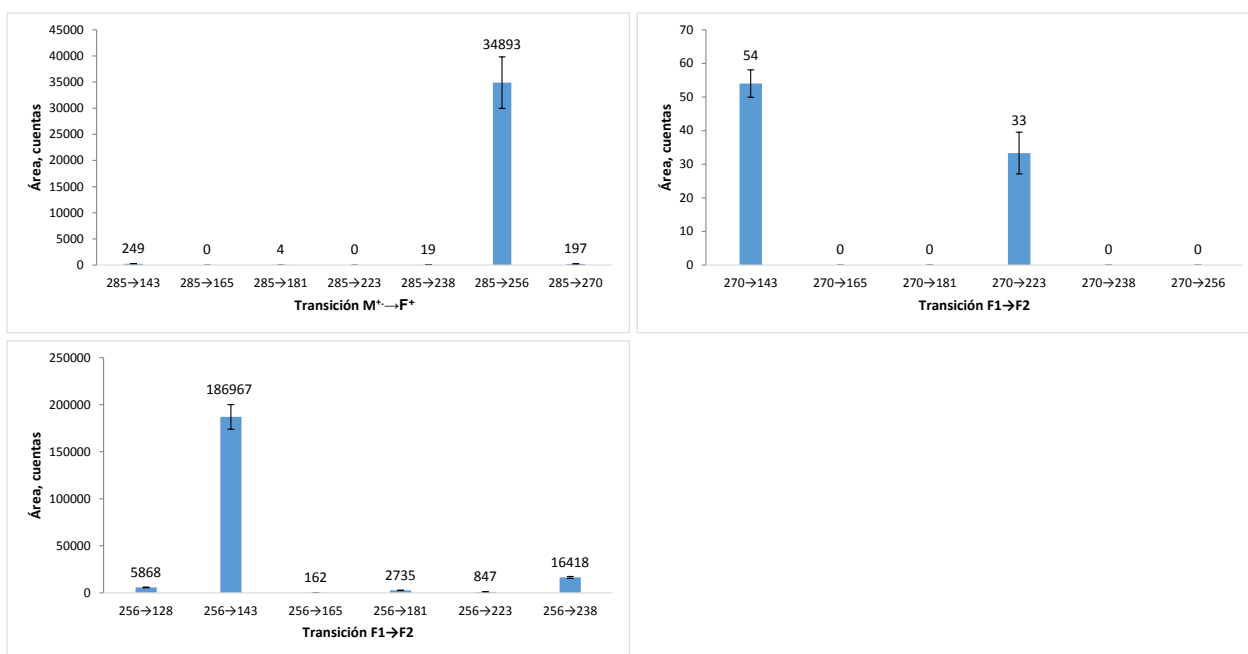


Figura 69. Áreas cromatográficas de d_3C_{21} esterano monoaromático determinadas por GC-QqQ-MS (modo MRM) con transiciones entre $M^+ \rightarrow F^+$ y $F^+ \rightarrow F^+$.



Con las transiciones específicas para cada estándar aromático, se desarrolló un experimento con energía de cámara de colisiones activadas entre 0- 42.5 eV, con paso de 2.5 eV (**Tabla 21**).

Tabla 21. Condiciones de análisis de estándares aromáticos para estudio de energía de cámara de colisiones activadas mediante GC-QqQ-MS.

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Energía, eV
d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H))	256	143	0 - 42.5 (cada 2.5)
d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático	262	233	
C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃))	253	143	

En la **Figura 70**, se observa el comportamiento del área de los biomarcadores aromáticos en función de la energía de la cámara de colisiones activadas. Para los compuestos monoaromáticos, C₂₁ o C₂₉, la transición entre el ion molecular y un fragmento (m/z 253), presenta una respuesta más baja, comparada con la transición (253→143). Con respecto, al esterano triaromático d₂C₂₀, la transición ($M^+ \rightarrow F^+$), mejora la sensibilidad, a una energía de cámara de colisiones activadas de 10 eV. Sin embargo, la estabilidad conferida por tres anillos aromáticos condensados, requiere 10 eV, para generar la interrupción de la aromaticidad y romper el anillo que permita obtener el fragmento m/z 233, de la molécula d₂C₂₀. Pero cuando en la transición el ion precursor es el ion pico de base en el espectro, se requieren 7.5 eV, adicionales, en la comparación de estándares deuterados mono- y triaromáticos. En resumen, la **Tabla 22**, muestra las mejores condiciones para el análisis de estándares de biomarcadores mono- y triaromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM).

Figura 70. Efecto de la energía de la cámara de colisiones activadas sobre el área cromatográfica y relación S/N por GC-QqQ-MS en el modo de adquisición MRM. 1. Esterano C29 monoaromático. 2. d2C20 esterano triaromático. 3. d3C21 esterano monoaromático.

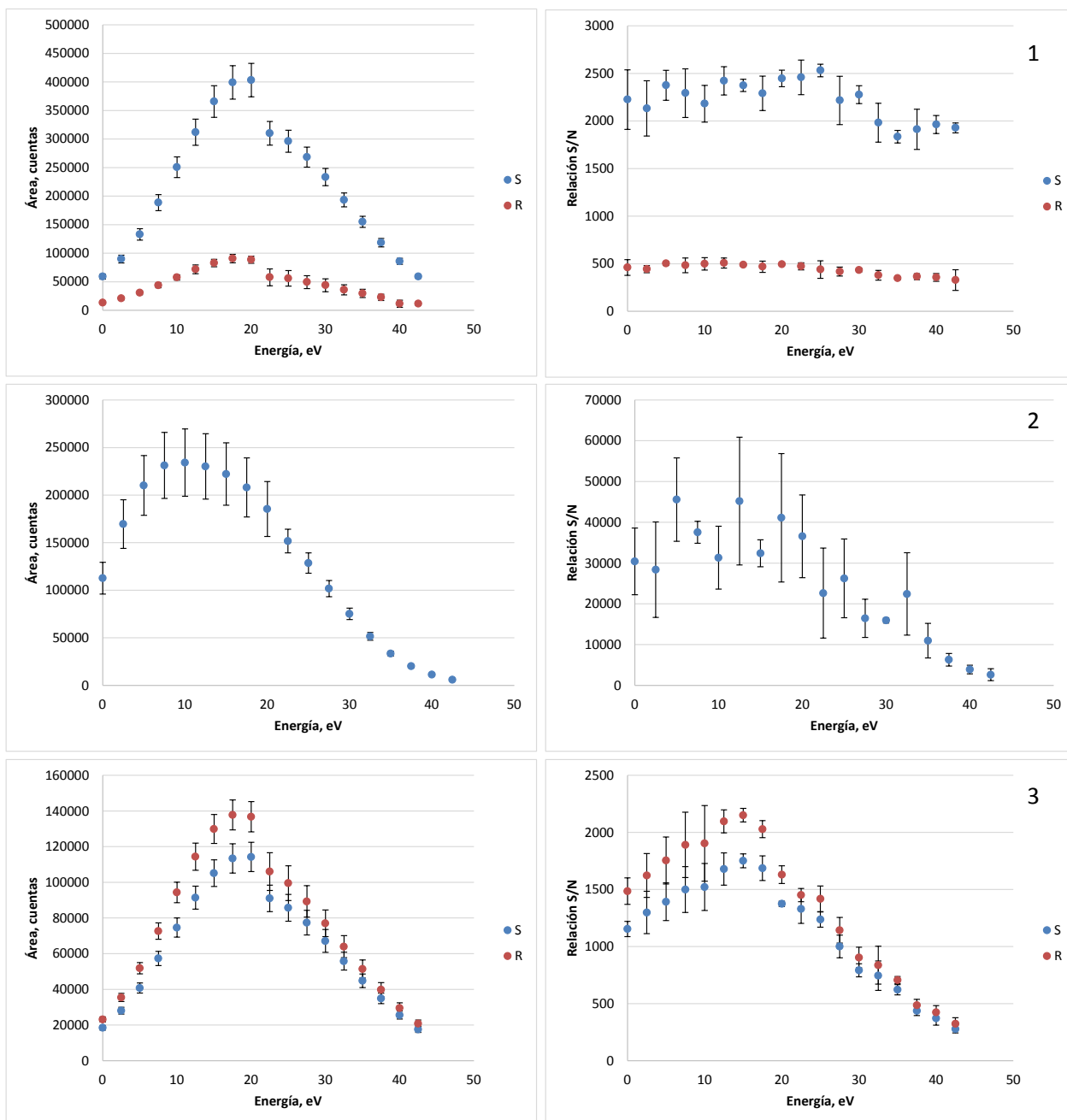
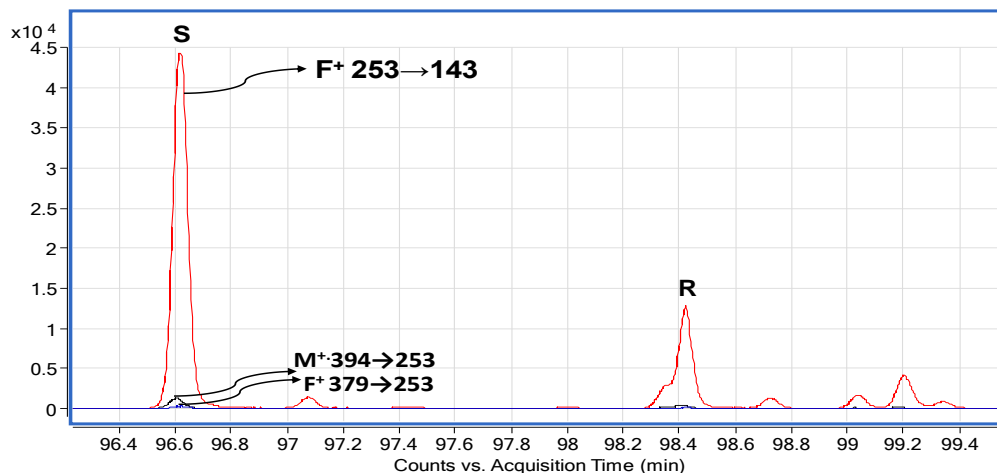


Tabla 22. Condiciones para el análisis de esteranos mono- y triaromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM).

Compuesto	Ion precursor	Ion producto	Energía, eV
d ₃ C ₂₁ Esterano monoaromático (5α(H)/5β(H))	256	143	17.5
d ₂ C ₂₀ Esterano triaromático	262	233	10
C ₂₉ Esterano monoaromático (C) (5β(H)/10β(CH ₃)/5α(H)/10α(CH ₃))	253	143	20

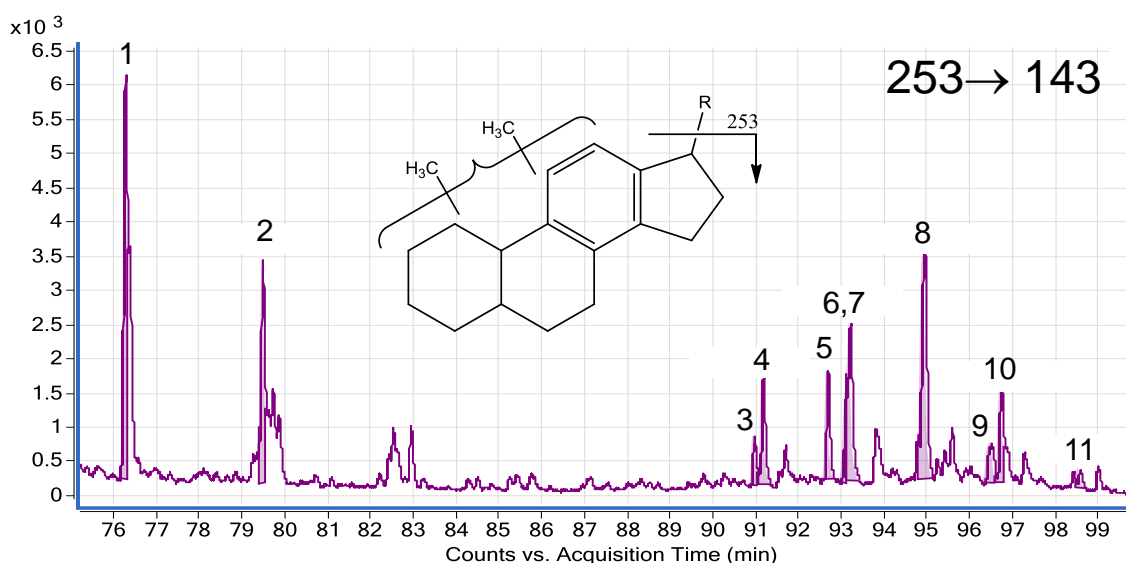
Con base en el estudio de transiciones y energía de cámara de colisiones activadas para estándares aromáticos, el análisis de esteranos monoaromáticos, triaromáticos y metiltriaromáticos, se formuló mediante el estudio de algunas transiciones que permitieran aumentar la relación señal-ruido, y su mejor determinación en muestras en las cuales su concentración sea baja.

Figura 71. Superposición de fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis del esterano monoaromático (C₂₉) con diferentes transiciones, (EI, 70 eV).



En la **Figura 71**, se muestra el fragmentograma de masas de los esteranos monoaromáticos en crudo obtenido por GC-QqQ-MS con modo de adquisición MRM, la mayor abundancia se logró con la transición 253→143, para ambos isómeros, S y R. En la **Figura 72**, se muestra el perfil obtenido para la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GQ-1, que contiene los 11 biomarcadores más importantes de los esteranos monoaromáticos.

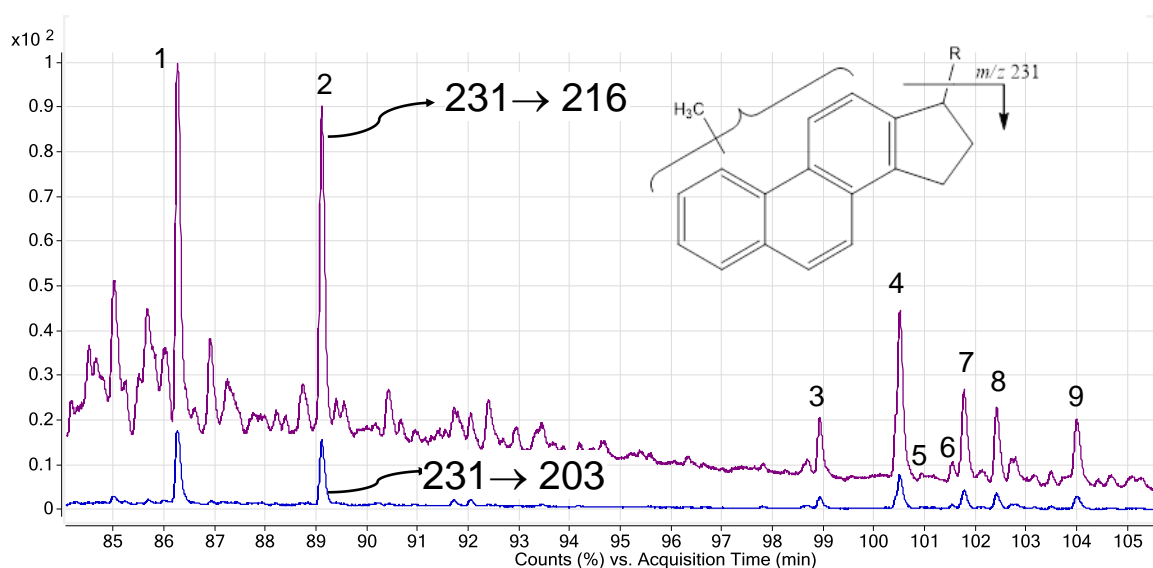
Figura 72. Fragmentogramas de masas (MRM, 253→143) obtenida por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos monoaromáticos, (EI, 70 eV). 1. MA21 2. MA22. 3. MAB27S. 4. MAD27S. 5. MADB27R. 6. MAA27S. 7. MADB28S. 8. MADB28R. 9. MAA29S. 10. MADB29R. 11. MAA29R.



En el análisis de esteranos triaromáticos, también se usó la transición entre el ion pico de base (m/z 231) y un ion producto (m/z 203), como pérdida de una molécula neutra de etileno ($-C_2H_4$). En la **Figura 73**, se muestra la superposición de las corrientes iónicas obtenidas mediante las transiciones MRM: 231→216 y 231→203, que permitieron obtener perfiles de esteranos triaromáticos en la muestra de crudo de referencia. Las áreas obtenidas con la transición que implica pérdida de 15 unidades fueron mayores con respecto a la pérdida de una molécula

de etileno. De acuerdo con la **Figura 74**, las relaciones señal-ruido determinadas para cada transición mostraron que la transición 231-203, permite determinar menores concentraciones de esteranos triarómáticos, es decir, adecuada para el análisis de muestras con alto nivel de biodegradación.

Figura 73. Fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos triarómáticos, (EI, 70 eV). 1. TA20. 2. TA21. 3. TA26S. 4. TA26R27S. 5. TA_DMCa. 6. TA_DMCb. 7. TA28S. 8. TA27R. 9. TA28R.



En la **Figura 75**, se observa que en el análisis de esteranos metiltriarómáticos, las transiciones MRM: 245 → 215 y 245 → 230, permitieron obtener perfiles cromatográficos similares. Áreas y relaciones señal-ruido (**Figura 76**) determinadas son semejantes. La pérdida de un radical metilo ($-CH_3\bullet$), es coherente con la ruta de fragmentación en esteranos metiltriarómáticos.

Figura 74. Comparación de la relación señal-ruido calculada para el análisis de esteranos triarómicos en muestras de crudo mediante el análisis por GC-QqQ-MS, modo de adquisición MRM.

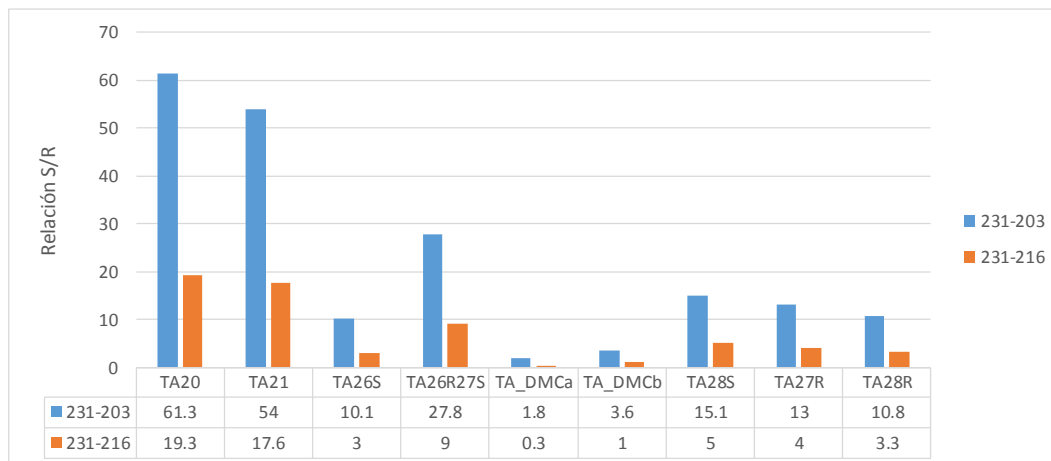


Figura 75. Fragmentogramas de masas (MRM) obtenidos por GC-QqQ-MS para el análisis de esteranos metiltriarómicos, (EI, 70 eV). 1. TA3CS. 2. TA4CS. 3. TA2ES. 4. TA3ES3CR. 5. TA4ES4CR. 6. TADA. 7. TA3SS. 8. TADB. 9. TA4SS2ER. 10. TA3ER. 11. TA4ER. 12. TADC. 13. TADD. 14. TA2SR. 15. TA3SR. 16. TADE. 17. TA4SR. 18. TADF.

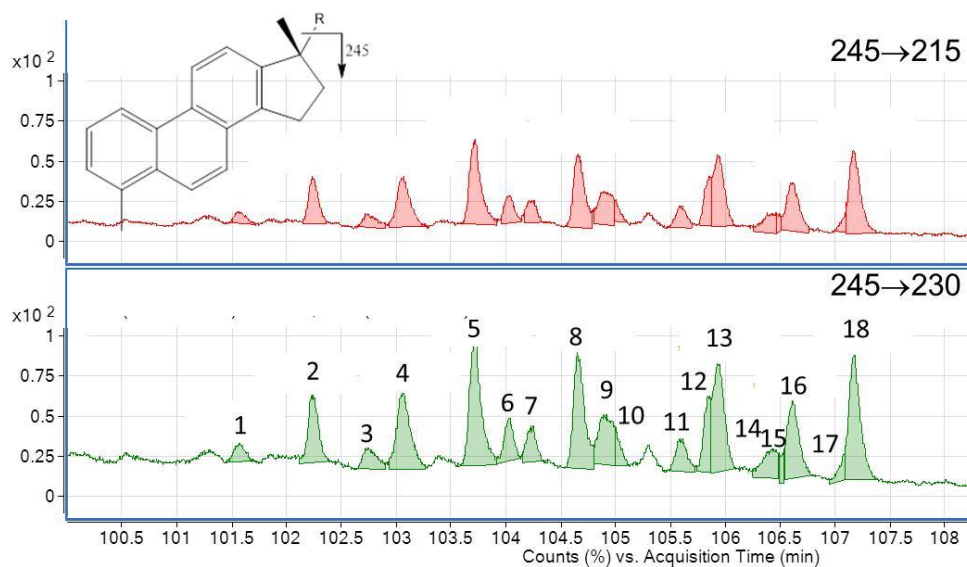
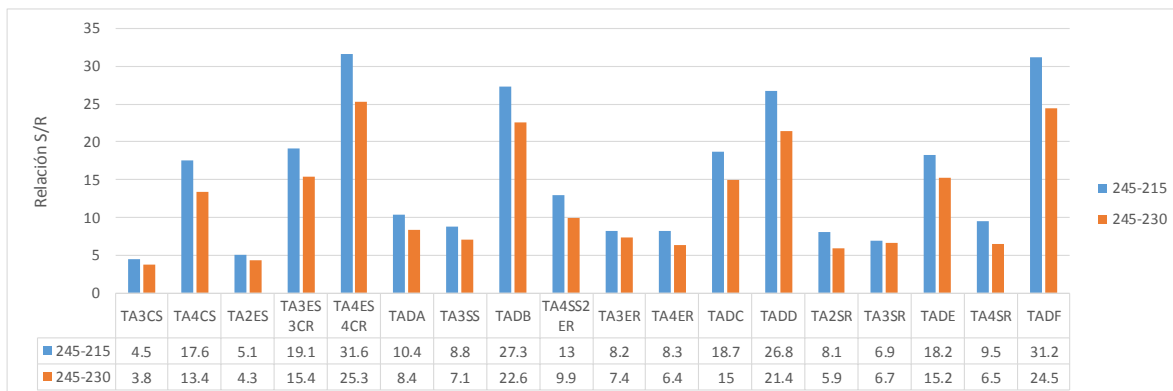


Figura 76. Comparación de la relación señal-ruido calculada para el análisis de esteranos metiltriaromáticos en muestras de crudo mediante el análisis por GC-QqQ-MS, modo de adquisición MRM.



En la **Tabla 23**, se recopilan las transiciones MRM para el monitoreo de biomarcadores aromáticos usando GC-QqQ-MS, que respecto al análisis clásico mediante GC-MS/SIM aumentan la especificidad, y a excepción de los esteranos metiltriaromáticos, si hubo aumento en la relación señal-ruido. Esto permitió el análisis de fracciones aromáticas, cuya concentración de biomarcadores hubiera sido afectada por procesos de biodegradación. Sin embargo, las transiciones determinadas se obtuvieron con energías promedio (5-25 eV). El análisis se enfocó en el efecto de la energía de la cámara de colisiones activadas (q_2) sobre la abundancia de biomarcadores aromáticos.

Tabla 23. Transiciones MRM para el monitoreo de biomarcadores aromáticos mediante GC-QqQ-MS

Biomarcadores	Transición ($M^+ \rightarrow F^+$,
	$F_1^+ \rightarrow F_2^+$)
Dibenzotiofenos	198→165
	184→152
Benzohopanos	474→191
	460→191

	446→191
	432→191
	206→191
	192→165
	184→169
Naftalenos y fenantrenos	178→152
	170→155
	168→153
	156→141
	142→115
Esteranos triaromáticos	231→203
Esteranos metiltriaromáticos	245→230
Esteranos monoaromáticos	253→143

M⁺ : Masa de ion molecular. F: Masa de fragmento.

5.8.2. Determinación de la energía de cámara de colisiones activadas en el análisis de biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM). Para cada familia de biomarcadores aromáticos, se determinó el área cromatográfica de cada biomarcador monitoreado a diferentes energías de cámara de colisiones activadas (0 - 50 eV). En la **Figura 77**, se observa la abundancia de pico cromatográfico 2-metilnaftaleno (N2M), y 1-metilnaftaleno (N1M) obtenida por GC-QqQ-MS, modo de adquisición MRM (142→115). El máximo de abundancia para la transición 142→115 correspondiente a la pérdida de un fragmento neutro (C₂H₃), se obtuvo con una energía de cámara de colisiones activadas de 30 eV. En el caso de las energías de 40 y 50 eV, se obtuvieron abundancias de 34000 ± 1300 y 14800 ± 310, respectivamente.

Figura 77. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 142→115) de metilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

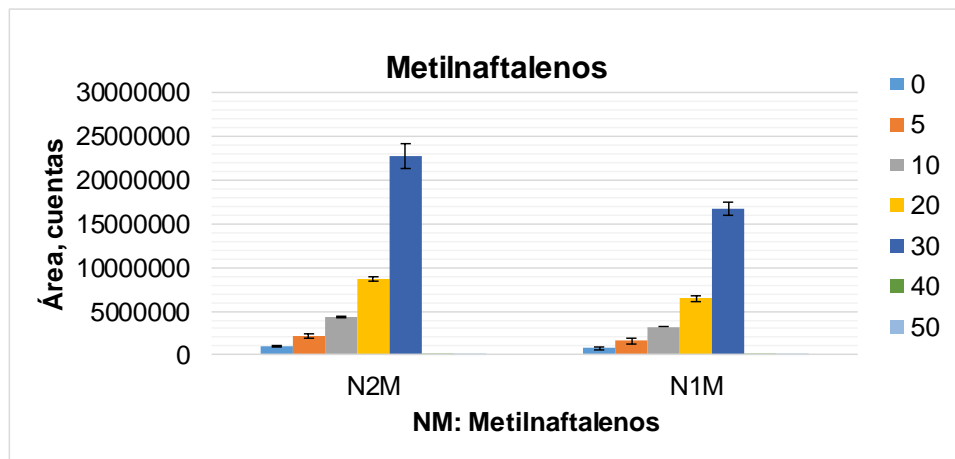


Figura 78. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 156→141) de dimetilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

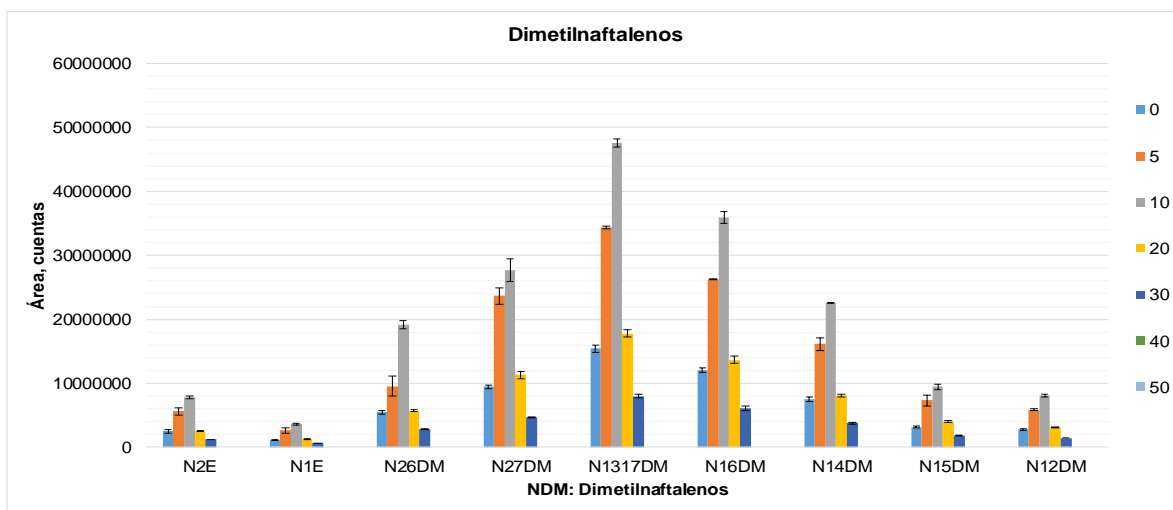
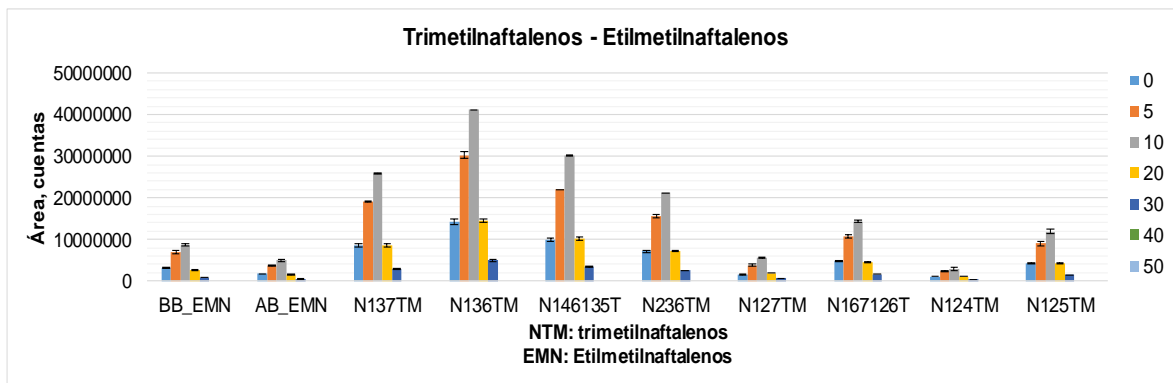
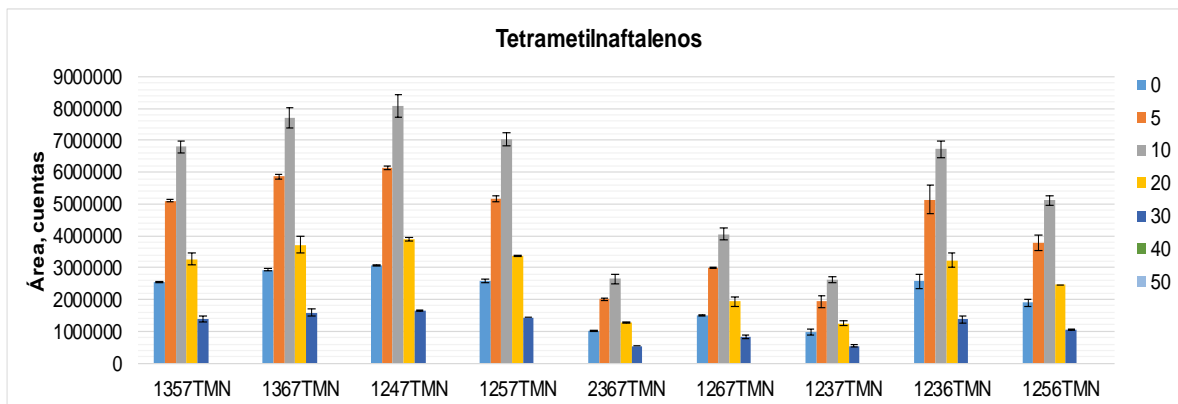


Figura 79. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 170→155) de trimetil- y etilmetilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



De acuerdo con las **Figuras 78, 79 y 80**, se muestra que con una energía de cámara de colisiones activadas de 10 eV, se obtuvo la mayor abundancia de pico cromatográfico, mediante el monitoreo en el método MRM para dimetilnaftalenos (156→141), trimetil- y etilmetilnaftalenos (170→155) y tetrametilnaftalenos (184→169). Con respecto a los metilnaftalenos, requieren 30 eV para obtener un máximo de respuesta cromatográfica y que ocurra una reacción de ruptura en uno de los núcleos aromáticos. Esto implica que se interrumpe la corriente diamagnética generada por la circulación de una corriente de electrones tipo π . Sin embargo, en los biomarcadores con dos, tres o cuatro grupos metilo, la ruptura alílica en cada una de estas estructuras requiere menor energía (10 eV), debido a que la pérdida de 15 unidades (radical metilo, $\text{CH}_3\cdot$), da lugar a un producto que puede ser estabilizado por deslocalización de la carga.

Figura 80. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 184→169) de tetrametilnaftalenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



En la **Figura 81**, se muestra la abundancia en función del energía de la cámara de colisiones activadas para el análisis de metilbifenilos (BP3M y BP4M) con el modo de adquisición MRM con la transición 168→153. El ion producto monitoreado corresponde a la pérdida de 15 unidades, referido a la pérdida del radical metilo ($\text{CH}_3\cdot$). La estabilidad del catión generado por la ruptura homolítica de las moléculas de fenantreno, es favorable por deslocalización de la carga entre los dos anillos aromáticos. La mayor abundancia de pico cromatográfico se obtuvo con una energía de cámara de colisiones activadas de 10 eV.

Figura 81. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 168→153) de metilbifenilos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

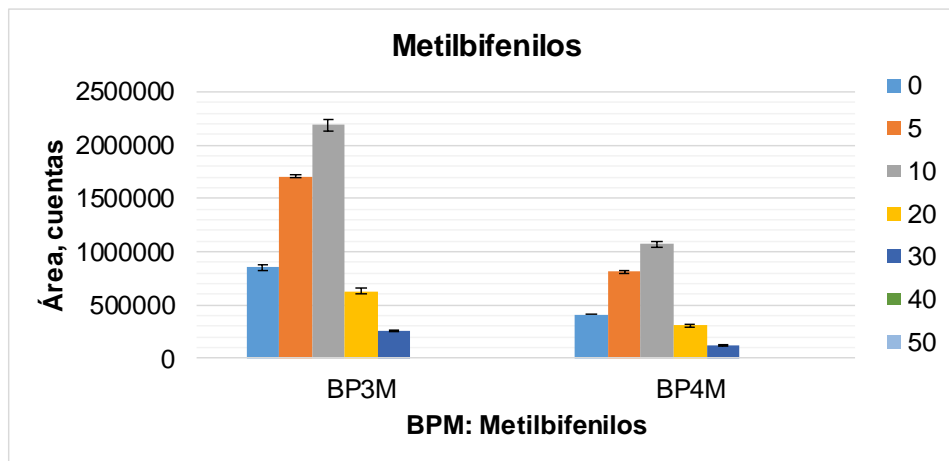
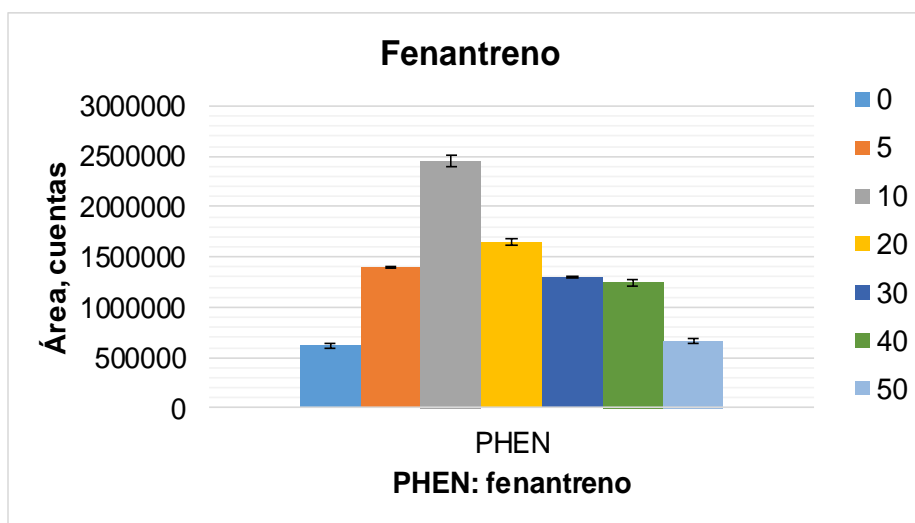


Figura 82. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 178→152) de fenantreno en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



La pérdida de 26 unidades a partir del ion molecular (M^+) m/z 178 del fenantreno, debido a la eliminación de una molécula de etileno (C_2H_4), sustenta la transición $178 \rightarrow 152$. De acuerdo con la teoría de Hückel sobre aromaticidad ($4n+2$), el fenantreno da un número n entero. La ruptura de uno de los anillos aromáticos y migración de dos protones, para desprender etileno, a una energía de 10 eV produce la mayor cantidad de fragmentos estables, como se muestra en los gráficos de abundancia de la **Figura 82**. En la **Figura 83**, se muestra el comportamiento en la abundancia de metilfenantrenos con respecto a los experimentos de energía de cámara de colisiones activadas (0-50 eV), se observa que los cuatro isómeros constitucionales de metilfenantreno requieren un valor de energía semejante a lo reportado en el análisis de metilnaftalenos, en donde la pérdida de un fragmento neutro (C_2H_2) y radical hidruro (27 unidades de masa), requiere más energía, con respecto a la serie dimetil, trimetil y tetrametilnaftalenos.

Figura 83. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, $192 \rightarrow 165$) de metilfenantrenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

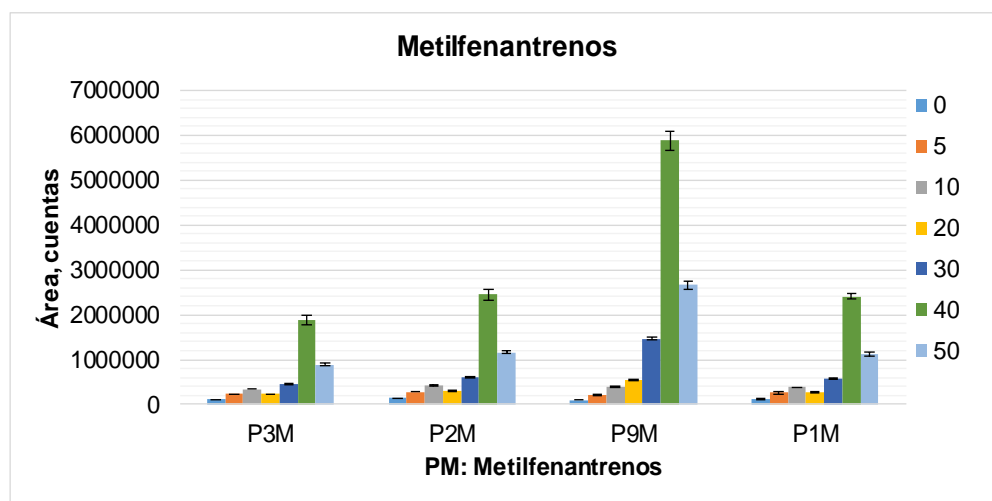
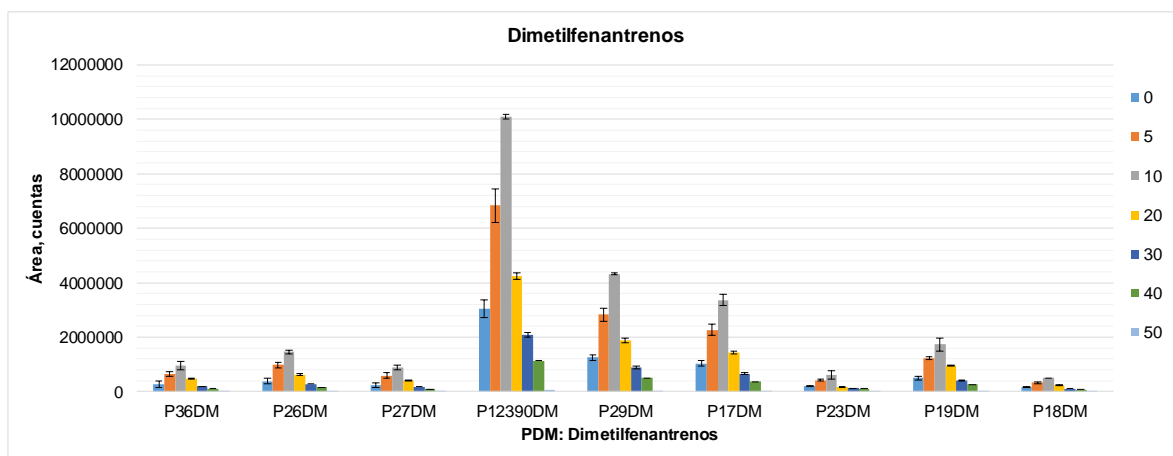
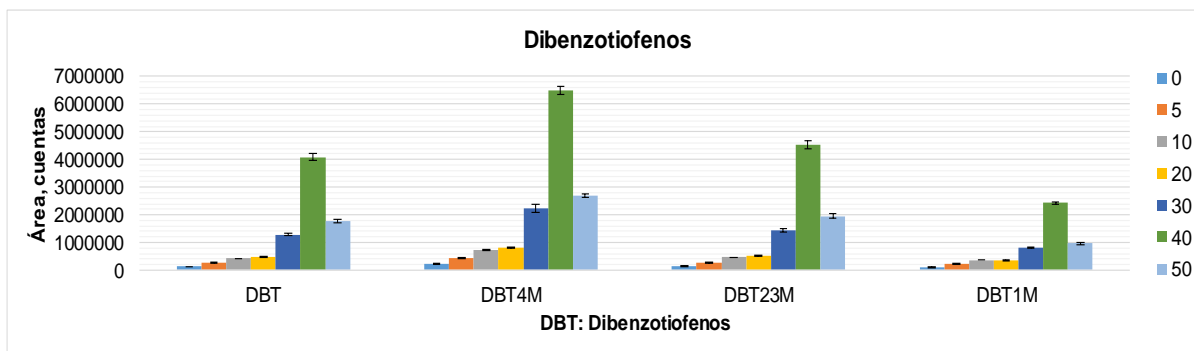


Figura 84. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 206→191) de dimetilfenantrenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



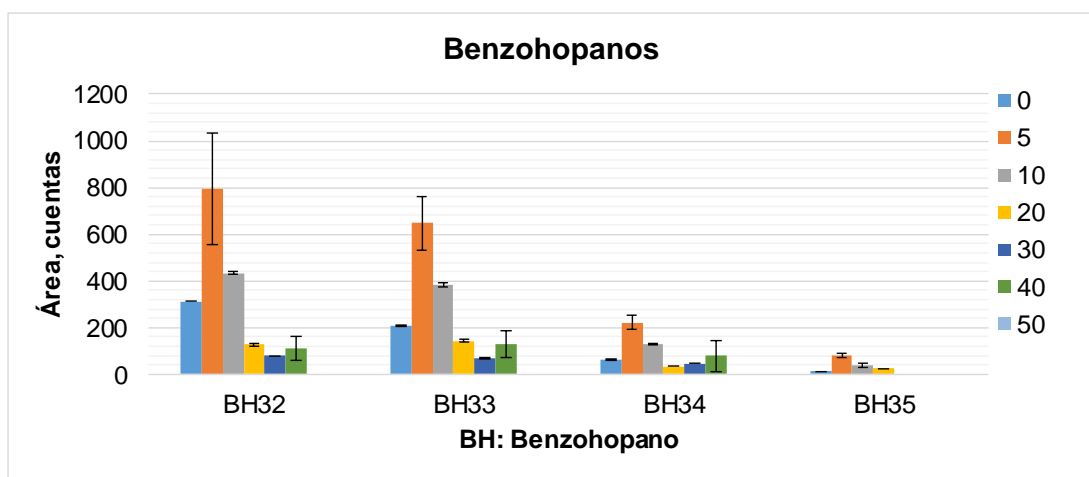
En los dimetilfenantrenos la tendencia fue similar a los dimetil, trimetil y tetrametil naftalenos, en cuyas transiciones entre ion molecular (precursor) y especie generada (producto) por pérdida de radical metilo (CH_3^\bullet). En la **Figura 84**, se observa que en todos los isómeros de dimetilfenantreno se obtuvo la mayor abundancia para la transición (206→191) con una energía de 10 eV.

Figura 85. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 184→152 y 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



En la **Figura 85**, se observa el comportamiento de la abundancia con respecto a la energía de cámara de colisiones activadas (q_2), para dibenzotiofeno (DBT) y metildibenzotiofenos (DBTM). En el análisis de DBT, la transición 184→152, corresponde a la pérdida de un átomo de azufre de la estructura que contiene el heteroátomo cíclico. De manera análoga, en el análisis de metildibenzotiofenos (198→165), la transición implica una pérdida del radical ($\text{HS}\cdot$). Igual que en DBT, se maximizó la respuesta con una energía de cámara de colisiones activadas de 40 eV.

Figura 86. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, $\text{M}^+\rightarrow 191$) de benzohopanos (C_{32} hasta C_{35}) en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



Los benzohopanos, estructuralmente tienen estrecha relación con biomarcadores saturados. En general, las transiciones para esta familia de biomarcadores implican una doble apertura del anillo B del heterociclo, con una energía de cámara de colisiones activadas. En la **Figura 86**, se observa que una energía de 5 eV, se obtiene un máximo de abundancia.

Figura 87. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 253→143) de esteranos monoaromáticos C₂₁, C₂₂ C₂₇-C₂₉ en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

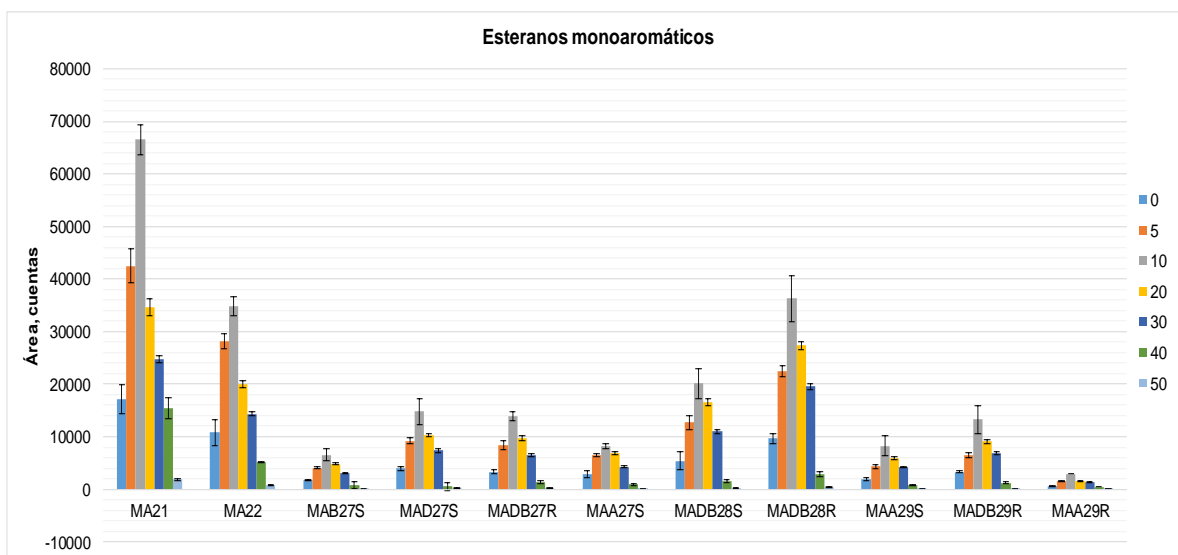
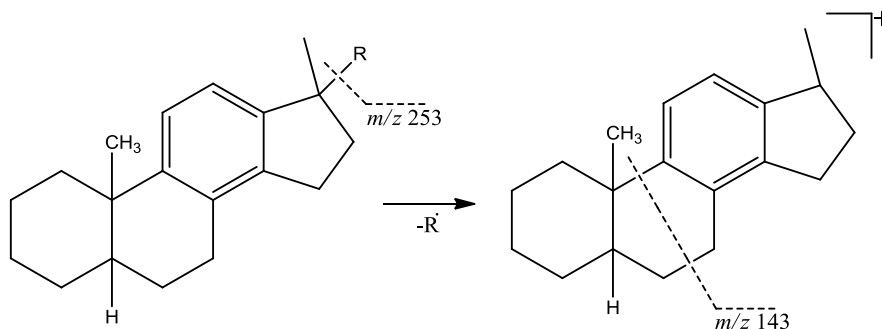


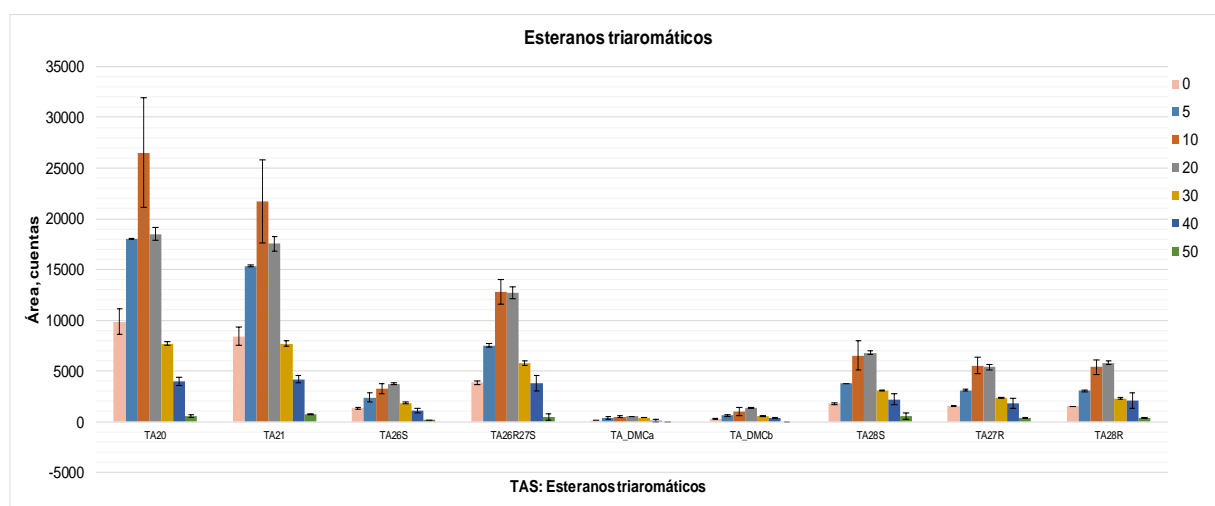
Figura 88. Ruta de fragmentación propuesta para esteranos monoaromáticos por impacto con electrones.



En la **Figura 87**, se muestra la abundancia de esteranos monoaromáticos obtenida con la transición MRM (253→143). Para todos los biomarcadores monitoreados, la energía de cámara de colisiones activadas para obtener mayor respuesta fue de 10 eV; valor cercano al encontrado para benzohopanos (5 eV). Con respecto a los productos de fragmentación que permiten obtener mayor

abundancia con una energía de colisiones relativamente baja, en la **Figura 88**, se muestra la posible ruta de fragmentación. Una pérdida de radical (-R•), seguida de doble apertura en el anillo B del heterociclo, con pérdida de molécula neutra.

Figura 89. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 231→203) de esteranos triaromáticos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.



En el análisis de esteranos triaromáticos, se determinó que tanto en triaromáticos como metiltriaromáticos, la energía de cámara de colisiones activadas, según las **Figuras 89 y 90**, son 10 eV. En ambos casos la formación del ion precursor, es debida a la pérdida de un radical (-R•) y la respectiva formación de un carbocatión en el anillo D, que puede ser estabilizado por migración de hidruro. En el caso de los esteranos triaromáticos, la pérdida de una molécula neutra de etileno (-C₂H₄) da lugar a la formación de un catión *m/z* 203. La formación de la especie *m/z* 230 a partir del catión del esterano metiltriaromático (*m/z* 245), no es muy clara. Sin embargo, se obtuvo la mayor abundancia de pico cromatográfico para los biomarcadores aromáticos de esta serie.

Figura 90. Áreas cromatográficas obtenidas con los fragmentogramas de masas (MRM, 245→230) de esteranos metiltriaromáticos en la fracción aromática del crudo de referencia (C-GQ-1) obtenidos por GC-QqQ-MS con diferentes energías de cámara de colisiones activadas.

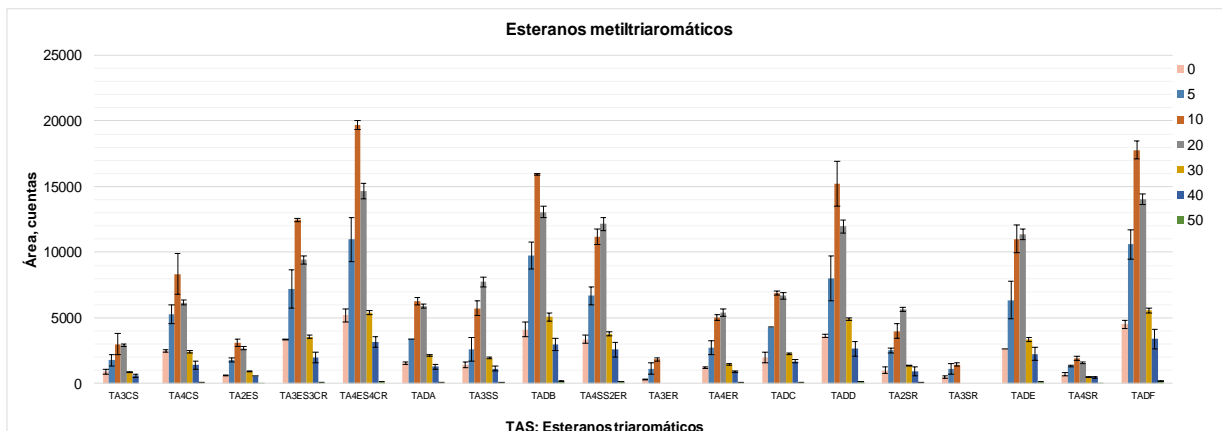
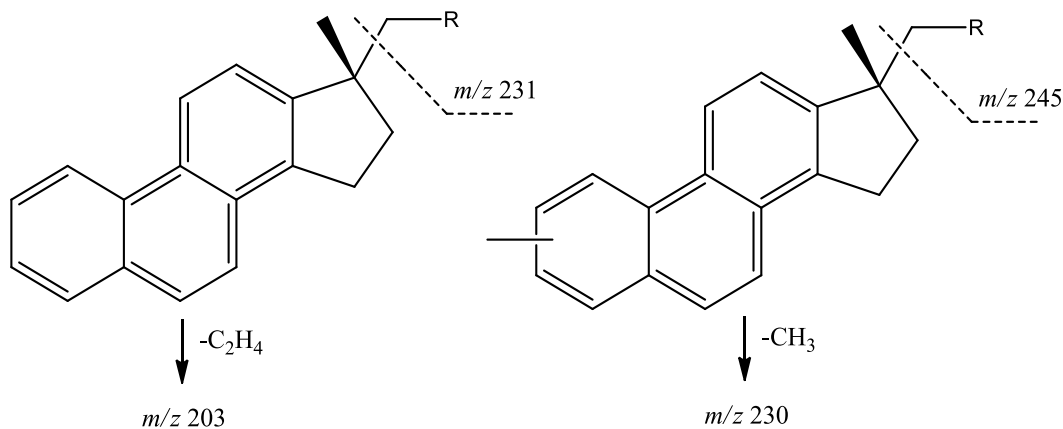


Figura 91. Ruta de fragmentación de esteranos triaromáticos para la formación de iones producto en la adquisición MRM.



5.8.3. Relaciones moleculares determinadas con biomarcadores aromáticos por GC-QqQ-MS (modo MRM). El cálculo de las relaciones moleculares fue desarrollado con base en las áreas y alturas de los picos cromatográficos de cada uno de los biomarcadores aromáticos estudiado. En la **Tabla 24**, se muestran los valores adimensionales de relaciones o parámetros moleculares para la muestra de referencia, crudo C-GQ-1. Biodegradación, madurez térmica, origen y ambiente

de depositación, fueron determinados mediante gráficas de relaciones moleculares de biomarcadores aromáticos, usando GC-QqQ-MS (modo MRM).

Tabla 24. Relaciones moleculares de biomarcadores aromáticos determinada en la muestra C-GQ-1 con áreas y alturas de picos cromatográficos obtenidos mediante GC-QqQ-MS (modo MRM).

Relación	Áreas	Alturas
(C20+C21)/S TAS	0.53	0.58
TAS #1 20/20+27	0.78	0.81
TAS #2 21/21+28	0.76	0.82
%26 TAS	23.83	29.05
%27 TAS	38.43	38.79
%28 TAS	37.74	32.16
%29 TAS	0.00	0.00
C28/C26 20S TAS	1.86	1.53
C28/C27 20R TAS	0.98	0.83
Dia/Regular C27 MAS	2.46	2.24
%27 MAS	35.90	42.71
%28 MAS	45.90	38.88
%29 MAS	18.20	18.41
(C21+C22)/S MAS	0.46	0.44
TAS/(MAS+TAS)	0.64	0.59
TA28/(TA28+MA29)	0.56	0.58
Índice dinosteroide	0.41	0.42
C4/C3+C4 Mester	0.50	0.57
MPI-1	0.34	0.37
Rc(a) if Ro < 1.3 (Ro%)	0.58	0.59
Rc(b) if Ro > 1.3 (Ro%)	2.09	2.08
MPI-2	0.38	0.40

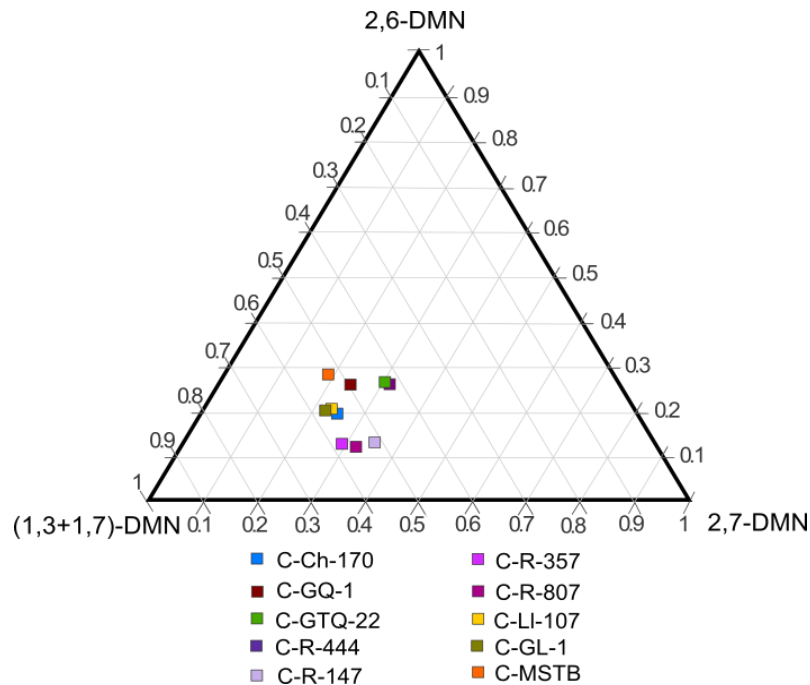
Relación	Áreas	Alturas
DNR-1	5.06	3.39
DNR-2	0.71	2.59
TNR1	0.71	0.97
TDE-1	3.50	3.66
TDE-2	0.44	0.51
MDR	2.26	2.63
Rm (Ro%)	0.72	0.74
MDR23	0.53	0.38
MDR1	0.35	0.28
DBT/Fenantreno	0.54	0.58
125TMN/136TMN	0.33	0.44
127TMN/137TMN	0.26	0.31
Pr/Ph	0.90	1.17

El estudio de los niveles de biodegradación se basó en el análisis de abundancia de compuestos, teniendo en cuenta que a mayor susceptibilidad a la biodegradación, presentarán mayor empobrecimiento con respecto a los menos susceptibles. Con este enunciado como base se realizó el análisis de degradación de los compuestos aromáticos dimetilnaftalenos, trimetilnaftalenos y tetrametilnaftalenos .

En los dimetilnaftalenos se comparan las proporciones de 2,6 DMN, 2,7 DMN y 1,3+1,7-DMN, con base en el orden de susceptibilidad 2,6>2,7>1,3+1,7, siendo el 2,6 DMN el más susceptible a la biodegradación [91]. En la **Figura 92**, se observa que las muestras C-R-147, C-R-357 Y C-R-807, presentan una biodegradación de moderada a alta, debido a que presentan muy poca proporción de 2,6-DMN y 2,7-DMN y una ligera disminución de (1,3+1,7)-DMN. Las muestras C-CH-170, C-GQ-1, C-GTQ-22, C-R-444, C-LI-107, C-MSTB y C-GL-1, presentan una biodegradación menor, debido a que la proporción de 2,6-DMN, es mayor con

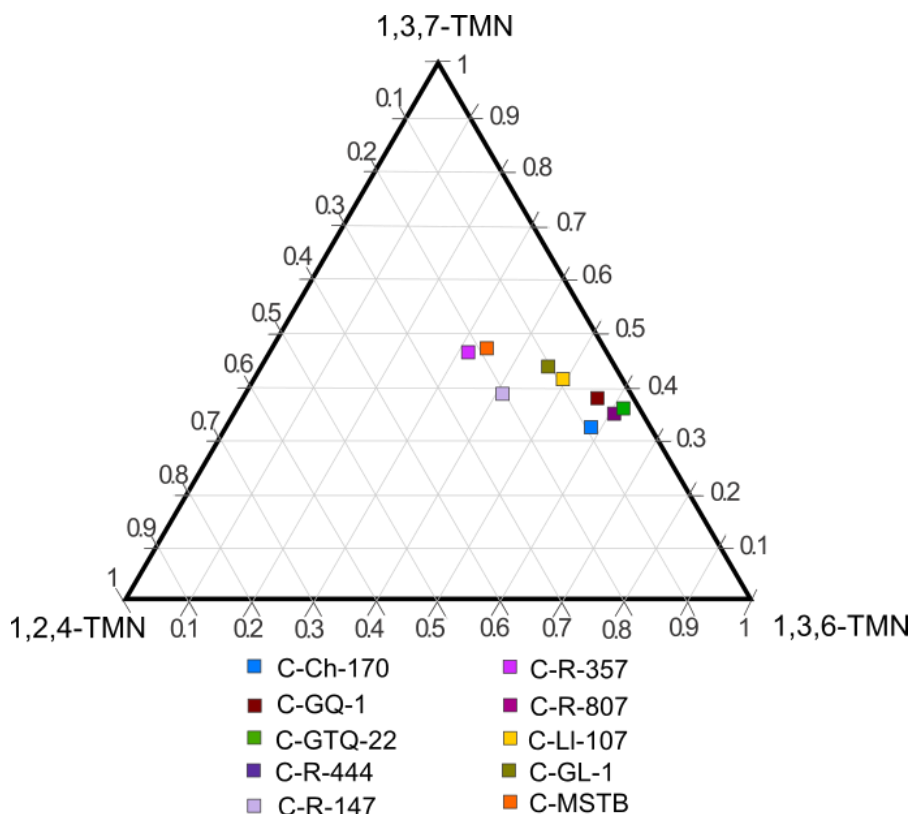
respecto a las muestras que en reservorio, tienen condiciones que propician la biodegradación.

Figura 92. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, dimetilnaftalenos.



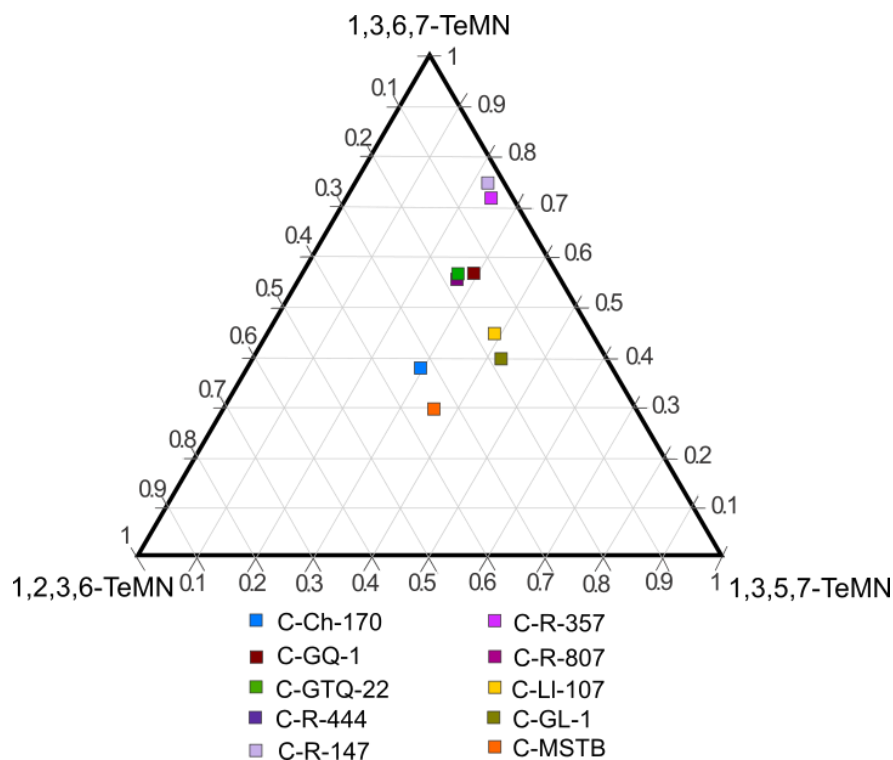
El análisis de los biomarcadores aromáticos de la familia de los trimetilnaftalenos, fue llevado a cabo con base en las proporciones de 1,3,7 TeMN, 1,3,6 TeMN y 1,2,4-TeMN, según el orden de susceptibilidad $1,3,7 > 1,3,6 > 1,2,4$. Sugiere alteración incipiente cuando hay disminución en la abundancia de 1,3,7 TeMN y alteración avanzada cuando decae la cantidad disponible de 1,2,4-TeMN. De acuerdo con la **Figura 93**, se puede establecer que las muestras C-R-357, C-MSTB y C-R-147, presentan una biodegradación de moderada a alta, debido a que presentan bajas proporciones de 1,3,7-TeMN y 1,3,6-TeMN. Las muestras C-CH-170, C-GQ-1, C-GTQ-22, C-R-444, C-LI-107, C-R-807 y C-GL-1 poseen una biodegradación menor, debido a que el empobrecimiento en 1,3,6-TeMN es menor.

Figura 93. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, trimetilnaftalenos.



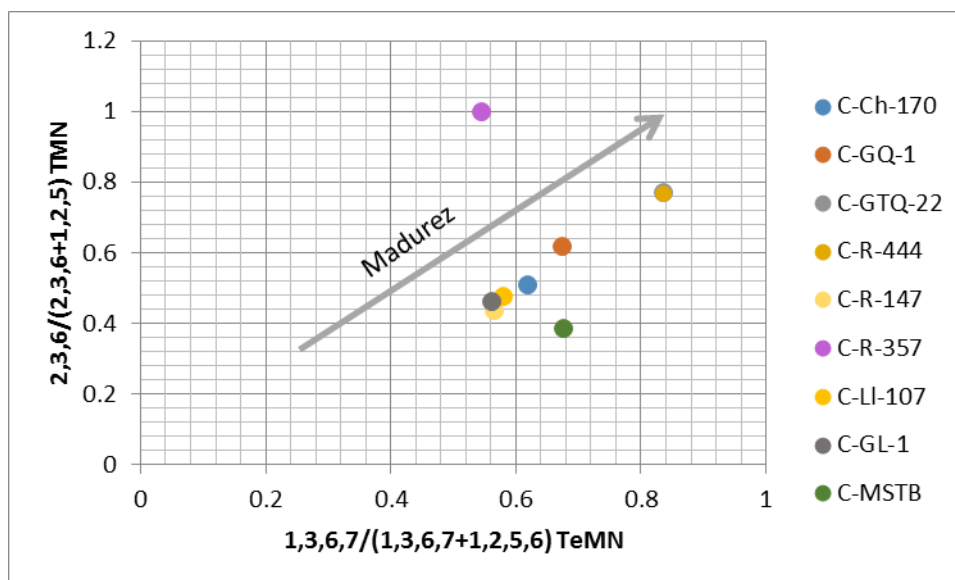
La alteración de crudos, también fue analizada con base en la familia de tetrametilnaftalenos, según las proporciones de 1,3,6,7, 1,3,5,7 y 1,2,3,6-TeMN (veáse **Figura 94**), aplicando el orden de susceptibilidad 1,3,6,7>1,3,5,7>1,2,3,6. De acuerdo con el criterio de susceptibilidad a la biodegradación, las muestras contienen tetrametilnaftalenos incipientemente alterados. Sin embargo, las muestras C-R-147, C-R-357 y C-R-444 presentan un notable empobrecimiento en 1,3,5,7-TeMN y 1,2,3,6-TeMN, que confirman el alto grado de biodegradación que se ha determinado con otros parámetros geoquímicos.

Figura 94. Diagrama ternario de las proporciones de los compuestos aromáticos, tetrametilnaftalenos.



La biodegradación inicia con remoción parcial hasta llegar a una remoción total de biomarcadores característicos de una familia. En las muestras C-CH-170, C-GQ-1, C-GTQ-22, C-R-444, C-LI-107, C-MSTB y C-GL-1, se encontró alteración en la magnitud de las familias de dimetilnaftalenos y trimetilnaftalenos, lo que muestra una biodegradación de leve a moderada. Las muestras C-R-807, C-R-357 y C-R-147, presentan una biodegradación mayor, debido a que la magnitud de los compuestos dimetilnaftalenos, trimetilnaftalenos y tetrametilnaftalenos, presentaron una disminución de concentración importante. A pesar de esta disminución, el método de análisis por GC-QqQ-MS (modo MRM), permitió la determinación de dimetilnaftalenos, trimetilnaftalenos y tetrametilnaftalenos en las muestras con mayor nivel de biodegradación (C-R-807, C-R-357 y C-R-147).

Figura 95. Madurez térmica de las muestras de crudo biodegradado con base en las relaciones $2,3,6/(2,3,6+1,2,5)$ TMN Vs $1,3,6,7/(1,3,6,7+1,2,5,6)$ TeMN.



Con el aumento de la madurez térmica, las relaciones $2,3,6/(2,3,6+1,2,5)$ trimetilnaftaleno (TMN) y $1,3,6,7/(1,3,6,7+1,2,5,6)$ tetrametilnaftaleno (TeMN) tienden a aumentar. En la **Figura 95**, se muestra el nivel de madurez en las muestras de crudo procedentes de las cuencas Llanos Orientales, Central y VMM. Las muestras C-LI-107, C-GQ-1, C-GL-1, C-R-807, C-MSTB, C-R-147 y C-Ch-170 presentaron un grado de madurez similar, y las muestras C-R-357, C-GTQ y C-R-444, tuvieron el mayor grado de madurez térmica del grupo de crudos biodegradados analizados.

Se analizaron relaciones de biomarcadores de la fracción aromática, para evaluar el nivel de madurez en las muestras de crudo. El índice de metilfenantreno, que es reportado en la literatura como el hidrocarburo tricíclico que presenta el mayor grado de variación con el incremento de la madurez térmica, así como la tasa de metilfenantreno (MPR) y la reflectancia de vitrinita calculada (R_m); mejoraron la comprensión de la madurez térmica en las muestras de crudo analizadas. En la

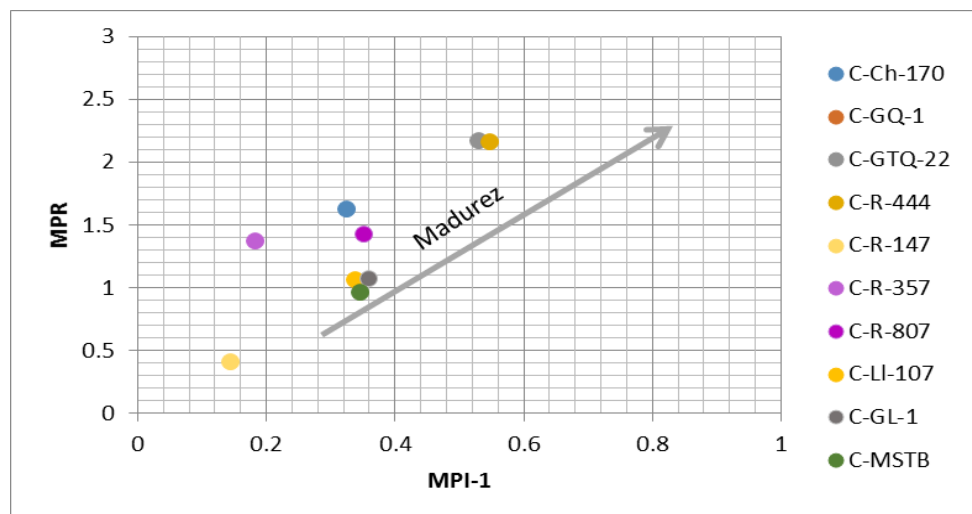
Tabla 25, se muestran algunos parámetros de madurez térmica calculados con base en fenantreno y metilfenantrenos.

Tabla 25. Parámetros de madurez térmica determinados en muestras de crudo biodegradado.

Muestra	Rm	MPI	MPR
C-Ch-170	0,61	0,32	1,62
C-GQ-1	0,73	0,34	1,05
C-GTQ-22	0,78	0,53	2,17
C-R-444	0,79	0,55	2,16
C-R-147	0,45	0,14	0,41
C-R-357	0,43	0,18	1,37
C-R-807	0,54	0,35	1,43
C-MSTB	0,61	0,35	0,96

Rm: reflectancia de vitrinita calculada. MPI: índice de metilfenantreno. MDR: variación de metilfenantreno.

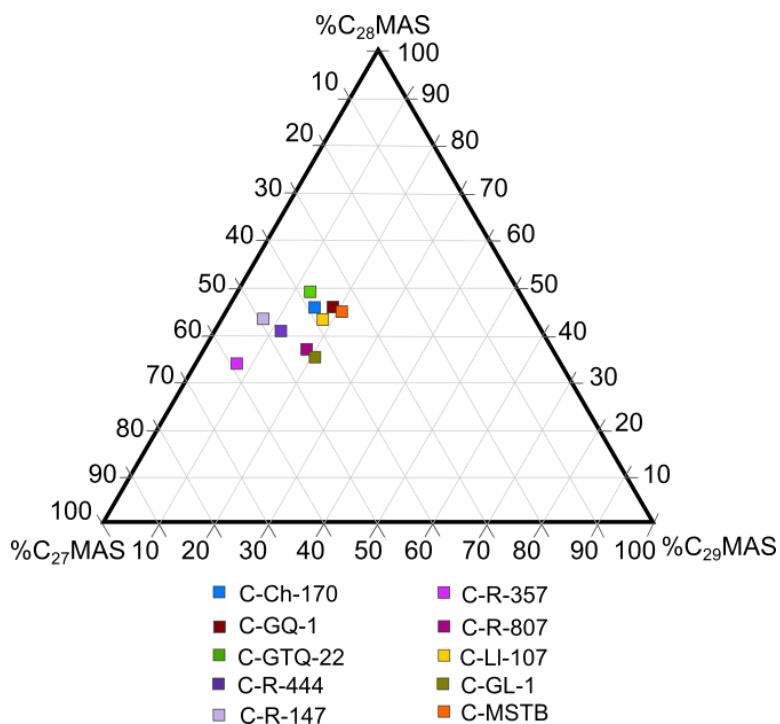
Figura 96. Índice de metilfenantreno (MPI-1) Vs la tasa de metilfenantreno (MPR) en muestras de crudo biodegradado.



El grado de madurez de la materia orgánica, fue calculado con base en el índice de metilfenantreno (MPI-1) vs la tasa de metilfenantreno (MPR). Con el aumento de la degradación térmica, los índices MPI-1 y MPR también aumentan. De acuerdo con la **Figura 96**, con las muestras C-R-147 y C-R-357, se determinó menor madurez, mientras que las muestras C-LI-107, C-GQ-1, C-GL-1, C-R-807, C-MSTB y C-Ch-170 presentaron una madurez semejante, y tanto C-GTQ-22 como C-R-444 fueron a las muestras con mayor madurez del grupo analizado.

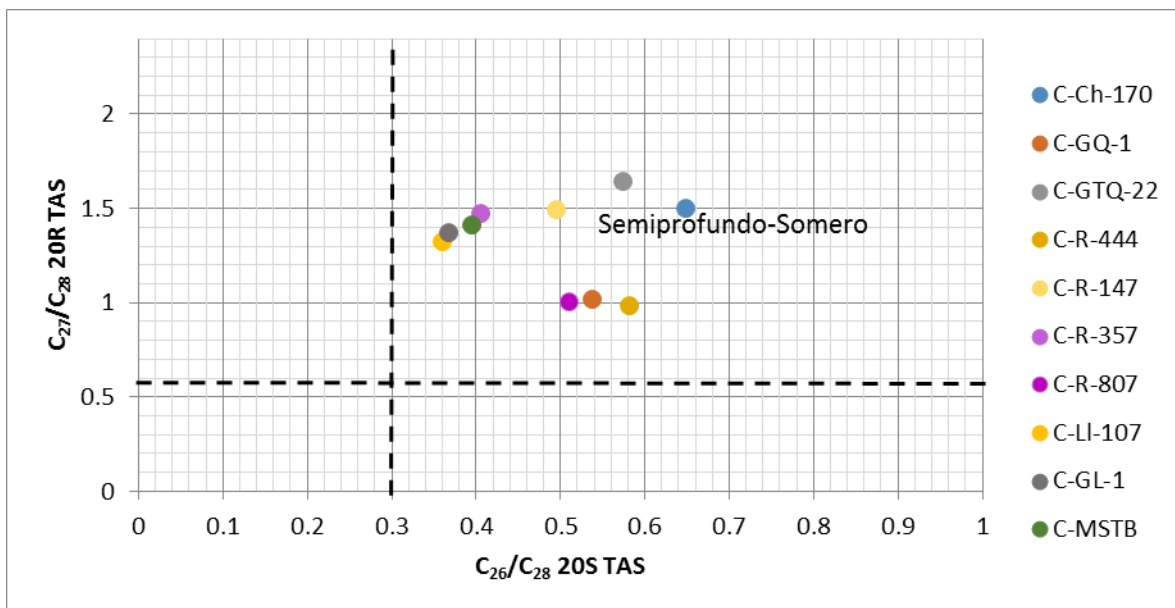
Esto es coherente con la determinación realizada con base en relaciones $2,3,6/(2,3,6+1,2,5)$ TMN vs $1,3,6,7/(1,3,6,7+1,2,5,6)$ TeMN. Los valores de la reflectancia de vitrinita calculada, ubican las muestras en ventana de generación de aceite, y generalizando que las muestras de crudos analizados están en etapa de madurez.

Figura 97. Diagrama ternario del porcentaje de los esteroides monoaromáticos (MAS) determinado en las muestras de crudo.



El análisis de origen de la materia orgánica y ambiente de depositación se realizó bajo la hipótesis de que “la composición de la materia orgánica de la roca generadora es transmitida al crudo”. El análisis de diferentes parámetros útiles para determinar ambiente y origen de materia orgánica del conjunto de muestras analizadas. Los porcentajes de C₂₇, C₂₈ y C₂₉ de esteranos monoaromáticos mostrados en la **Figura 97**, indican el aporte de especies eucariotas entre la materia orgánica depositada. La abundancia relativa de C₂₇ comparada con la abundancia de los esteranos monoaromáticos C₂₈ y C₂₉ indica predominio de materia orgánica de origen marino que permite ubicar las muestras analizadas en origen de materia orgánica marina principalmente. Sin embargo, mayor cantidad de C₂₉ con respecto a C₂₈, indica aporte siliciclástico; por ende, las muestras presentan un origen de materia orgánica mixto con mayor aporte marino carbonatado, información corroborada mediante el análisis de DBT, fenantreno y metilfenantrenos.

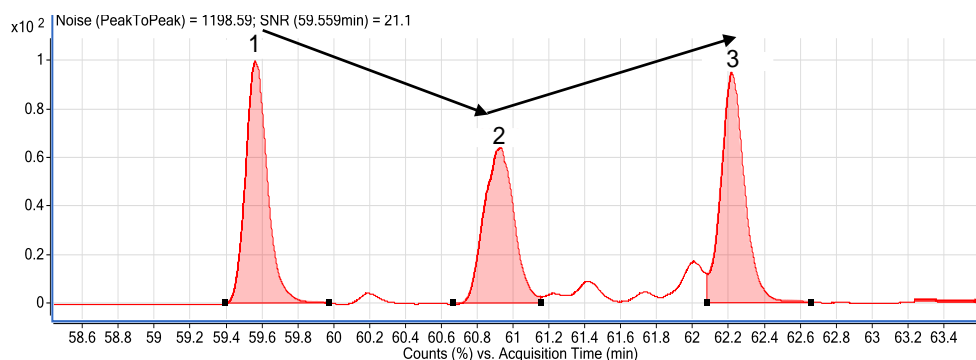
Figura 98. Relaciones C₂₇/C₂₈ 20R TAS Vs C₂₆/C₂₈ 20S TAS determinado en las muestras de crudo.



La correlación C_{27}/C_{28} 20R TAS Vs C_{26}/C_{28} 20S TAS mostrada en la **Figura 98**, que permite diferenciar crudos asociados a ambientes marinos profundos, de crudos asociados a ambientes semiprofundos-someros, según las relaciones $26/28$ 20S > 0.3 y $27/28$ 20R > 0.6, indicó predominio de materia orgánica proveniente de microorganismos eucariotas, que corresponden a condiciones semiprofundas o someras, mientras que, relaciones $26/28$ 20S < 0.3 y $27/28$ 20R < 0.6, indican baja proliferación de eucariotas, que corresponde a ambientes profundos o abisales.

Según la **Figura 98**, el conjunto de crudos analizados en crudos asociados se ubican en ambientes semiprofundos, posiblemente de plataforma, debido a que las muestras analizadas poseen relaciones de $26/28$ 20S > 0.3 y $27/28$ 20R > 0.6.

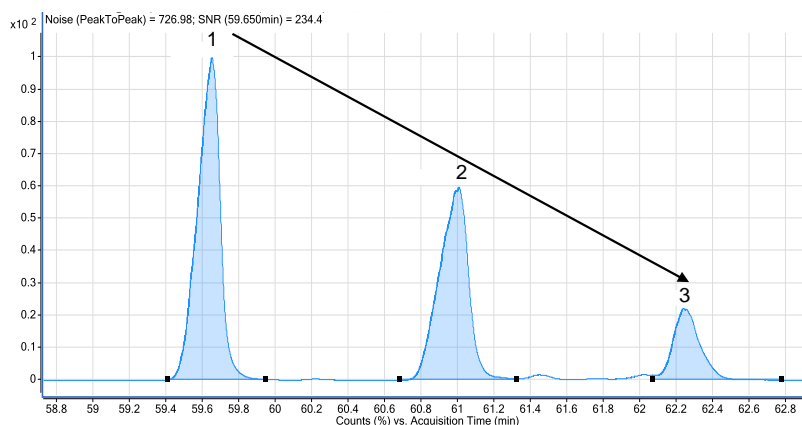
Figura 99. Fragmentograma de masas (MRM, 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-Ch-170 obtenido por GC-QqQ-MS. 1. DBT4M. 2. DBT23M. 3. DBT1M.



El análisis de la familia de los metildibenzotiofenos, permitió diferenciar crudos de roca fuente marina, calcárea, ($4\text{-MDBT} > 2,3\text{-MDBT} < 1\text{-MDBT}$), que según la altura de pico cromatográfico tienen un patrón de distribución en forma de “V” (veáse **Figura 99**), mientras que los crudos de roca fuente siliciclástica ($4\text{-MDBT} > 2,3\text{-MDBT} > 1\text{-MDBT}$), presentan un patrón de distribución en los metildibenzotiofenos como una caída abrupta escalonada (veáse **Figura 100**).

La **Figura 101** evidencia que las muestras de crudo son de roca fuente marina con aporte siliciclástico. Sin embargo, debido al grado de biodegradación de las muestras del estudio, es necesario complementar esta hipótesis con información de biomarcadores menos susceptibles a la biodegradación (eg. metilfenantrenos).

Figura 100. Fragmentograma de masas (MRM, 198→165) de dibenzotiofenos en la fracción aromática de crudo proveniente de campo C-GTQ-22 obtenido por GC-QqQ-MS. 1.DBT4M. 2. DBT23M. 3. DBT1M.



Las proporciones relativas de 9-metilfenantreno > 1-metilfenantreno, indican aportes de materia orgánica marina y 9-metilfenantreno menor que 1-metilfenantreno, indican aportes de materia orgánica continental. Según la **Figura 102**, 9-metilfenantreno excede la cantidad de 1-metilfenantreno, en las muestras C-Ch-170, C-GQ-1, C-GTQ-22, C-R-444, C-LI-107 y C-GL-1, corroboran que las muestras corresponden a crudos depositados en un ambiente marino. En las muestras C-R-147, C-R-357, C-R-807 y C-MSTB, igualmente se obtuvo mayor abundancia de 9-MP con respecto a 1-MP, lo que indica un aporte de materia orgánica marina. Sin embargo, la cantidad de éstos biomarcadores aromáticos fue muy baja.

Figura 101. Diagrama ternario de metildibenzotiofenos en las muestras de crudo.

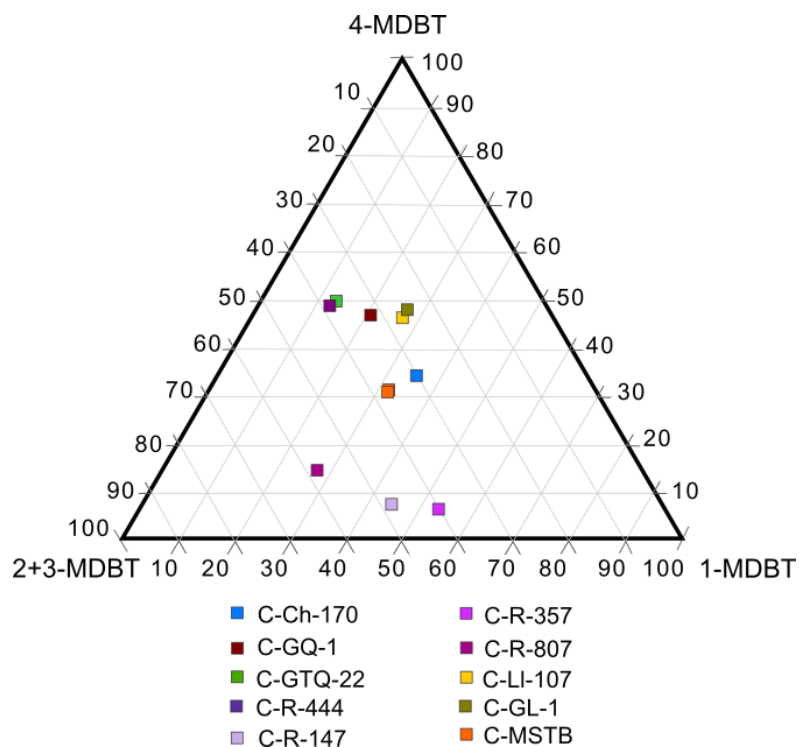


Figura 102. Diagrama de barras con las proporciones de 9-metilfenantreno y 1- metilfenantreno en las muestras de crudo.

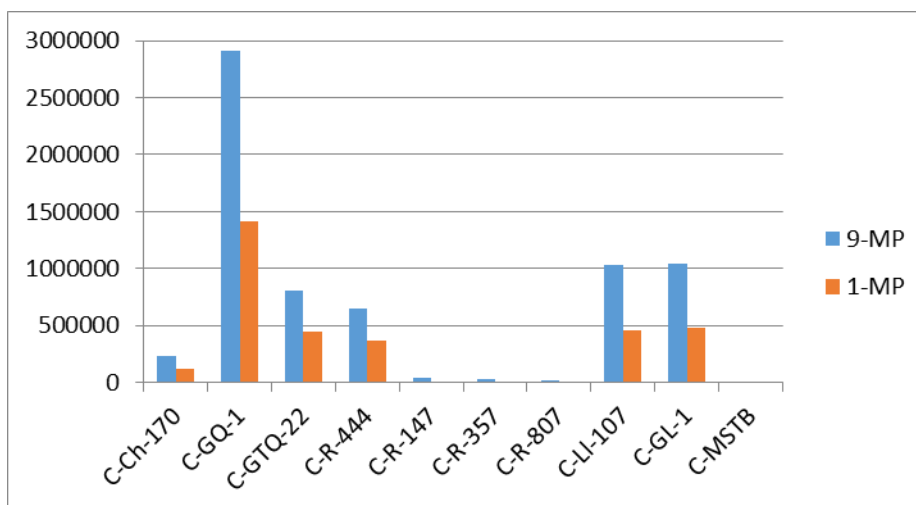
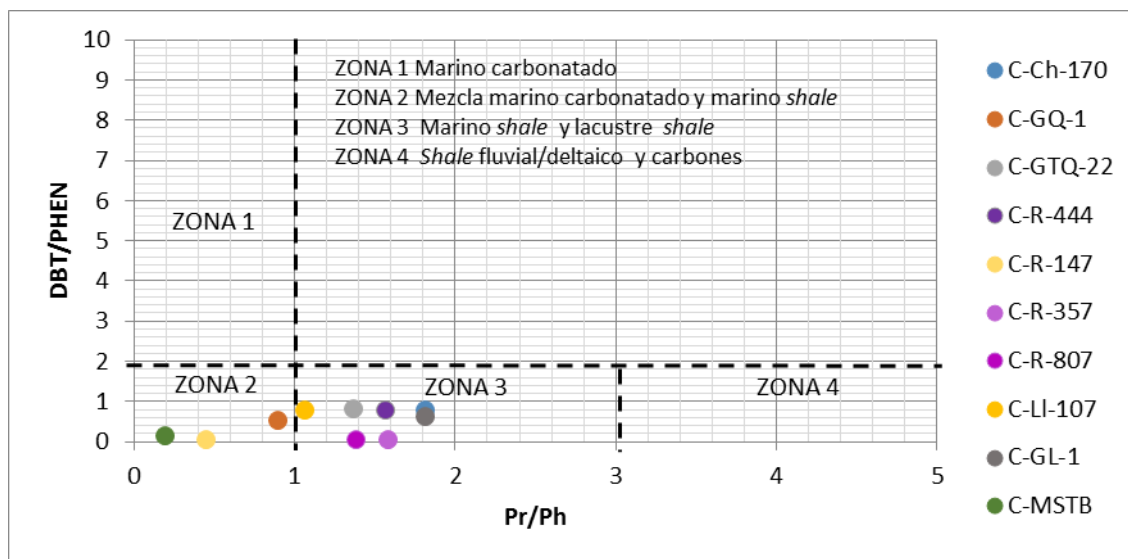


Figura 103. Relación DBT/PHEN Vs Pr/Ph en las muestras de crudo.



La correlación DBT/PHEN Vs Pr/Ph mostrada en la **Figura 103**, ubica a las muestras C-R-147, C-MSTB y C-GQ-1 en un ambiente de mezcla marino carbonatado y marino *shale*; las muestras C-CH-170, C-GTQ-22, C-R-444, C-LI-107 y C-GL-1, C-R-807 y C-R-357 se hallan en un ambiente de depositación marino tipo *shale*, siendo éste último grupo, el que presenta el mayor aporte de *shale*.

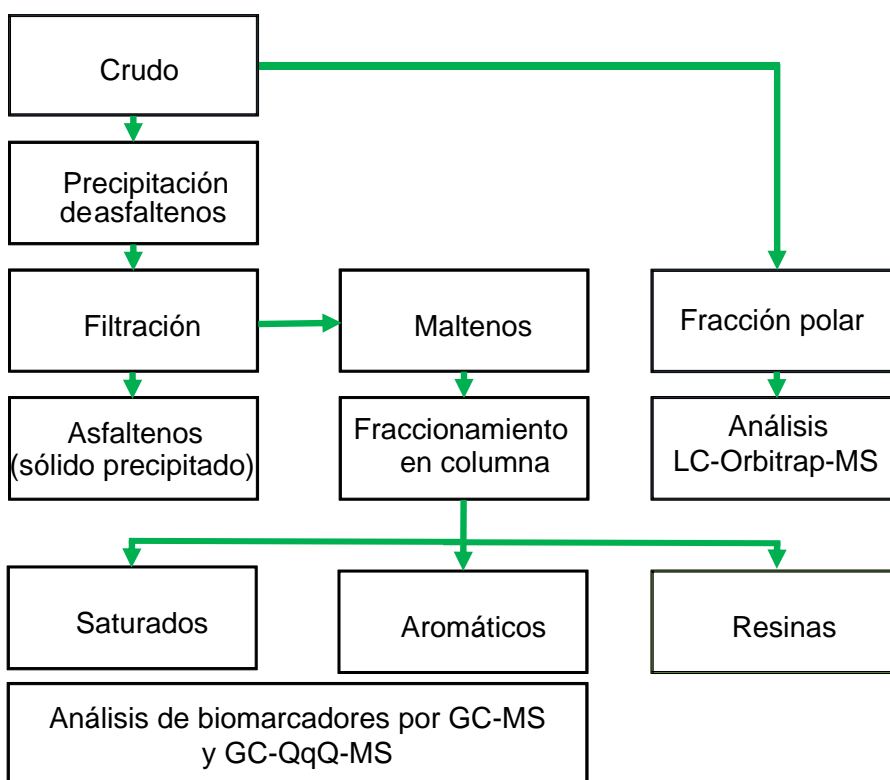
Según los esteroides monoaromáticos, la familia de los metildibenzotiofenos, el 9-metilfenantreno, y 1- metilfenantreno y la correlación DBT/PHEN Vs Pr/Ph, las muestras de crudo analizadas se originaron a partir de materia orgánica marina, algal con aporte siliciclástico, depositados en un ambiente semiprofundo somero posiblemente de plataforma con aporte de materia orgánica de ambiente transicional.

5.9. ANÁLISIS DE FRACCIÓN POLAR DE CRUDOS BIODEGRADADOS

5.9.1. Obtención de extracto polar a partir de crudo. Los ácidos nafténicos del crudo, hacen parte de su fracción polar. En la extracción de ácidos nafténicos, se

realizaron pruebas preliminares mediante la extracción líquido-líquido por lotes con cambio de pH (básico → ácido), para obtener un extracto con menor número de interferencias. Los ensayos preliminares fueron realizados con la muestra de crudo C-MSTB, y analizados mediante GC-FID, FT-IR, HPLC-DAD. En la **Figura 104**, se muestra el esquema inicial propuesto para la determinación de compuestos polares en el crudo.

Figura 104. Esquema general de la metodología propuesta para la búsqueda de moléculas polares en muestra de crudo biodegradado.



Al crudo (ca. 20 g) se le adicionó *n*-hexano (50 mL) y se aplicó ultrasonido (T= 40°C, 10 min). Posteriormente, se realizó extracción líquido-líquido por lotes (ELLB) con una solución de NaOH 1% (EtOH:H₂O, 7:3 V/V). La separación de las fases se realizó en un medio con T= 4 °C y reposo (10 min). El extracto etanólico fue rotoevaporado a una presión reducida (200 mbar), T= 45°C, durante 15 min. A

la solución acuosa básica remanente, se le realizó *clean-up* con CH_2Cl_2 (2x20 mL). El pH fue ajustado a 2. Los ácidos nafténicos (neutros) fueron extraídos con CH_2Cl_2 (2x20 mL) y *n*-hexano (20 mL). El extracto fue llevado a sequedad con corriente de gas nitrógeno. Se obtuvo un 0.5% (p/p) de extracto con respecto a la masa inicial de crudo C-MSTB. Los extractos fueron analizados por FT-IR, HPLC-DAD, y GC-FID con y sin derivación.

Para el análisis por GC-FID (columna apolar), los extracto polares obtenidos fueron derivados previamente con un procedimiento de metilación. A la fracción polar (ca. 10 mg) se le adicionó 400 μL de la solución de BF_3/MeOH , en un vial de reacción, a una $T=70\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h. Posteriormente, el extracto hexanoico concentrado, fue analizado por GC-FID y GC-MS (*full scan*). Las etapas del procedimiento se muestran en las **Figuras 105 y 106**.

Figura 105. Etapas para la extracción de compuestos polares del crudo. 1. Sonicación. 2. ELLB con solución de NaOH etanólica. 3. Extracto polar.

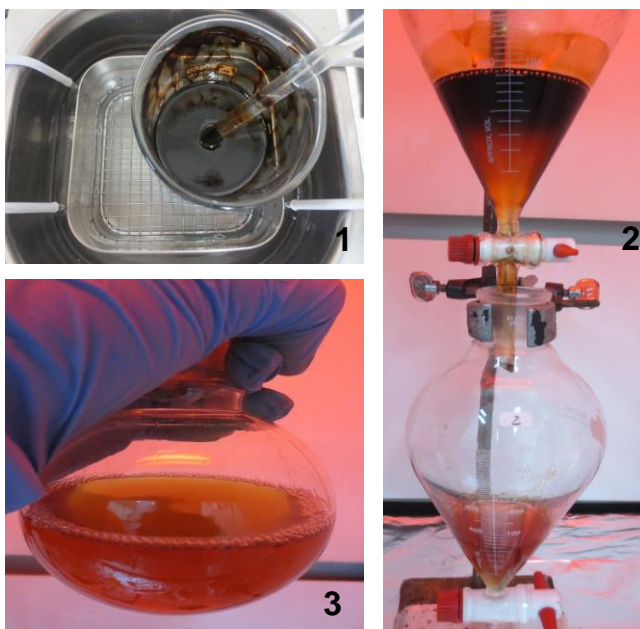
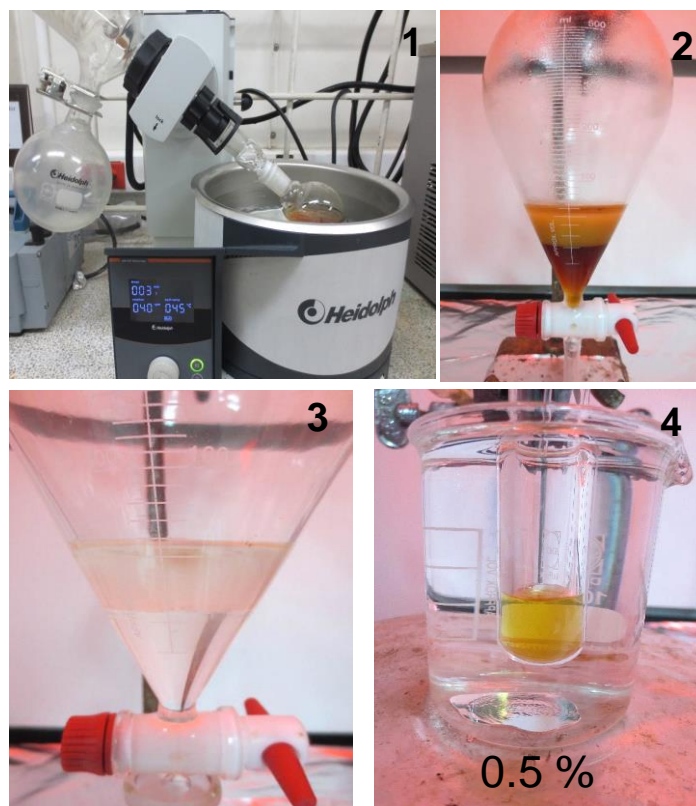
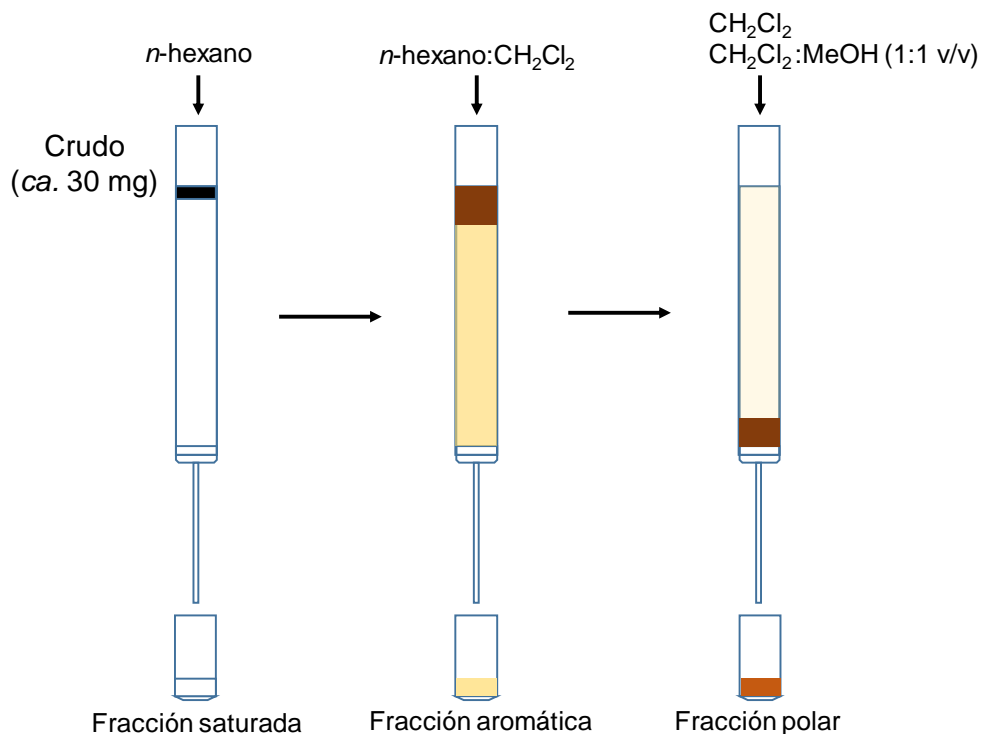


Figura 106. Etapas de *clean-up* y concentración de extracto polar del crudo. 1. Rotoevaporación de extracto con ácidos deprotonados. 2. Limpieza de extracto con CH_2Cl_2 . 3. Ajuste de pH y extracción con CH_2Cl_2 y *n*-hexano. 4. Concentración de ácidos nafténicos.



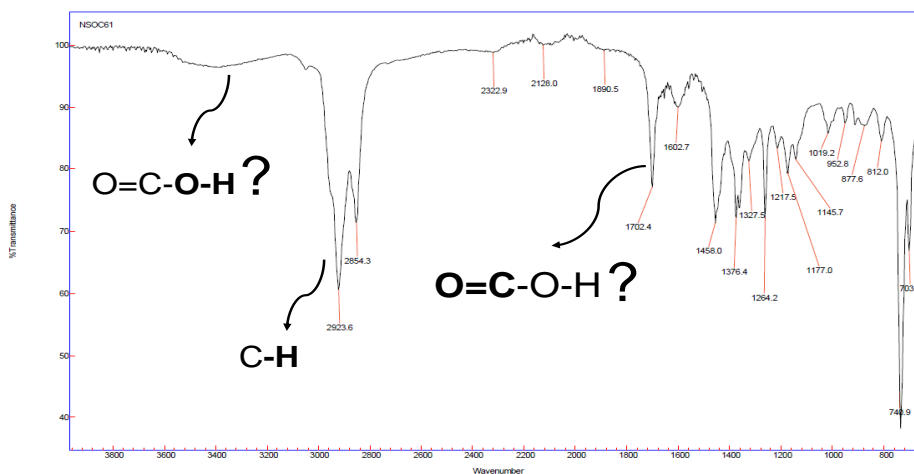
5.9.2. Fraccionamiento completo de crudo. Los extractos polares obtenidos por ELLB a partir de la muestra de crudo C-MSTB, también fueron comparados con la fracción polar del mismo crudo, en columna de elución con gel de sílice. La elución de resinas o fracción polar, se hizo con CH_2Cl_2 (4mL), y CH_2Cl_2 :MeOH (1:1V/V, 3 mL), posterior a la elución de saturados y aromáticos (véase **Figura 107**).

Figura 107. Fraccionamiento en columna de elución de crudo, con gel de sílice activada como sorbente.



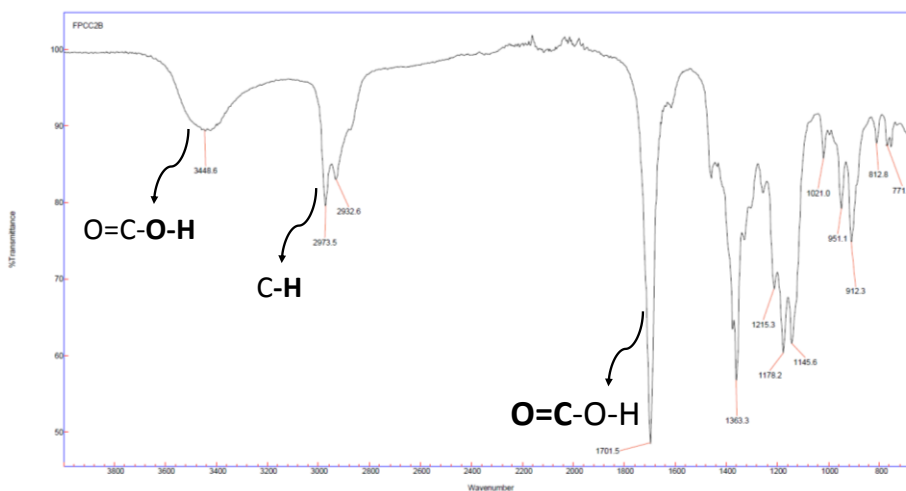
5.9.3. Análisis por FT-IR de fracciones y extractos polares de crudo. Los extractos y fracciones polares, fueron analizados por espectroscopia infrarrojo con transformada de *Fourier* (FT-IR). En la **Figura 108**, se muestra el espectro IR, de la fracción polar obtenida a partir de crudo C-MSTB (ca. 30 mg). En los espectros IR, de extractos que contengan moléculas con la función orgánica ácido carboxílico, se espera observar, bandas en la región de 3400 y 1700 cm⁻¹. En la fracción polar obtenida por columna de elución, aparece una banda a 1702 cm⁻¹, sin embargo, debe ser una de las más intensas, y confirmada por la tensión del OH en el grupo funcional ácido.

Figura 108. Espectro IR, fracción polar del crudo C-MSTB obtenida por columna de elución.



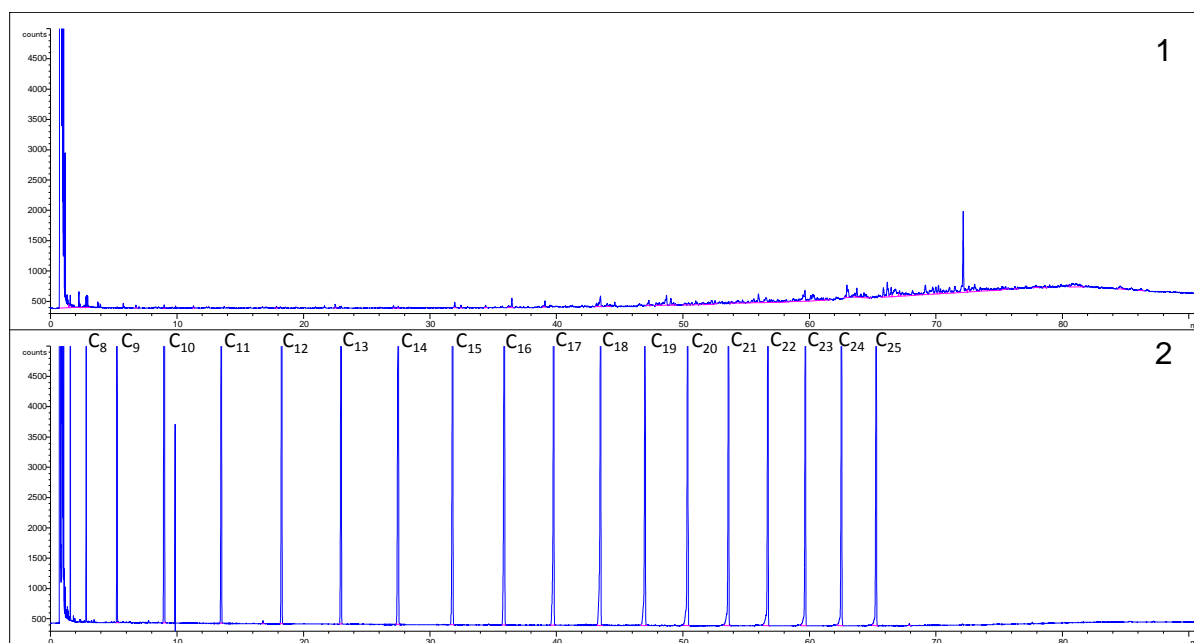
En la **Figura 109**, se muestra el espectro IR, del extracto polar obtenido a partir de ca. 20 g de crudo C-MSTB. Aparecen las bandas características de la función orgánica ácido carboxílico, tales como: 3449 cm^{-1} , y la banda más intensa 1702 cm^{-1} , que corresponde a la tensión del enlace $\text{O}=\text{C}$. La comparación de los espectros IR, entre los dos métodos de obtención de compuestos polares, permite concluir que la ELLB, contiene mayor cantidad de moléculas con la función ácido carboxílico (productos de biodegradación del crudo).

Figura 109. Espectro IR, extracto polar (ELLB) del crudo C-MSTB.



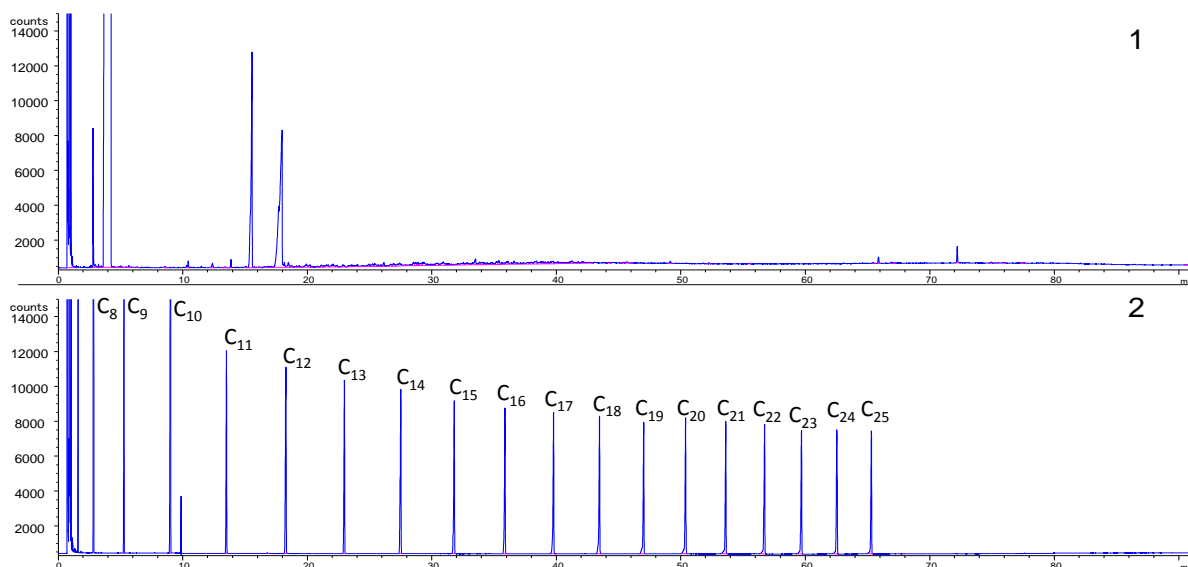
5.9.4. Análisis por GC-FID y GC-MS (*full scan*) de fracciones y extractos polares de crudo

Figura 110. Cromatograma obtenido por GC-FID de la fracción polar del crudo C-MSTB, obtenida por columna de elución y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). 1. Fracción polar del crudo. 2. Patrón de hidrocarburos lineales C₆-C₂₅.



En la comparación de las **Figuras 110** y **111**, perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID, de fracción y extracto polar, comparados con una mezcla de hidrocarburos lineales C₁₀-C₄₀. Se aprecia que sin derivación aparecen algunos picos abundantes en la corriente total registrada. Sin embargo, se realizó el análisis de los extractos polares derivados con trifluoruro de boro en metanol, y la mayoría de picos cromatográficos asimétricos, y otros que no se observaban, aumentaron su relación señal-ruido. Que sugiere la presencia de compuestos orgánicos tipo ácido carboxílico que reaccionaron para dar como productos los correspondientes metilésteres, de mayor presión de vapor.

Figura 111. Cromatograma obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenida por columna de elución y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 1. Extracto polar del crudo. 2. Patrón de hidrocarburos lineales C₆-C₂₅.



En la **Figura 112**, se muestra la comparación de blanco de procedimiento de extracción y reacción con metilésteres de ácidos carboxílicos extraídos a partir del crudo, y con un material de referencia de ácidos carboxílicos (metilados). Respecto a la abundancia de moléculas polares (O₂), el extracto obtenido mediante ELLB, mostró mayor cantidad de picos cromatográficos comparado con la fracción polar del mismo crudo. La comparación del perfil de metilésteres se comparó con los tiempos de retención de algunos ácidos carboxílicos (z=0), presentes en una mezcla patrón: C₅, C₆, C₈, C₁₀-C₁₈, C₂₀, C₂₂, C₂₃ y C₂₄.

Figura 112. Cromatograma obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenida por ELLB y analizada en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 1. Blanco de procedimiento. 2. Extracto polar del crudo. 3. Patrón de algunos metilésteres de ácidos nafténicos ($z=0$).

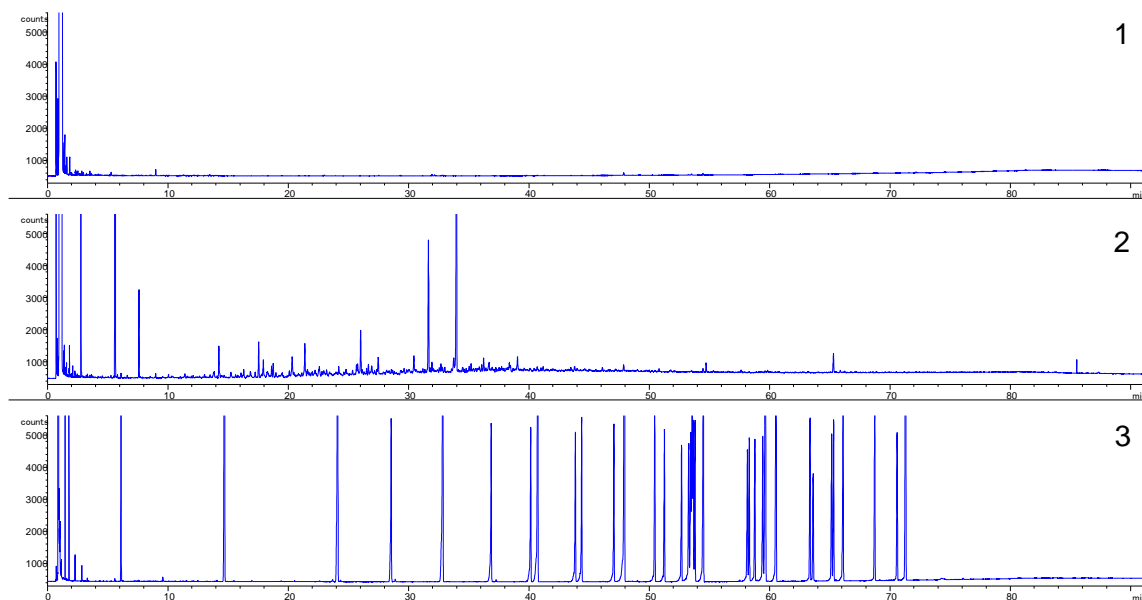
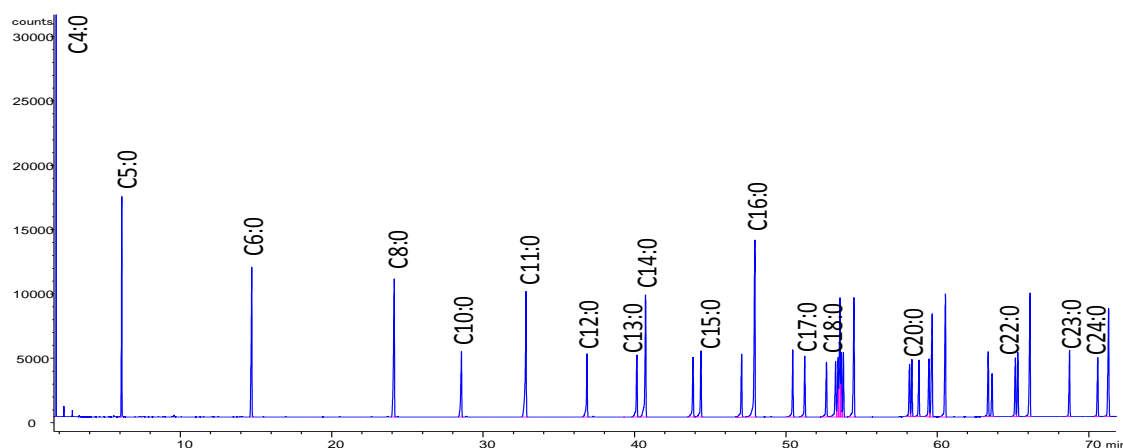
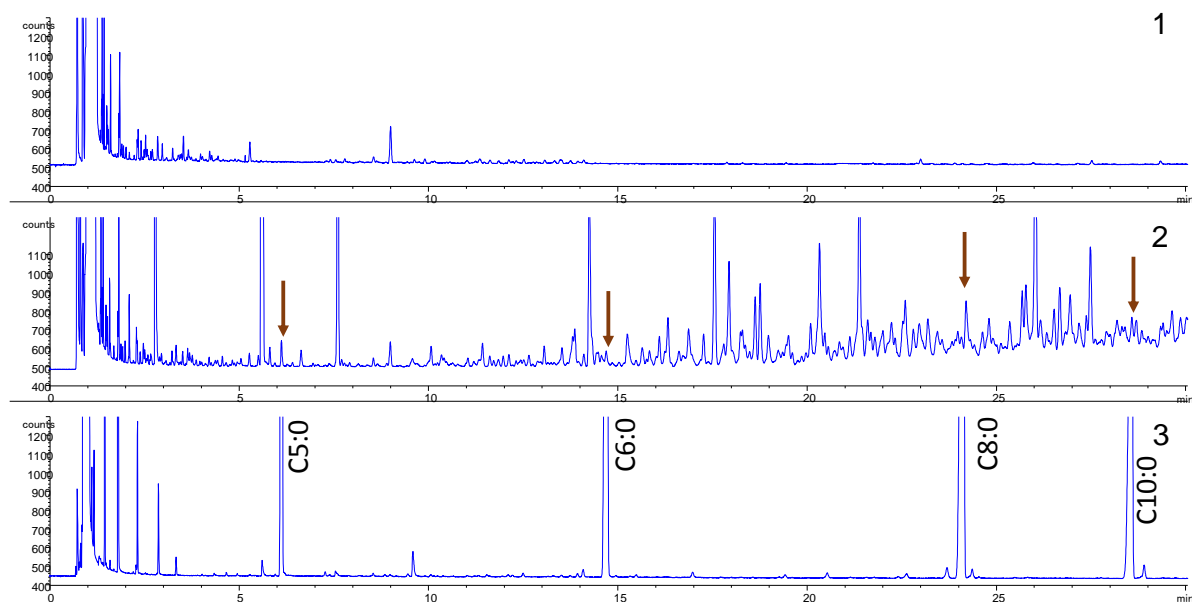


Figura 113. Cromatograma obtenido por GC-FID de una mezcla de metilésteres de ácidos nafténicos ($z=0$), y otros ácidos grasos, en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).



En las **Figuras 114, 115 y 116**, se muestran en detalle las ventanas de tiempo, en donde coinciden algunos tiempo de retención con algunos ácidos nafténicos lineales ($z=0$): con número de átomos de carbono: 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 16 y 22. Sin embargo, no es una identificación, únicamente coincidencia de tiempos de retención.

Figura 114. Cromatograma (0-30 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). 1. Blanco de procedimiento. 2. Extracto polar del crudo. 3. Patrón de metilésteres de ácidos grasos.



La identificación tentativa se realizó mediante el análisis por (GC-MS), mediante la comparación de los espectros de masas de un compuesto desconocido con alguna base de datos (eg. Willey, NIST).

Figura 115. Cromatograma (30-60 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 1. Blanco de procedimiento. 2. Extracto polar del crudo. 3. Patrón de metilésteres de ácidos grasos.

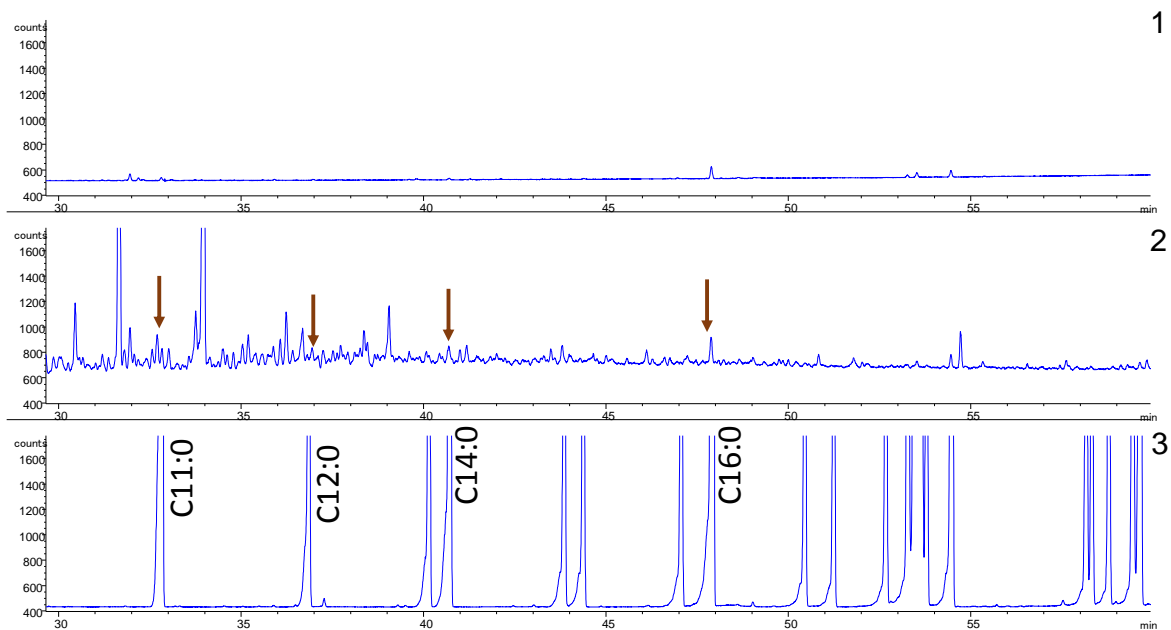
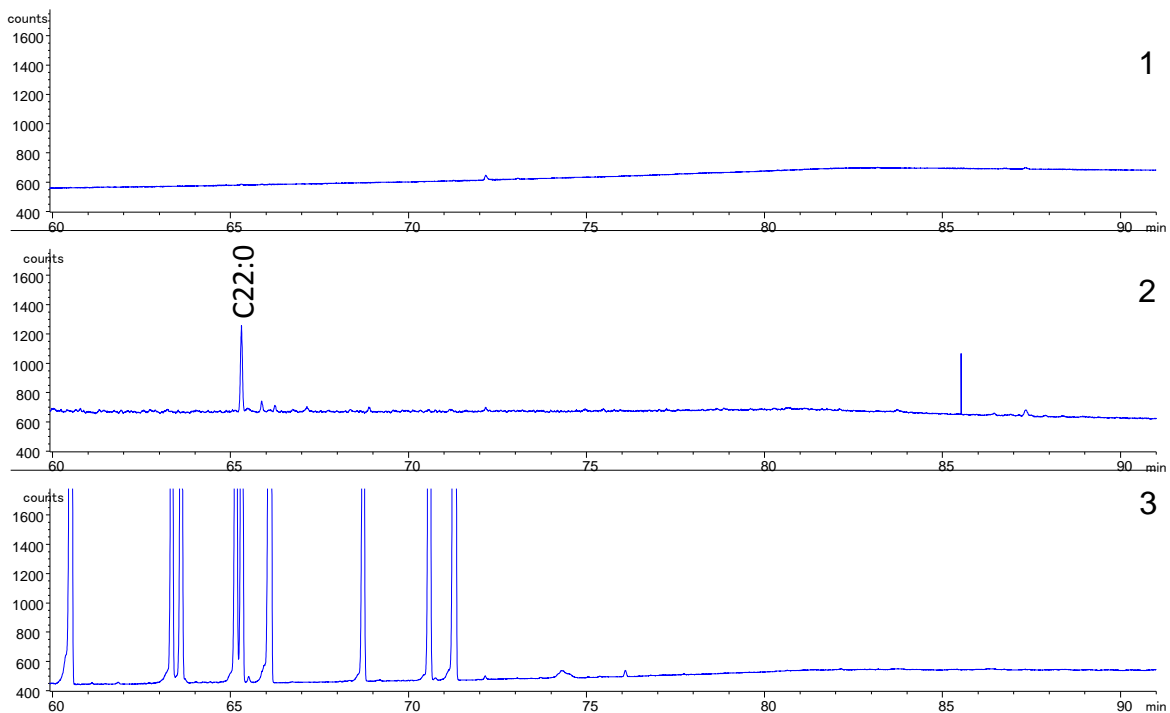
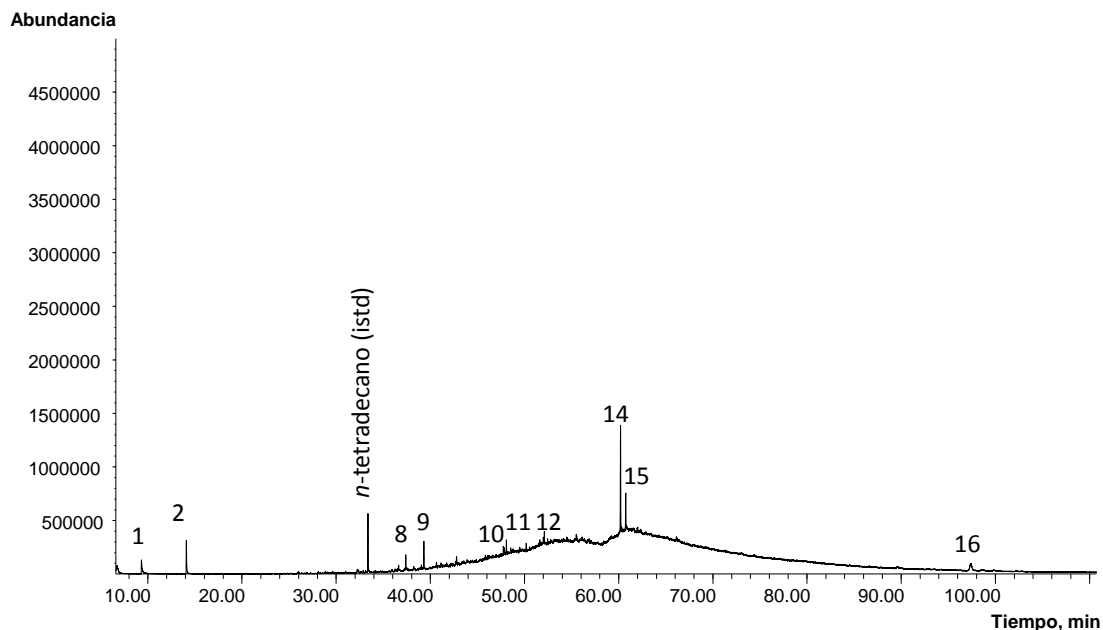


Figura 116. Cromatograma (60-92 min) obtenido por GC-FID del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por ELLB y analizado en columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). 1. Blanco de procedimiento. 2. Extracto polar del crudo. 3. Patrón de metilésteres de ácidos grasos.



En la **Figura 117**, se muestra el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS, del extracto polar más promisorio en el contenido de ácidos carboxílicos extraídos del crudo; la identificación según la comparación con las bases de datos se muestra en la **Tabla 28**.

Figura 117. Perfil cromatográfico del extracto polar del crudo C-MSTB, obtenido por GC-MS (*full scan*), columna DB-5 (30m x 0.25mm x 0.25µm).



De acuerdo con la **Tabla 26**, se logró confirmar metilésteres de ácidos carboxílicos, con 16 y 17 átomos de carbono, hexa- y heptadecanoico, respectivamente, que corresponden a los ácidos nafténicos, en general, más abundantes en los crudos. En menor cantidad, otros ácidos nafténicos: 4,5-dimetilciclooctanoato de metilo, hexadecanoato de metilo, 9-eicosenoato de metilo y 11-metildocosenoato de metilo.

En los procesos de biodegradación de algunos hidrocarburos poliaromáticos, por parte de bacterias sulforeductoras (SRB), se ha reportado la formación de moléculas aromáticas de menor peso molecular, tales como: di-*tert*-butilfenol, butilftalato de metilo y ftalato de etilhexenilo. La identificación tentativa se realizó con base en los espectros de masas de los compuestos identificados y su comparación con las bases de datos NIST y WILEY.

Tabla 26. Identificación tentativa de los componentes presentes en el extracto polar del crudo C-MSTB analizado por GC-MS.

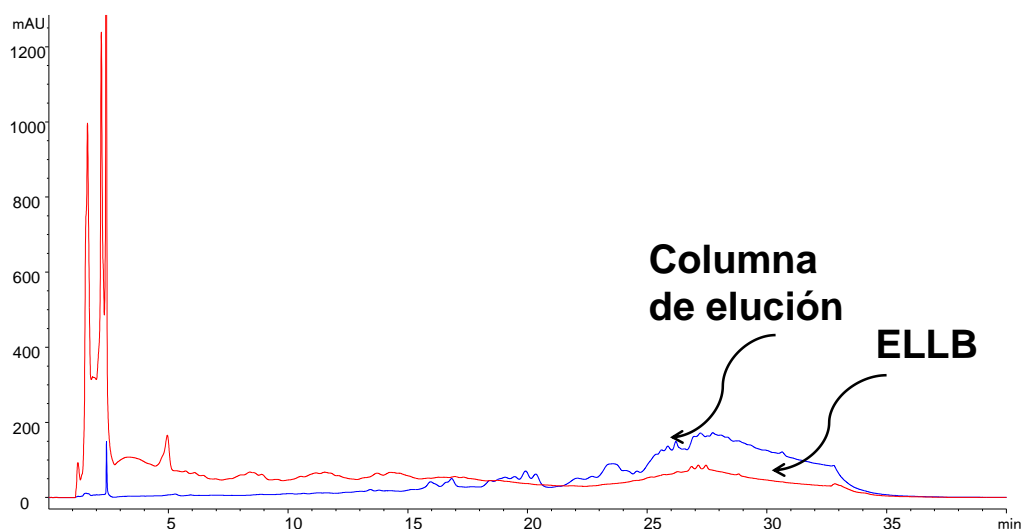
N° pico	IRL _{exp}	t _R , min	Compuesto	Cantidad relativa, %
1		9.31	4-Metil-3-penten-2-ona	8.5
2	910	14.08	4-Metoxi-4-metil-2-pentanona	11.6
3	1193	25.88	2,3-Dimetil-1-(2-butenil)-benceno	0.4
4	1368	32.22	4,5-Dimetilciclooctanoato de metilo	1.2
5	1480	36.27	Ácido carboxílico del 1,4-dimetiladamantano	1.6
6	1490	36.63	Compuesto no identificado (<i>m/z</i> 134(100), 162(54), 79(51), 135(51), 93(39))	1.6
7	1508	37.25	di- <i>tert</i> -butilfenol	0.9
8	1513	37.39	Compuesto oxigenado C ₁₄ H ₁₆ O	4.3
9	1574	39.31	Compuesto no identificado (<i>m/z</i> 185(100), 170(75), 200(32), 155(21), 186(16), 171(12))	7.3
10	1924	48.08	Hexadecanoato de metilo	3.7
11	2026	50.19	Butil-ftalato de metilo	3.1
12	2125	52.10	Heptadecanoato de metilo	3.3
13	2301	55.49	9-Eicosenoato de metilo	3.0
14		60.20	11-Metildocosenoato de metilo	28.7
15		60.75	Ftalato de etilhexenilo	9.0
16		97.40	Compuesto no identificado (<i>m/z</i> 441(100), 57(54), 147(), 308, 191)	11.8

5.9.5. Análisis por HPLC-DAD de fracciones y extractos polares de crudo.

Las fracciones y extractos polares de crudo fueron analizados por HPLC-DAD previo al análisis mediante UHPLC-Orbitrap-MS, usando una columna ZORBAX (C18), 150 mm x 4.6 mm x 5 µm, un volumen de inyección V_{iny}: 10 µL,

flujo: 1 mL/min, temperatura: 25 °C, $\lambda = 210, 240, 270, 310, 350$ nm. La fase móvil fue ácido acético 0.5% acuoso (A): acetonitrilo(B), modo gradiente.

Figura 118. Comparación de perfiles cromatográficos de compuestos polares extraídos con etanol:agua (70:30) pH 11-12 y fracción polar obtenida en columna de elución, en muestras de crudo C-MSTB. Análisis por HPLC-DAD ($\lambda = 270$ nm), columna ZORBAX (C18), 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m.



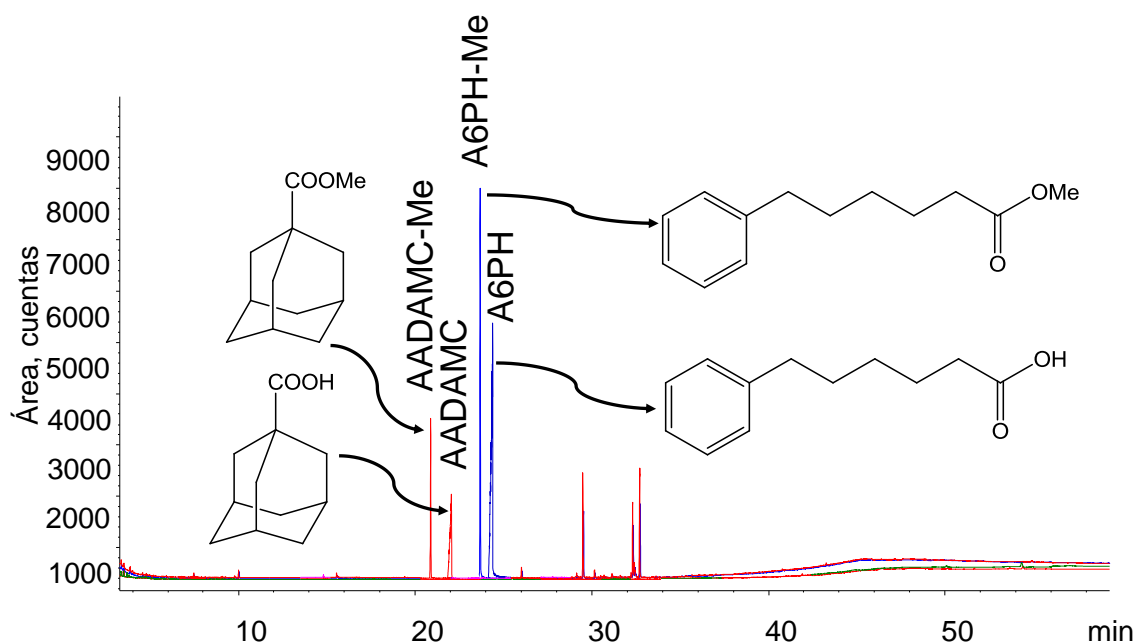
Los extractos polares obtenidos mediante ELLB, con cambio de pH para la selectividad de moléculas tipo ácido carboxílico, mostraron mayor concentración de moléculas tipo ácido carboxílico (**Figura 118**). Sin embargo, la cantidad necesaria para cada ensayo es ca. 20 g, para el reconocimiento de los ácidos nafténicos mayoritarios. En la mayoría de casos la cantidad de crudo disponible para diferentes ensayos es una limitante. Por ende, el análisis se enfocó en ácidos nafténicos con fórmula general $C_nH_{2n+z}O_2$, donde z hace referencia a la deficiencia de hidrógeno y n al número de átomos de carbono en la estructura química, entre otros productos de biodegradación generados por degradación bacteriana de hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular (eg. fenantrenos, pirenos, entre otros), **ANEXO 4**.

5.9.6. Fraccionamiento selectivo en columna de elución. De acuerdo con la afinidad de los analitos, un solvente o mezcla apropiada permite el fraccionamiento selectivo a partir de una mezcla de determinada complejidad (eg. crudo). Han sido reportadas condiciones de fraccionamiento en columna para el análisis de biomarcadores saturados, aromáticos y una fracción polar, altamente concentrada en resinas. Respecto a los métodos de obtención de fracciones polares, enriquecidas en compuestos de tipo ácido carboxílico, las estrategias han consistido en cambios de pH, empaquetamiento con modificadores como hidróxidos (eg. sodio, potasio), entre otras como cartuchos de intercambio iónico (amina cuaternaria) o grupos funcionales tipo amina secundaria. Debido a la complejidad de las muestras de crudo biodegradado, las pruebas iniciales de fracciones polares promisorias, se hicieron por GC-FID.

5.9.7. Formación de metilésteres a partir de ácidos nafténicos. Las condiciones para la determinación de ácidos carboxílicos (eg. ácidos nafténicos) en el crudo, se encontraron mediante el uso de estándares internos, a saber: ácidos 1-adamantanocarboxílico y 6-fenilhexanoico, y una mezcla técnica de ácidos nafténicos, para la comparación de las abundancias de las especies ácidas O_2 .

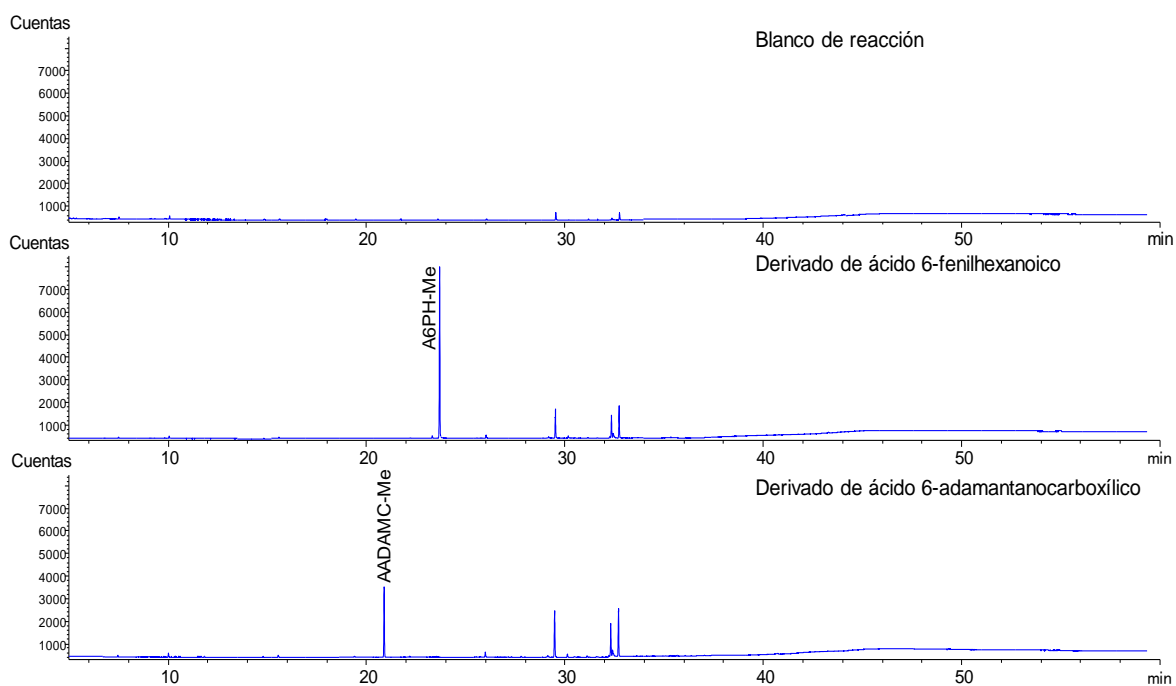
En la **Figura 119**, se muestra el perfil cromatográfico obtenido por GC-FID de los estándares internos de ácidos carboxílicos, 1-adamantanocarboxílico y 6-fenilhexanoico, en orden de elución respectivo. Se observa coherencia en el orden de elución, el éster metílico (de menor temperatura de ebullición) tiene menor tiempo de retención que su ácido precursor. La aromaticidad del 6-fenilhexanoico, aumenta el tiempo de retención en la columna DB-5, con respecto al ácido 1-adamantanocarboxílico, debido a interacciones tipo π , más fuertes que interacciones tipo *Van der Waals* entre moléculas saturadas y la columna cromatográfica.

Figura 119. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos con y sin derivación (metilación), columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. AADAMC: ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico. A6PH: ácido 6-fenilhexanoico.



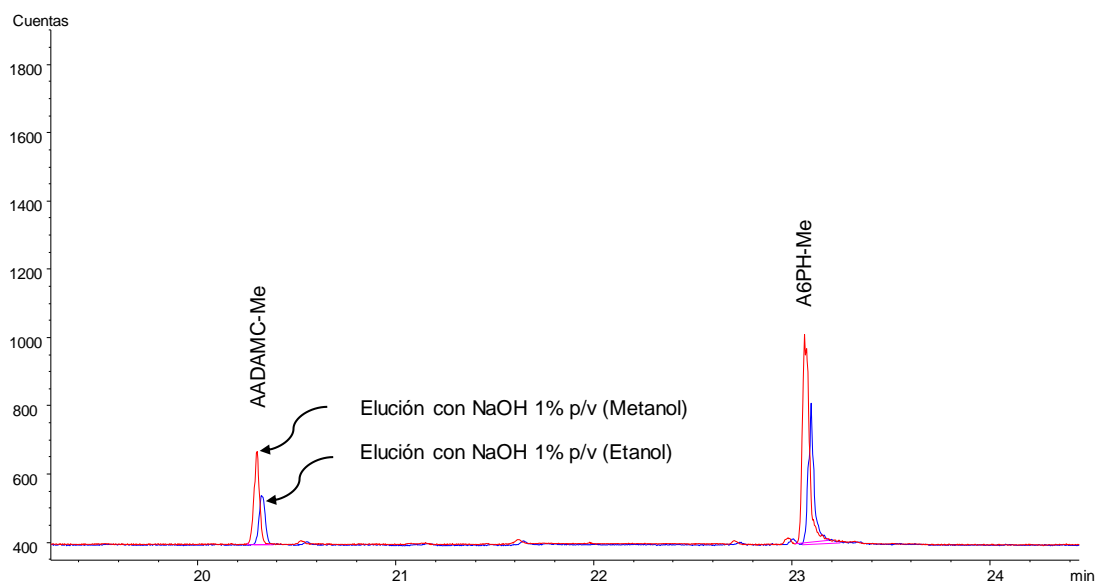
En los perfiles cromatográficos de los ésteres metílicos de los materiales de referencia, se observaron picos adicionales, posteriores a la elución de los estándares internos metilados. En la **Figura 120**, se muestra el perfil cromatográfico del blanco de procedimiento de derivación de los estándares internos. Entre 28-32 min, se observan algunos picos cromatográficos, que no corresponden a productos secundarios de derivación de los estándares, debido a que en el blanco de procedimiento están presentes. En los perfiles obtenidos se corrobora la reacción completa del grupo funcional ácido carboxílico al correspondiente metiléster.

Figura 120. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos con y sin derivación (metilación) y blanco de procedimiento, columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico.



5.9.8. Condiciones de elución en columna de fraccionamiento selectivo. En el fraccionamiento propuesto para la determinación de ácidos nafténicos en crudo C-GQ-1, se obtienen dos fracciones. La primera (F1), diclorometano (3 mL) que eluye compuestos saturados, aromáticos y algunos de mayor peso molecular (resinas o asfaltenos). La fracción F2, fue eluída bajo el principio de deprotonación de moléculas tipo ácido carboxílico en presencia de una base fuerte. De acuerdo con la **Figura 121**, se observa el efecto sobre la abundancia de pico cromatográfico del solvente etanol o metanol, modificado con NaOH (1% p/v). La abundancia de pico observada en el perfil cromatográfico, fue mayor al eluir con metanol.

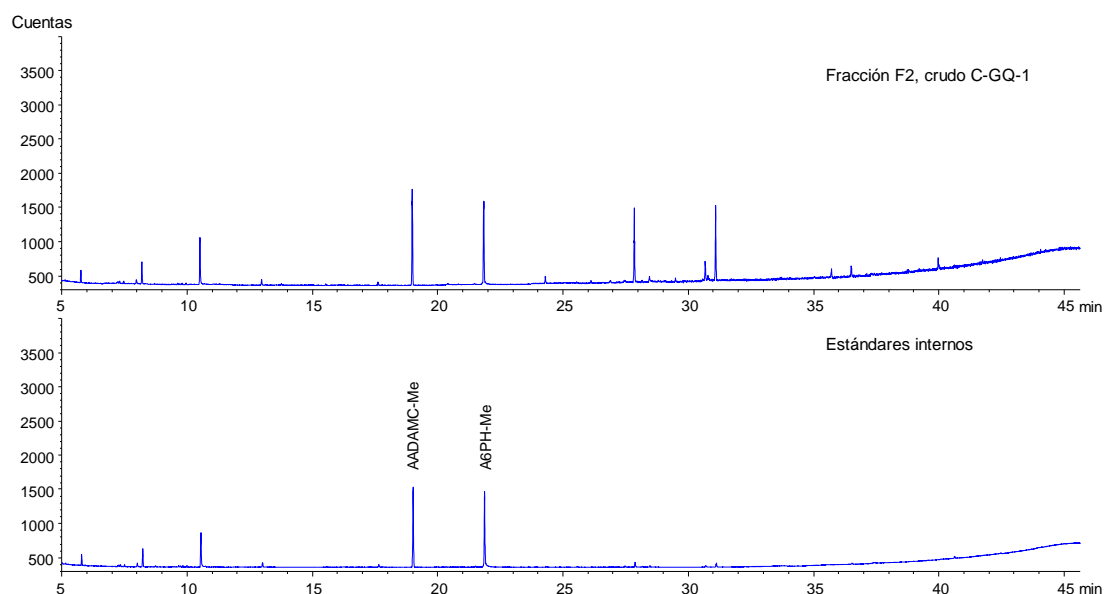
Figura 121. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción obtenida con metanol y etanol modificados con hidróxido de sodio 1% p/v, columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico.



El volumen para la elución selectiva de los compuestos tipo ácido carboxílico del crudo fraccionado en columna, se determinó mediante el porcentaje de recuperación de los estándares internos ácido 1-adamantanocarboxílico (AADAMC) y ácido 6-fenilhexanoico (A6PH), inicialmente en la muestra de crudo C-GQ-1. En la **Figura 125**, se muestra el comportamiento obtenido para la elución de la fracción F2, con diferentes volúmenes (0.5 – 6 mL) de NaOH 1% p/v (metanol). AADAMC y A6PH, tuvieron porcentajes de recuperación superiores al 86 %. Respecto al volumen de elución de la fracción polar F2, entre 1.7 – 6 mL de la solución de hidróxido de sodio 1% p/v (metanólica) se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 86 y 105 por ciento, sin diferencias significativas en el rango. Así, cualquier volumen comprendido entre 1.7 – 6 mL, permite la elución de compuestos ácido carboxílico saturados y aromáticos.

Las condiciones de fraccionamiento selectivo encontradas, permitieron obtener porcentajes de recuperación entre 67 y 133% para los estándares internos de ácidos carboxílicos. Sin embargo, en la **Figura 122**, se observa la presencia de algunas interferencias en la región de 27-34 min.

Figura 122. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador obtenida a partir del crudo C-GQ-1 enriquecido con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico.



La formación de carboxilatos mediante el tratamiento con base fuerte (NaOH 1% p/v) de ácidos carboxílicos en solución acuosa, fue la estrategia utilizada para la limpieza o *clean-up* de las fracciones F2 obtenidas para las diferentes muestras de crudo. Los perfiles cromatográficos mostrados en la **Figura 123**, indican una disminución sustancial de las interferencias señaladas anteriormente, sin afectar los porcentajes de recuperación de los ISTD de ácidos carboxílicos, que estuvieron entre 92 y 94%.

La limpieza de las fracciones F2 se realizó por disolución en diclorometano, posteriormente se adicionó agua tipo I al medio. En la fase orgánica, presumiblemente fueron disueltas las interferencias responsables de la coloración. La cantidad remanente de hidróxido de sodio en medio acuoso, disolvió las moléculas tipo ácido nafténico. El ajuste de pH < 2, y posterior extracción con diclorometano y *n*-hexano, y finalmente reconstitución en formiato de amonio 5 Mm en metanol, permitió obtener extractos (veáse **Figura 124**) que no contaminaran el equipo UHPLC-Orbitrap-MS.

Figura 123. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador (*clean-up*) obtenida a partir del crudo C-GQ-1 enriquecido con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 μ m). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico.

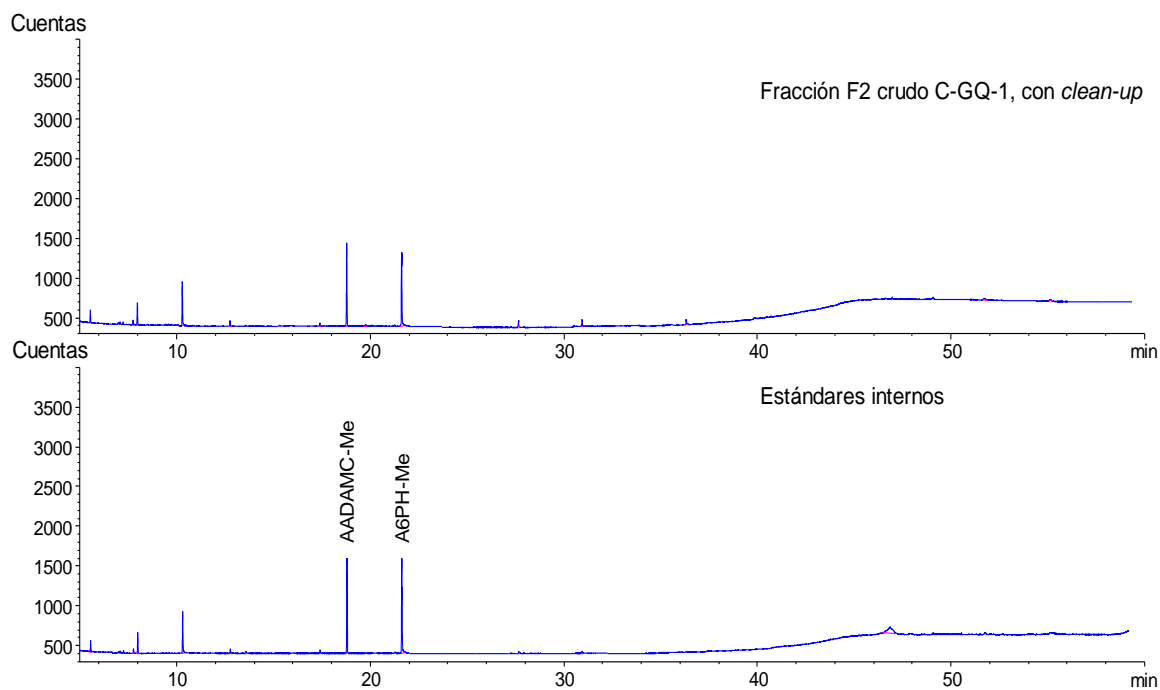


Figura 124. Cambios en la coloración de la fracción F2 (A), y después (B) del procedimiento de limpieza.

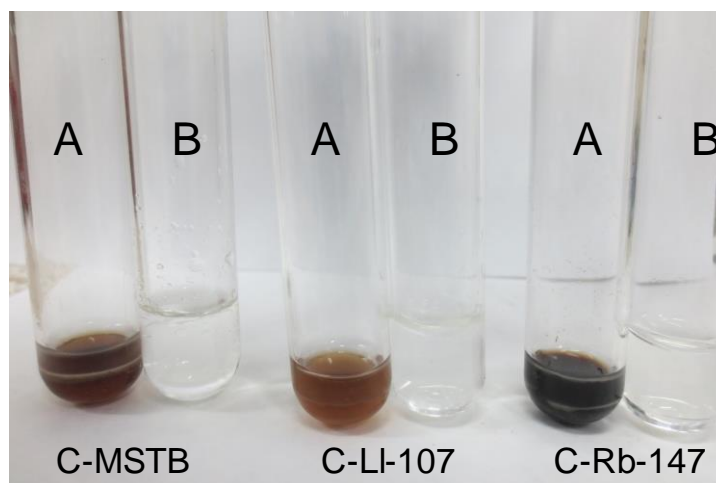
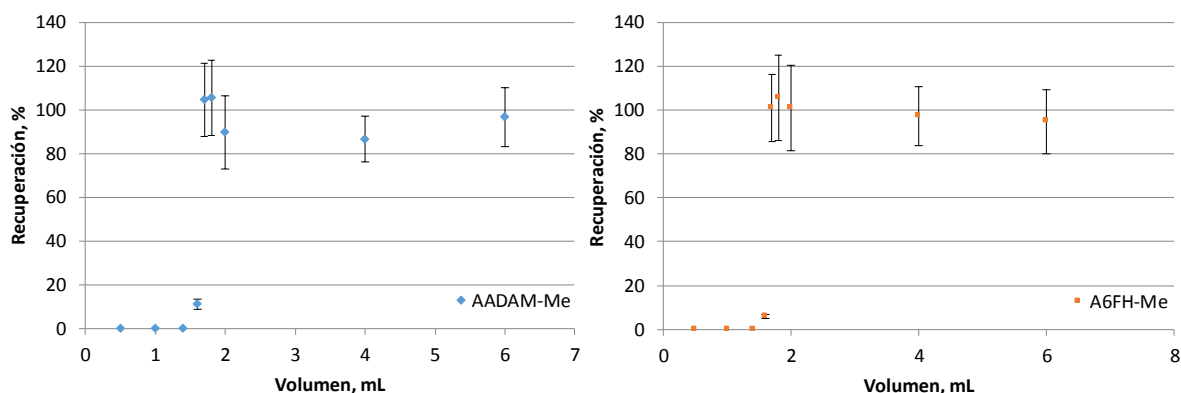


Figura 125. Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GQ-1 enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2.



La gravedad API de los crudos, prescinde de diferentes valores de fluidez y solubilidad en solventes orgánicos. Las curvas de recuperación de los estándares internos ácidos carboxílicos (AADAMC y A6PH), se determinaron para muestras de crudo con diferente valor de gravedad API. En las **Figuras 126 y 127**, se muestra que el comportamiento es semejante al crudo C-GQ-1, siendo 1.7 – 6 mL

de la solución de hidróxido de sodio 1% p/v (metanólica), el rango de volúmenes de elución que permitió recuperación entre 67 y 133 por ciento.

Figura 126. Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GL-1 enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2.

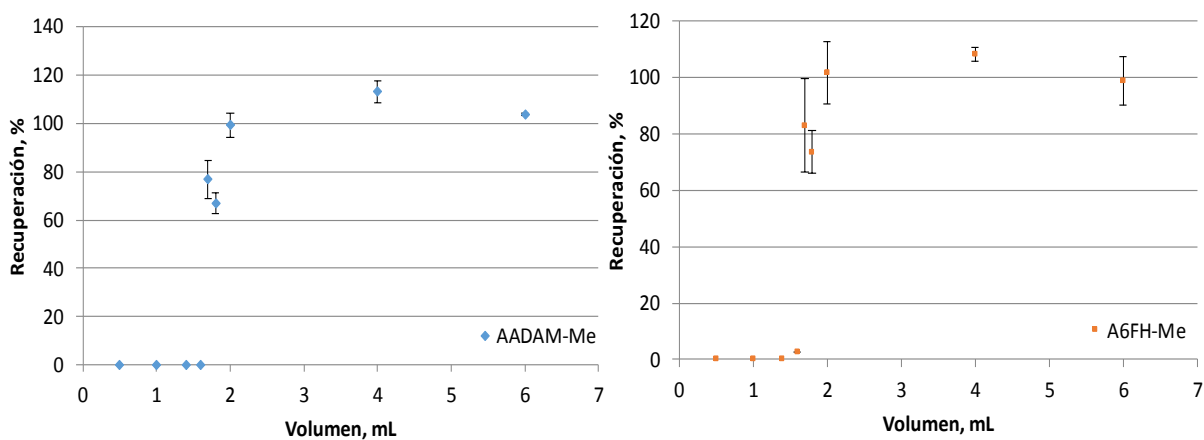


Figura 127. Recuperación de estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación) en la fracción F2 a partir de la muestra de crudo C-GTQ-22 enriquecida en 3 ppm y fraccionada selectivamente mediante diferentes volúmenes de elución con hidróxido de sodio 1% p/v (metanol), n=2.

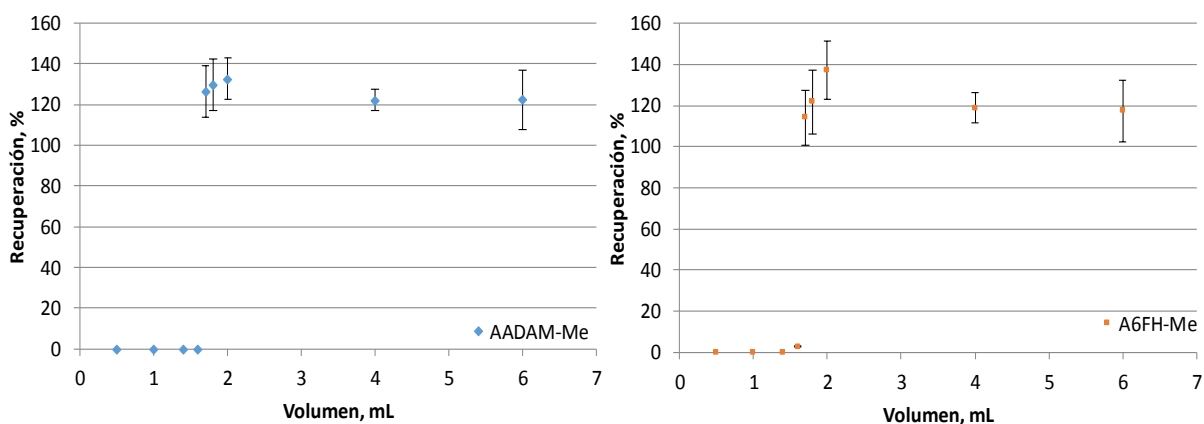
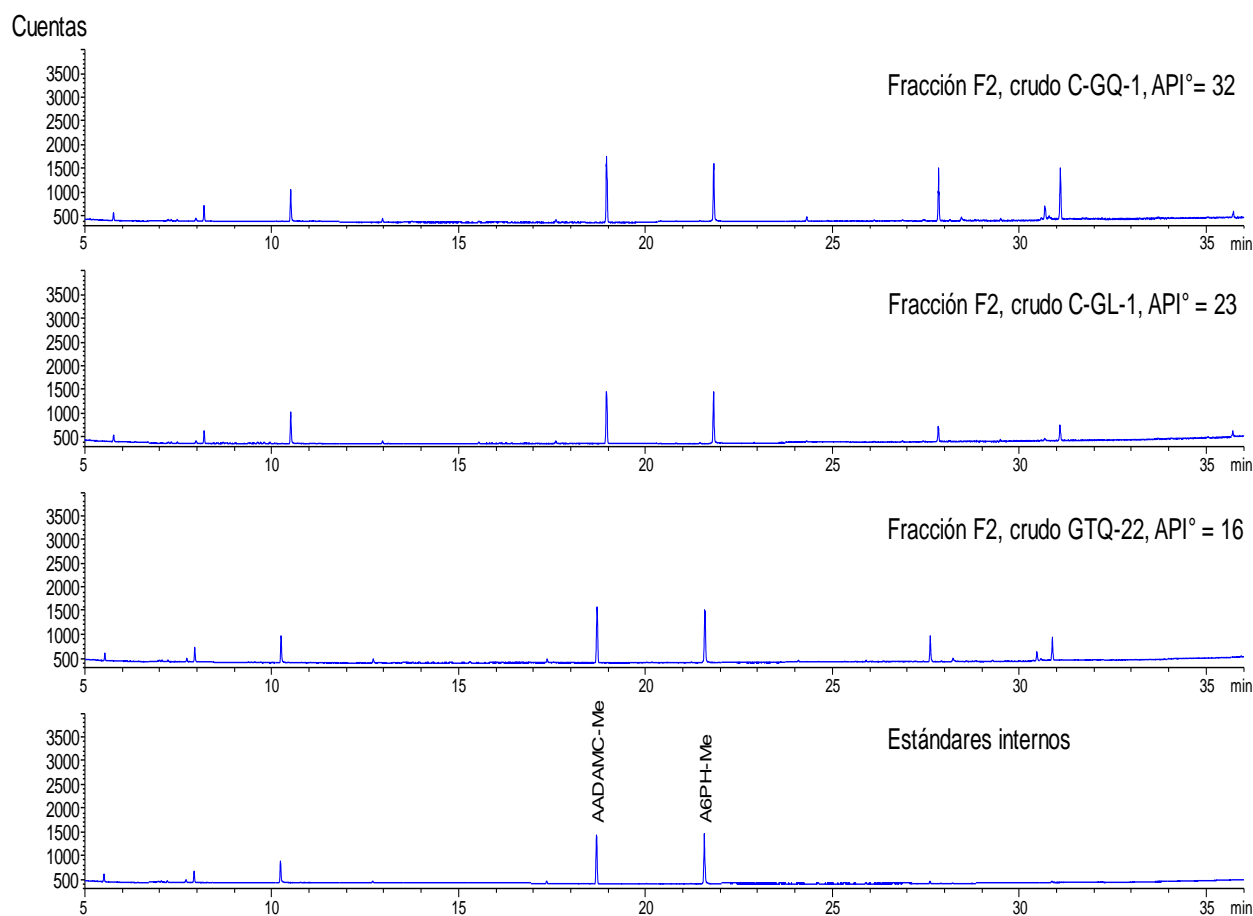


Figura 128. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de fracción F2 metanólica con modificador de crudos de diferentes gravedad API°, enriquecidos con estándares internos de ácidos carboxílicos derivados (metilación), columna DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 µm). AADAMC-Me: éster metílico del ácido 1-adamantanocarboxílico. A6PH-Me: éster metílico del ácido 6-fenilhexanoico.



5.10. ANÁLISIS DE FRACCIONES POLARES POR UHPLC-ORBITRAP-MS

En la **Figura 129**, se observa la corriente iónica total de la mezcla técnica de ácidos náfténicos de referencia. El perfil incluye todas las relaciones masa sobre carga (80-1000 u.m.a), para las moléculas deprotonadas en presencia de formiato de amonio como modificador. De ahí que el perfil no posea picos cromatográficos definidos. Sin embargo, en la **Figura 130**, se muestra la corriente iónica extraída

(m/z 255.23241) correspondiente a uno de los ácidos nafténicos (C_{18} , $z=0$) más abundantes en las muestras de crudo. Se observa un pico cromatográfico para la masa exacta extraída de la corriente iónica total obtenida mediante UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz en modo negativo.

Figura 129. Corriente iónica total obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI (-) de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.

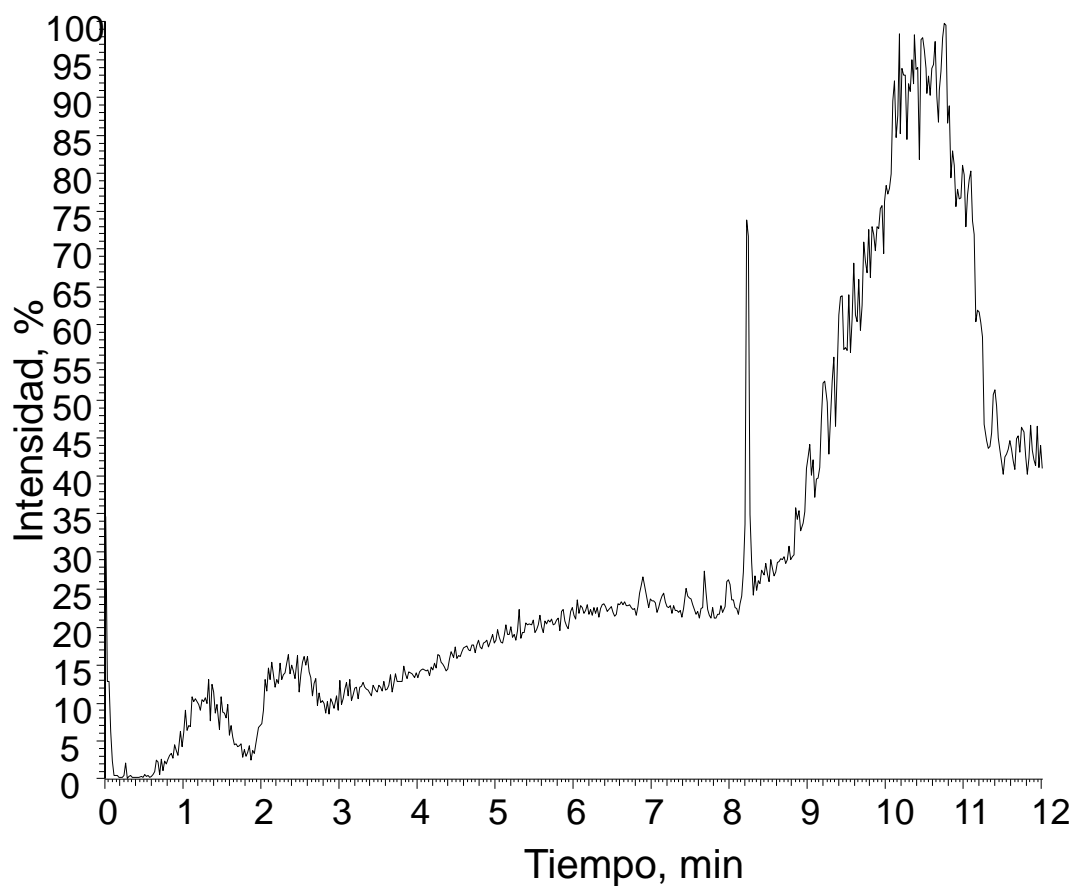


Figura 130. Fragmentograma de masas [M-H]⁻: 255.23241 (C₁₆, z=0) obtenido por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.

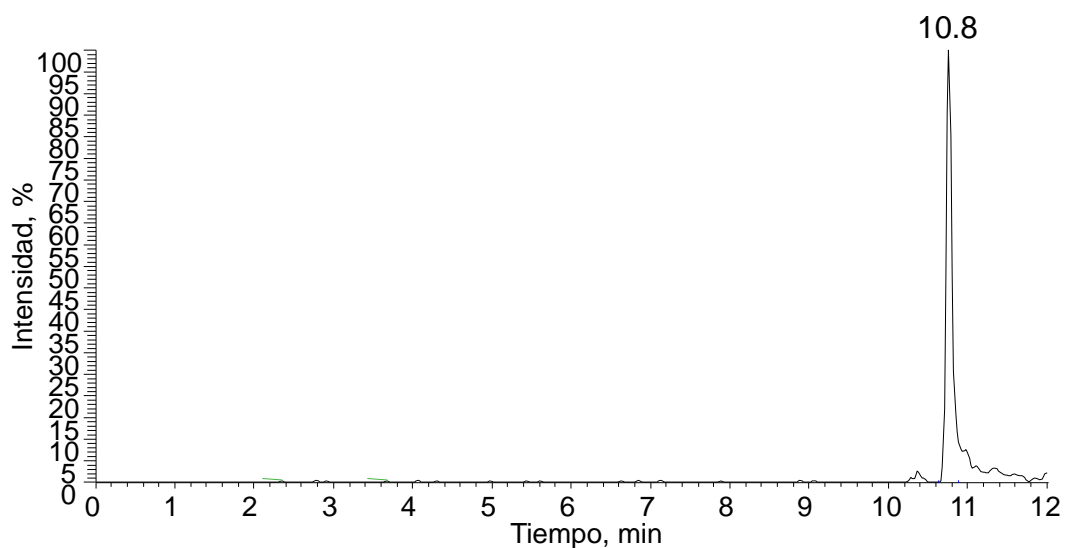
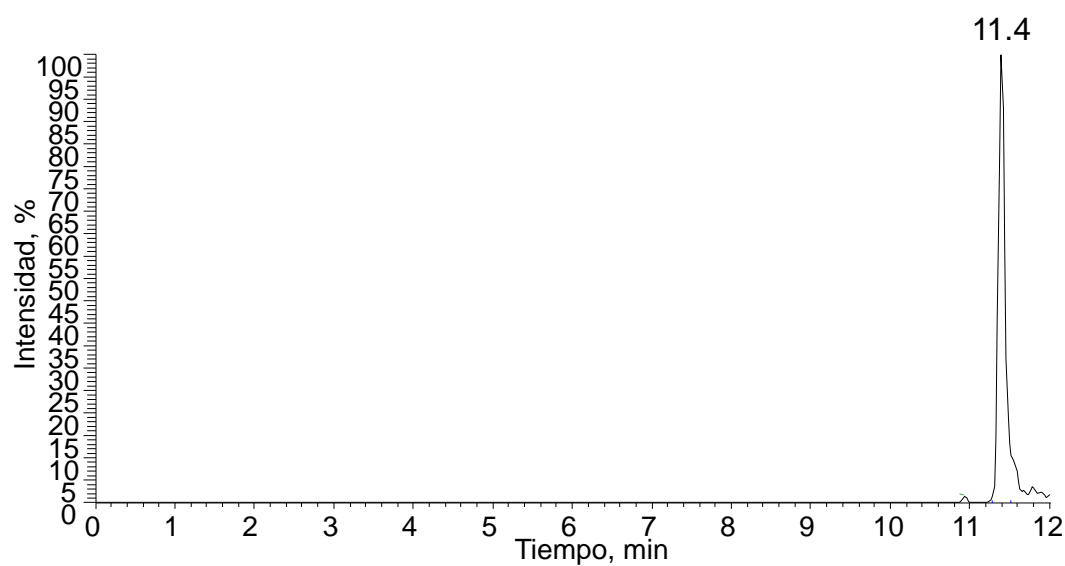
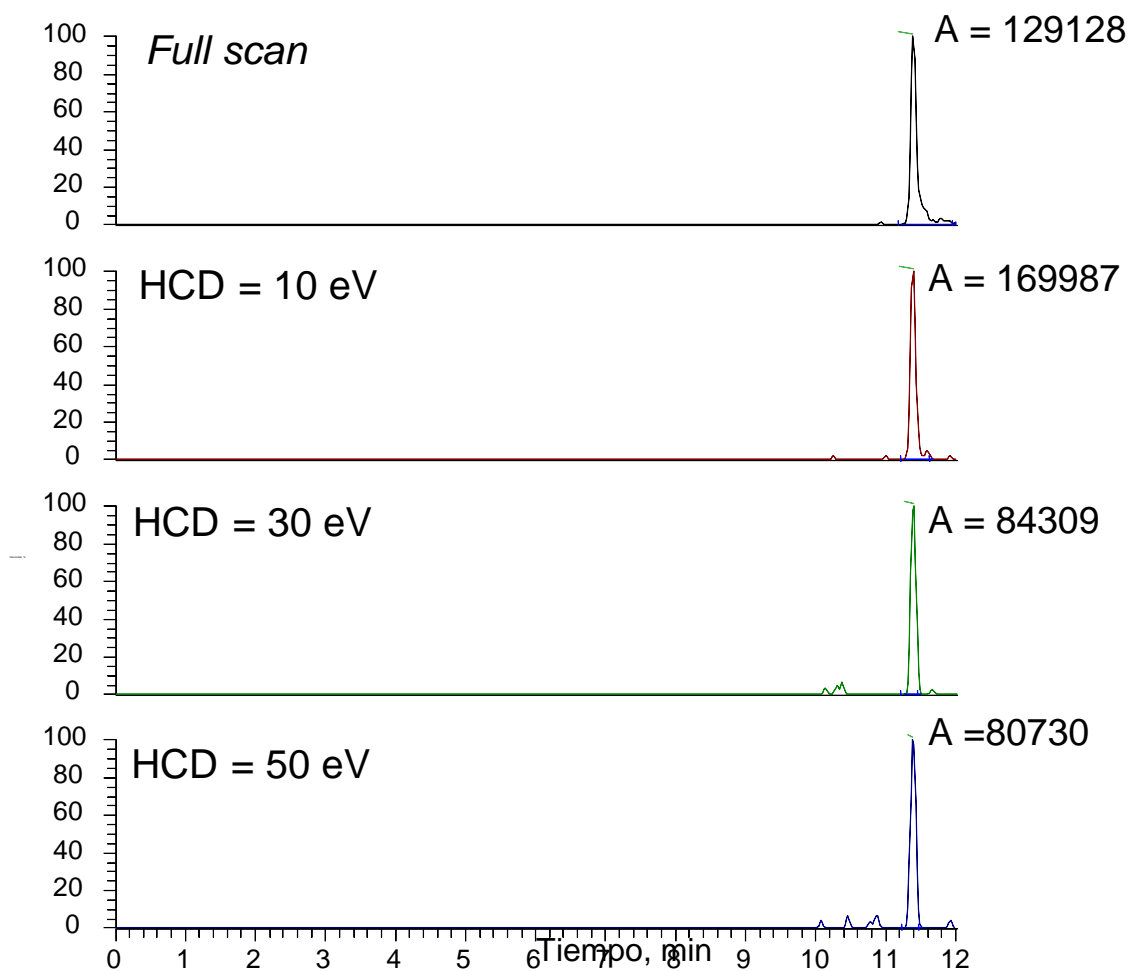


Figura 131. Fragmentograma de masas [M-H]⁻: 283.26371 (C₁₈, z=0) obtenido por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.



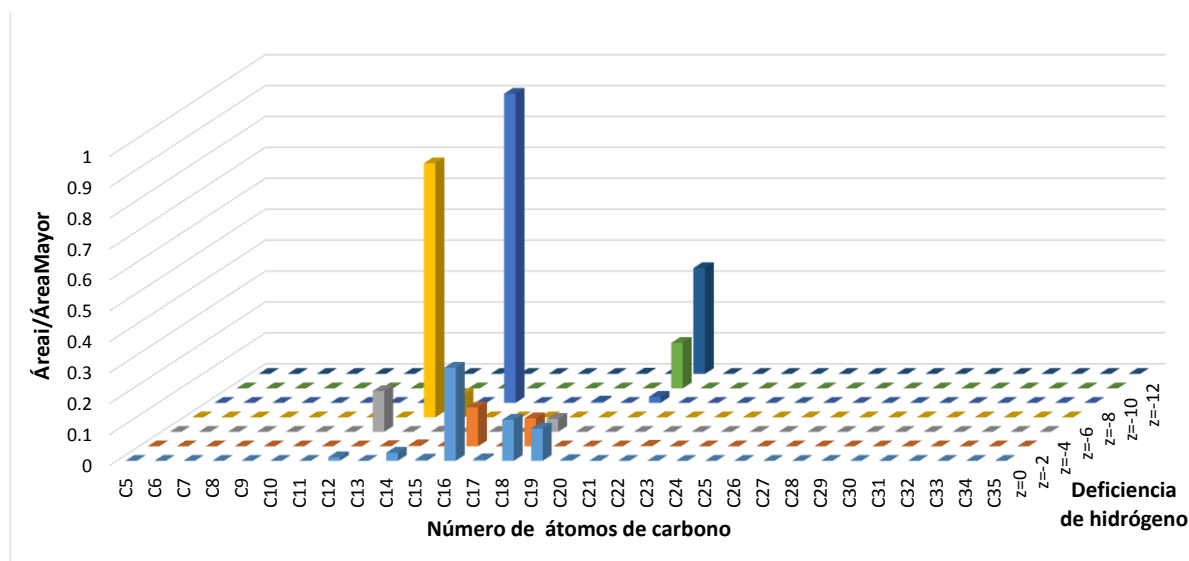
En la **Figura 131**, se observa el pico cromatográfico definido para la el ácido nafténico de 18 átomos de carbono y ninguna deficiencia de hidrógeno ($z=0$) por formación de ciclos. En algunos casos, aparecieron dos o tres picos cromatográficos, debido a la baja concentración del compuesto ácido carboxílico determinado. Con base en la exactitud entre masas teórica y experimental se calculó el parámetro Δppm ; cuyo criterio fue valores menores o iguales que 1.

Figura 132. Fragmentograma de masas $[\text{M-H}]^-$: 255.23241 (C_{16} , $z=0$) obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- con diferentes energías HCD (10, 30 y 50 eV) de la mezcla técnica de ácidos nafténicos de referencia certificada.



En el método de análisis de ácidos nafténicos por UHPLC-Orbitrap-MS, no solo se ajustó el pH, 2 unidades por encima del pKa de los compuestos, sino que se usó una fase móvil (agua y metanol) afín con las características estructurales de los compuestos ácidos. En la **Figura 132**, se muestran las corrientes iónicas de la mezcla técnica de ácidos nafténicos a tres valores diferentes de *higher-energy collisional dissociation* (HCD) 10, 30 y 50 eV. Todas las moléculas mostraron mejor abundancia de pico cromatográfico con el uso de una energía de 10 eV. Con base en la exactitud de masas (Δppm) se determinaron los ácidos nafténicos y otros productos de biodegradación en las muestras de crudo procedentes de la cuenca Llanos Orientales, Central y VMM.

Figura 133. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la mezcla técnica de referencia certificada.



La búsqueda de ácidos nafténicos en la mezcla técnica certificada y muestras de crudo biodegradado, se realizó con base en las masas exactas de las posibles especies ácidas calculadas con la fórmula general $\text{C}_n\text{H}_{2n+z}\text{O}_2$. En la **Figura 133**, se muestra la abundancia normalizada para la mezcla técnica de ácidos nafténicos,

donde los ácidos nafténicos lineales con 15, 17 y 19 átomos de carbono son los abundantes. Sin embargo, la máxima abundancia corresponde a C₁₄, z=-8 y C₁₂, z=-6, respectivamente.

La abundancia de ácidos nafténicos sin deficiencia de hidrógeno (z=0) observada en la **Figura 134**, es la más alta entre las muestras de crudo analizadas por UHPLC-Orbitrap-MS. La abundancia de ácidos nafténicos entre C₁₂-C₁₇ es la más alta, y en menor proporción, con deficiencia de z=-2,-4 y -6. Sin embargo, efectos de biodegradación son notorios en la muestra de crudo C-GL-1 (**Figura 135**), en el que compuestos ácido carboxílicos lineales (z=0) disminuyen notoriamente, y abundan C₁₈, z=-12.

Figura 134. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-GQ-1.

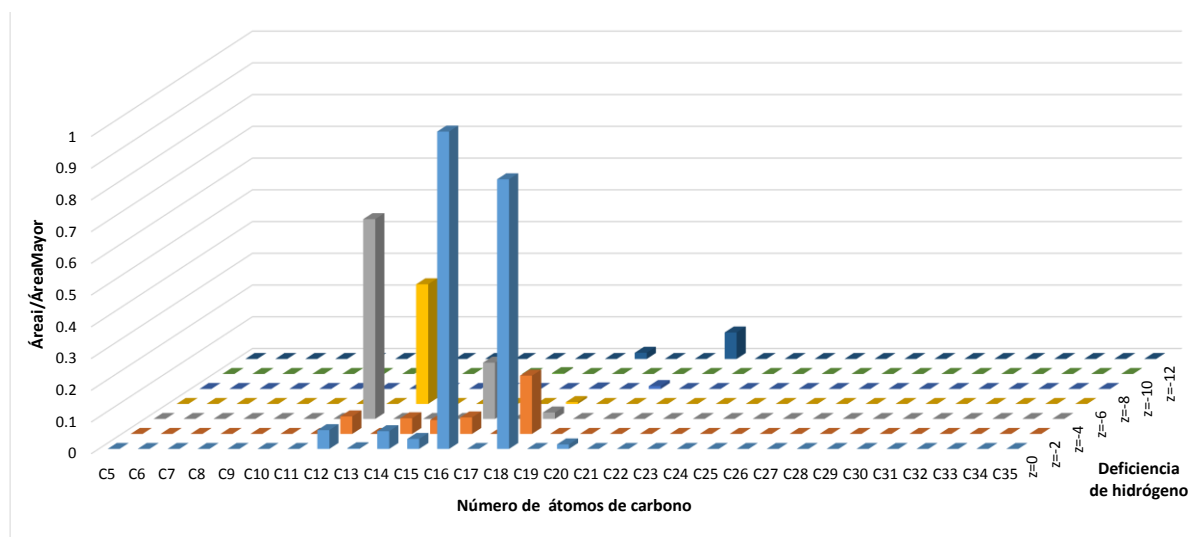


Figura 135. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-GL-1.

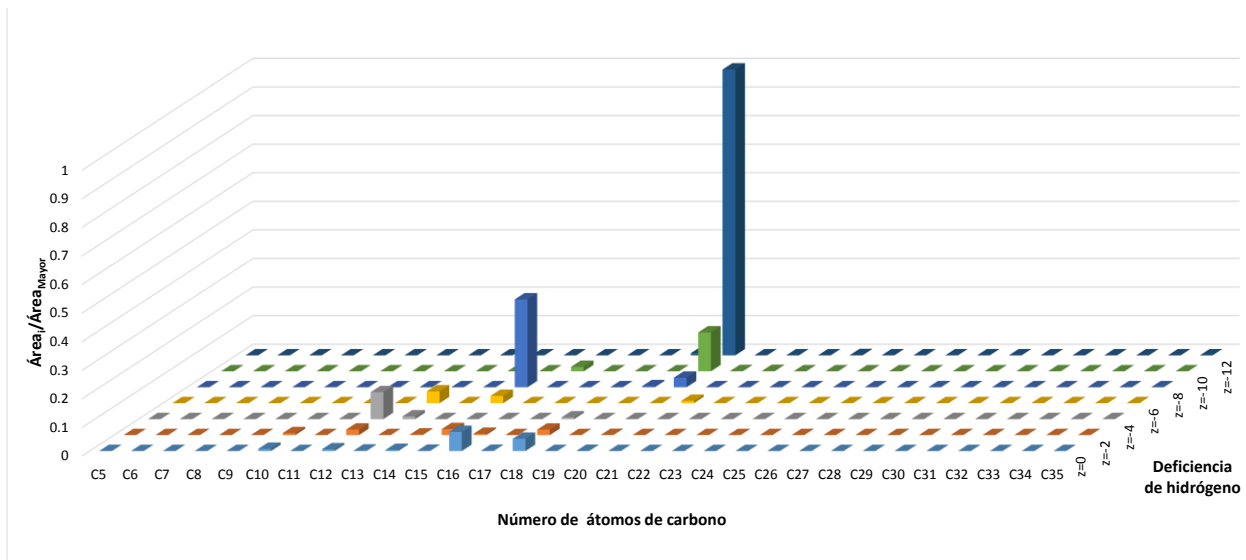
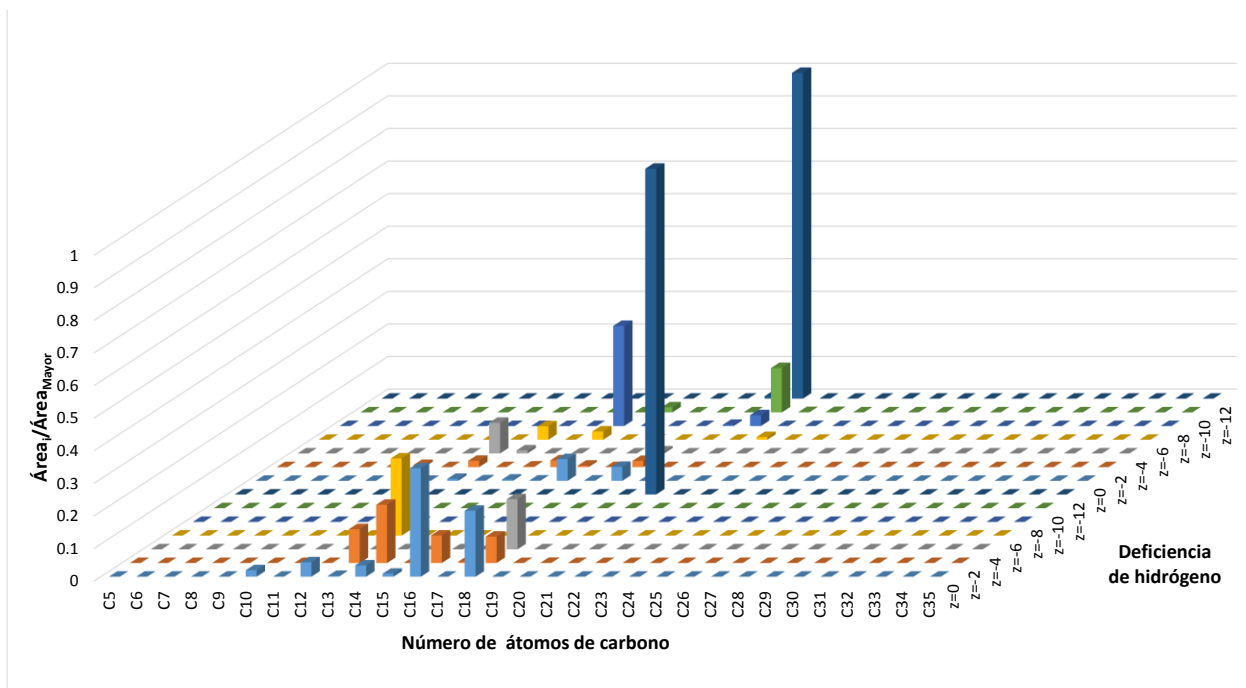
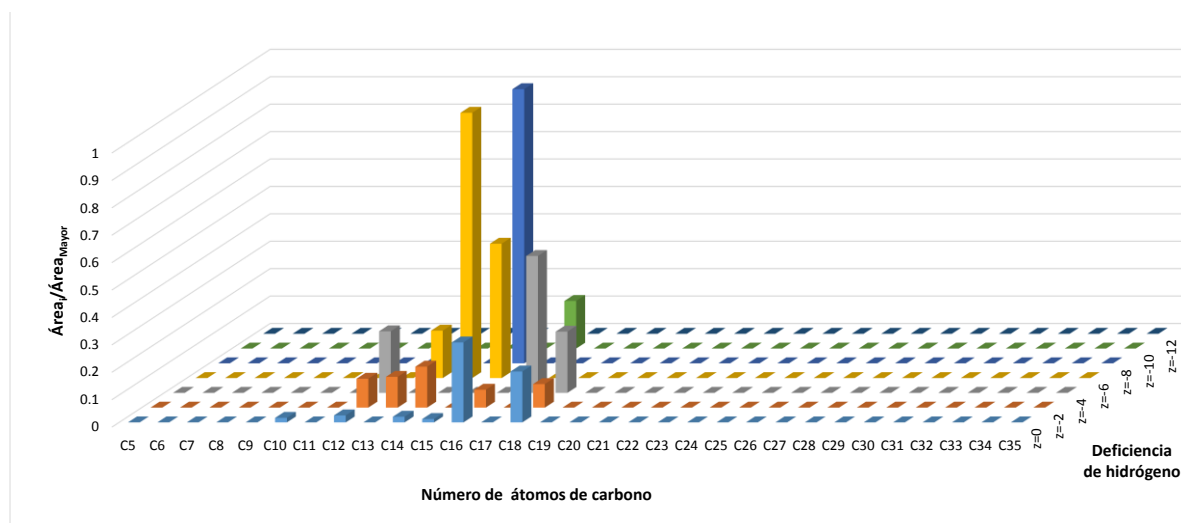


Figura 136. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-LI-107.



En la **Figura 136**, se observa la abundancia normalizada de las especies O_2 para la muestra C-LI-107 procedente de la cuenca VMM, que comparada con la muestra de crudo C-GL-1, tiene menor nivel de biodegradación (mayor índice A/C). Es notoria la mayor concentración de ácidos nafténicos ($z=0, -2, -4$ y -6) y concuerdan con la presencia del ácido nafténico C_{18} , $z=-12$. Por el contrario, la muestra procedente de la cuenca Cordillera Central, C-MSTB, mostró una distribución normalizada (**Figura 137**) semejante para todas las especies de ácidos nafténicos entre C_{11} y C_{17} ($z= 0, -2$ y -4). Sin embargo, la abundancia de las especies diferentes a $z=0$, es mayor con respecto al resto de las muestras que permite inferir la mayor biodegradación del conjunto de muestras.

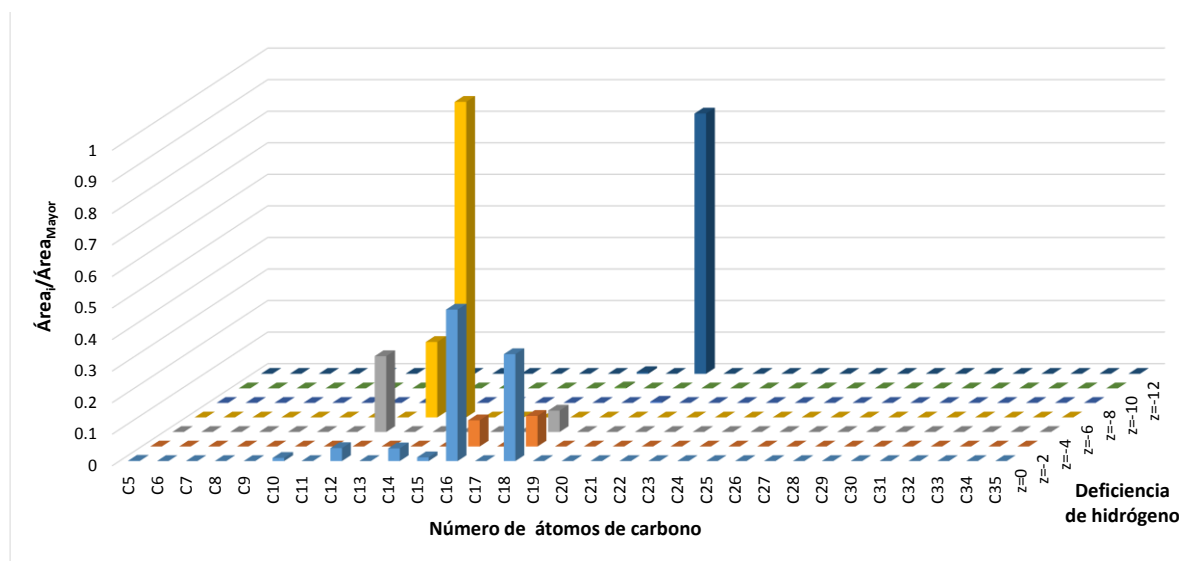
Figura 137. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI^- determinados en la fracción F2 del crudo C-MSTB.



Del grupo de muestras procedentes de la cuenca Llanos Orientales, las muestras C-GTQ-22 y C-Ch-170, muestran perfiles semejantes para la abundancia de especies O_2 . Sin embargo, el índice A/C calculado para la muestra de crudo C-GTQ-22 (0.53) es mayor con respecto al crudo C-Ch-170 (0.43). De hecho en la **Figura 138**, se aprecia una mayor proporción de los ácidos nafténicos ($z=0$) en la

muestra de crudo C-GTQ-22, con respecto a la abundancia de ácidos nafténicos mostrada para el crudo más biodegradado (**Figura 139**).

Figura 138. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-GTQ-22.



Entre las muestras de crudo analizadas, C-R-444; C-R-147 y C-R-357, presentaron valores de relación A/C similares, 0.39, 0.39 y 0.43, respectivamente. Los perfiles de abundancia de ácidos nafténicos en función del valor z, muestran similitud, según se muestra en las **Figuras 137-139**. La coherencia de valores para una misma zona petrolífera, permite correlacionar conexiones en los diferentes puntos muestreados del campo petrolífero; probablemente con una roca generadora en común.

Figura 139. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-Ch-170.

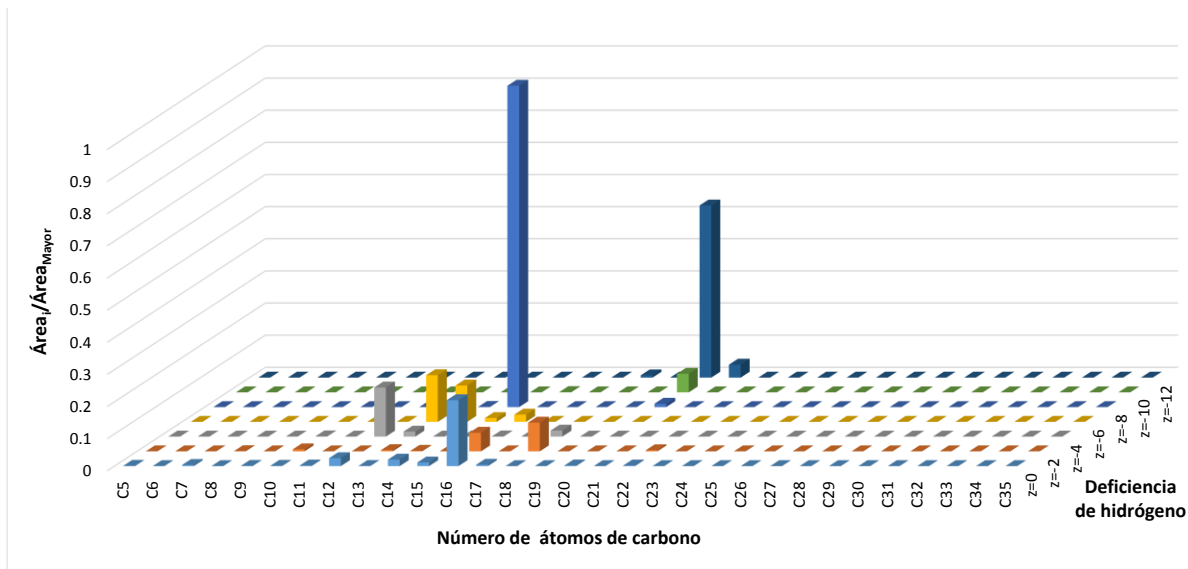


Figura 140. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-R-444.

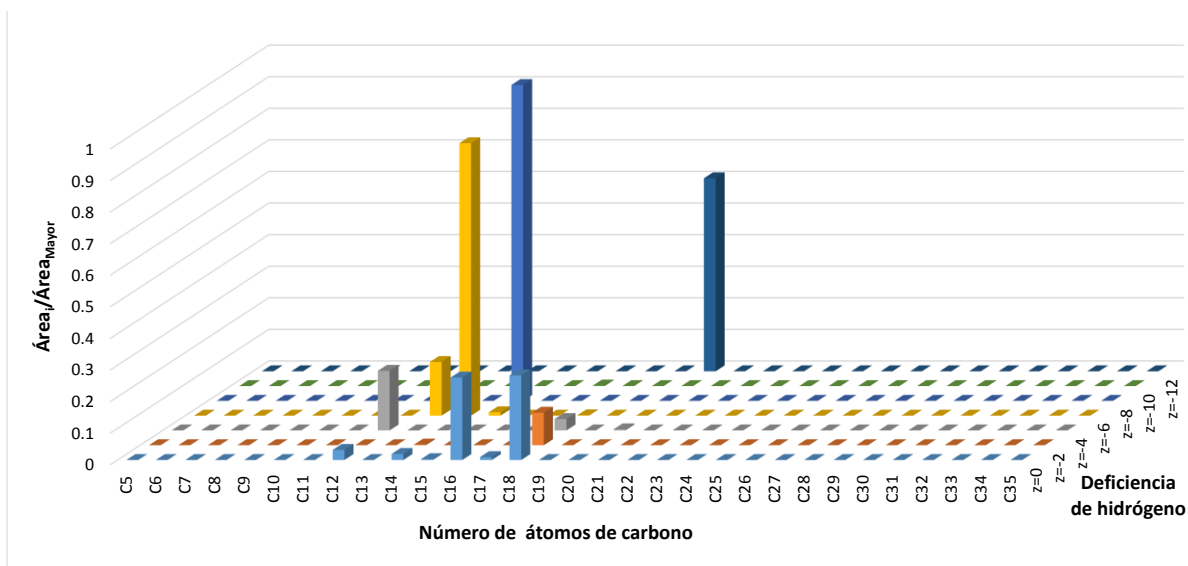


Figura 141. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-R-147.

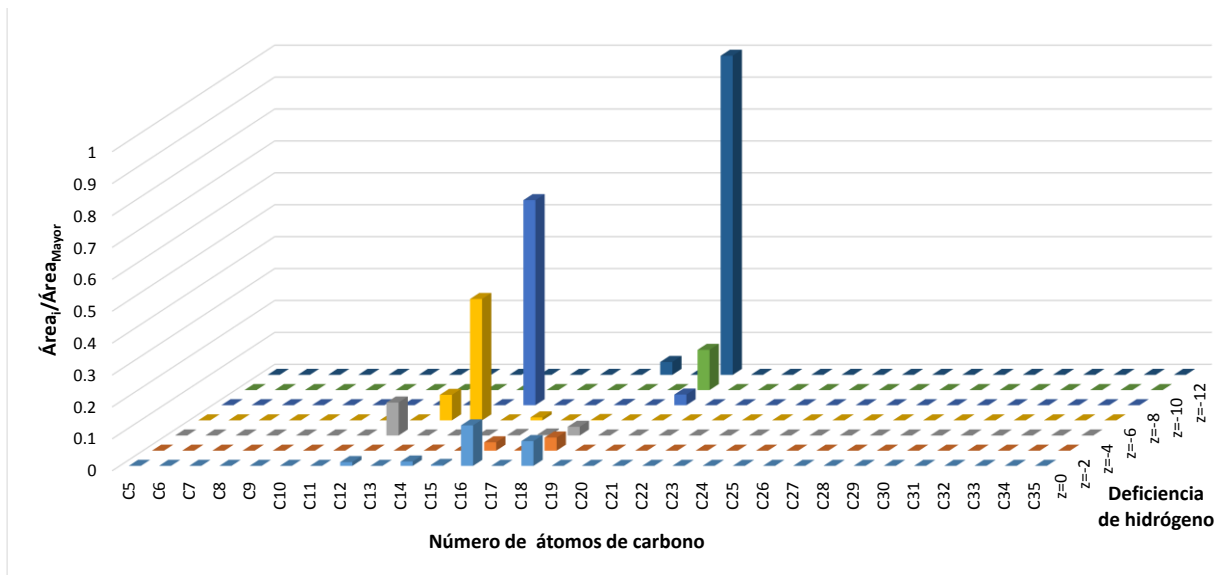
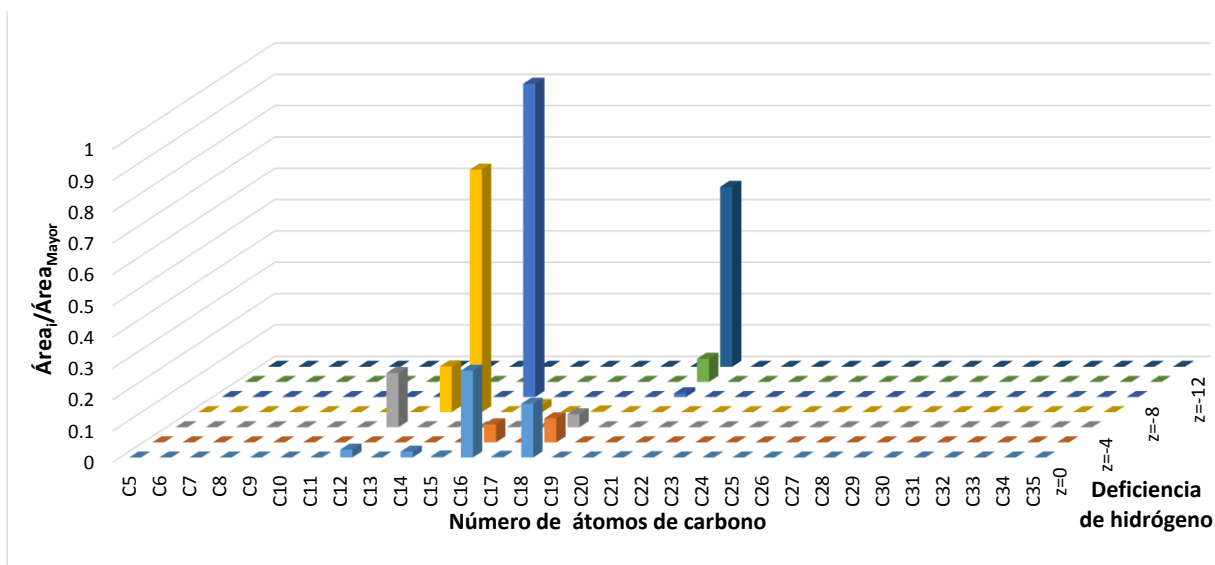
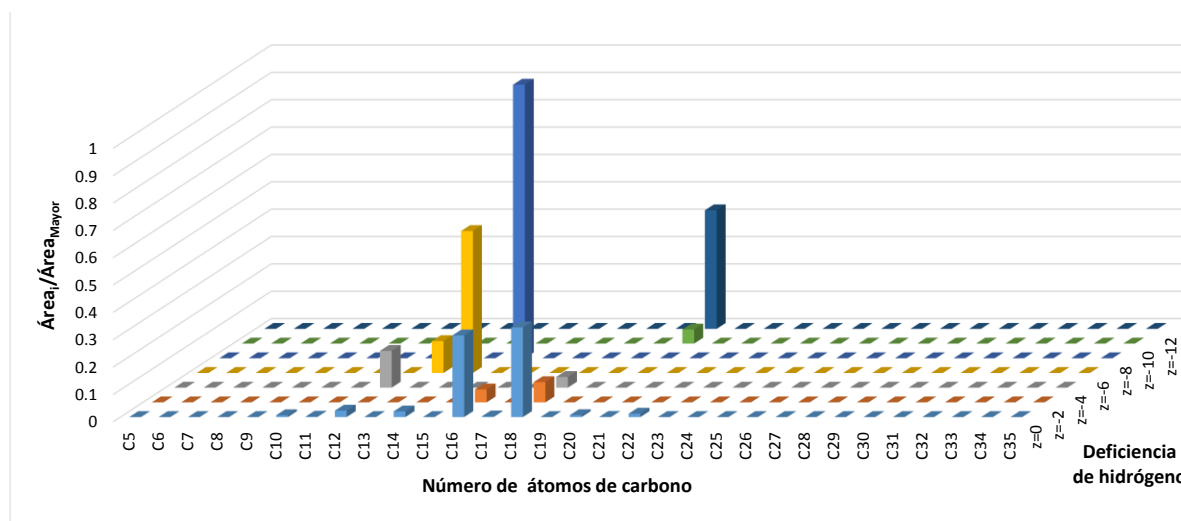


Figura 142. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-R-357.



La abundancia de ácidos nafténicos, para la segunda muestra con menor índice de biodegradación A/C (**Figura 143**), después de C-LI-107, fue el crudo C-R-807, con un valor de A/C igual a 0.75. La muestra C-R-807, pertenece al grupo de crudos procedentes del campo petrolífero de muestras C-R-444; C-R-147 y C-R-357. Probablemente, la profundidad a la que se encuentra el crudo C-R-807 es mayor con respecto a las muestras C-R-444; C-R-147 y C-R-35, debido a condiciones que disminuyan procesos de biodegradación, tales como temperatura, presión, disponibilidad en el micro-cosmos de algunos compuestos inorgánicos como nitritos y sulfatos, que favorecen el proceso redox por parte de comunidades bacterianas, principalmente bacterias sulforreductoras (SBR).

Figura 143. Relación de áreas cromatográficas ($\text{Área}_i/\text{Área}_{\text{Mayor}}$) de ácidos nafténicos obtenida por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ determinados en la fracción F2 del crudo C-R-807.



El orden de biodegradación en las muestras de crudo analizadas es mostrado en la **Tabla 27**. De mayor a menor grado de biodegradación: C-MSTB>C-R-147 >C-R-357>C-Ch-170>C-R-444>C-GL-1>C-GTQ-22>C-R-807>C-LI-107. La muestra de crudo C-GQ-1 mostró el valor más alto de relación A/C (1.3), al no considerar

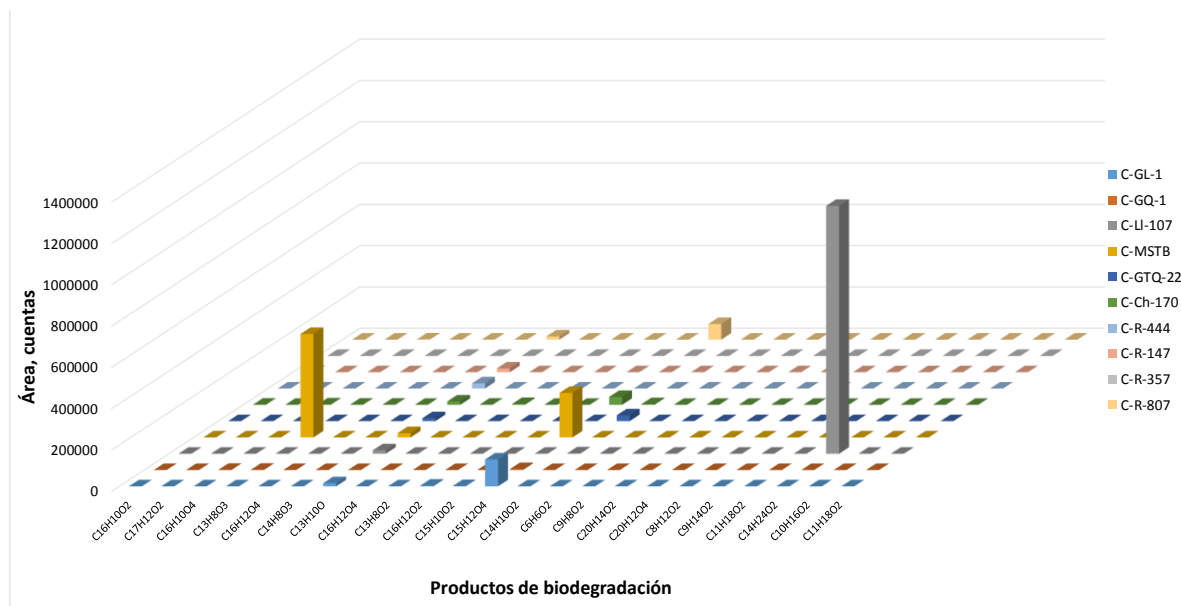
éste valor, existe una tendencia casi lineal para el grupo de muestras con mayor biodegradación que C-GQ-1.

Tabla 27. Parámetro de biodegradación A/C de las muestras de crudos biodegradados fraccionados (F2), *clean-up* y analizados por UHPLC-Orbitrap-MS

Crudo	A/C
C-MSTB	0.18
C-R-147	0.34
C-R-357	0.39
C-Ch-170	0.43
C-R-444	0.43
C-GL-1	0.51
C-GTQ-22	0.53
C-R-807	0.75
C-LI-107	0.77
C-GQ-1	1.26

En la **Figura 144**, se muestra la distribución de otros productos de biodegradación diferentes a especies con fórmula molecular $C_nH_{2n+z}O_2$, cuya formación se ha demostrado a partir de degradación de hidrocarburos poliaromáticos presentes en el crudo. En la **Figura 145**, se observan los productos de biodegradación más abundantes en las muestras de crudo procedentes de la cuenca Llanos Orientales, Central y VMM, del grupo de muestras analizadas.

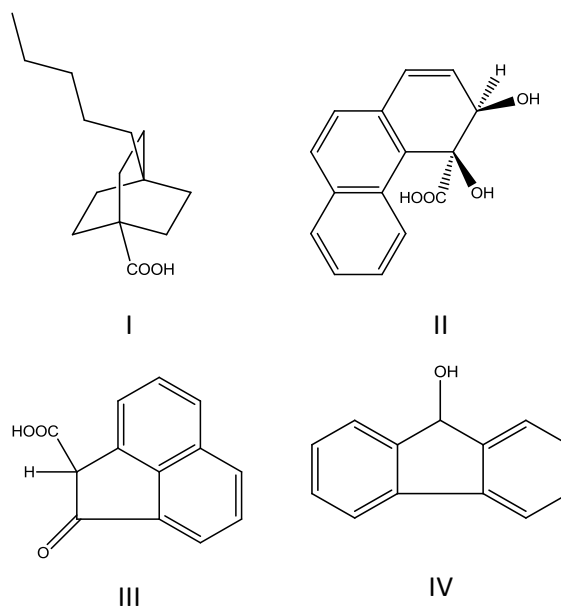
Figura 144. Productos de biodegradación diferentes a ácidos nafténicos determinados por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ en los crudos biodegradados procedentes de la cuenca Llanos Orientales, VMM y Central.



El producto (I), fórmula molecular $C_{14}H_{24}O_2$, fue determinado únicamente en la muestra de crudo C-LI-107. En la muestra de crudo C-GL-1, que había mostrado un nivel de biodegradación intermedia ($A/C= 0.51$), se determinó el producto de biodegradación (II) con fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$; también presente en las muestras de crudo C-MSTB, C-Ch-170, y C-R-807. Sin embargo, en la muestra que se determinó mayor grado de biodegradación (CMSTB, $A/C=0.18$), se encontró mayoritariamente un tercer compuesto con fórmula molecular $C_{13}H_8O_3$ (producto III). El producto (IV) $C_{13}H_{10}O$ fue común a todas las muestras de crudo biodegradado, excepto C-R-357 y C-GQ-1.

En el **Anexo 5**, se observan las abundancias de algunos de los productos de biodegradación del crudo, diferentes a ácidos nafténicos. La abundancia de pico es ligeramente mayor, al igual que en ácidos nafténicos, con una energía de colisiones (HCD) de 10 eV.

Figura 145. Productos de biodegradación determinados mediante UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ en las muestras crudo biodegradado. I. C₁₄H₂₄O₂ [M-H]⁻: 223.16980. II. C₁₅H₁₂O₄ [M-H]⁻: 255.06573. III. C₁₃H₈O₃ [M-H]⁻: 211.03952. IV. C₁₃H₁₀O [M-H]⁻: 181.06534.



6. CONCLUSIONES

El fraccionamiento de crudo biodegradado en columna de elución con gel de sílice y la mezcla de *n*-hexano-diclorometano permitió obtener fracciones, ricas en biomarcadores aromáticos. En la fracción saturada obtenida, pristano y fitano, se concentraron usando la zeolita ZSM-5, gel de sílice y ciclohexano, removiendo un 99.9 % de *n*-parafinas.

Transiciones en modo de adquisición MRM de iones precursores e iones producto se usaron para el análisis de por GC-MS con triple cuadrupolo de dibenzotiofenos, naftalenos, fenantrenos, benzohopanos y bifenilos. Los esteranos monoaromáticos, triaromáticos y metiltriaromáticos, se determinaron selectivamente en mezclas complejas, usando transiciones entre iones-fragmento característicos, y una energía de colisiones activadas de 10 eV.

Con base en la cantidad de esteroides monoaromáticos, metildibenzotiofenos, 9-metilfenantreno, 1-metilfenantreno y la correlación DBT/PHEN Vs Pr/Ph, se logró establecer que las muestras de crudo biodegradado analizadas, se habían originado en rocas madre siliciclásticas y carbonáticas, por depositación de materia orgánica marina en un ambiente semiprofundo somero.

Por fraccionamiento en columna de elución, se aislaron selectivamente los ácidos nafténicos de las muestras de crudo biodegradado. Los ácidos se analizaron por UHPLC-Orbitrap-MS, usando la energía de 10 eV en la celda de colisiones activadas, el voltaje de capilar -3.5 kV y 5 mM de formiato de amonio como modificador en la fase móvil.

Las relaciones de ácidos nafténicos acíclicos y cíclicos (A/C), determinadas con base en las áreas de picos cromatográficos obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS, permitieron clasificar las muestras de crudo, desde las más biodegradadas con un

índice $A/C = 0.18$ hasta las menos biodegradadas, con un índice de biodegradación 1.26.

BIBLIOGRAFÍA

AGENCIA NACIONAL DE HIDROCARBUROS. Cuenca Valle Medio del Magdalena integración geológica de la digitalización y análisis de núcleos. ANH, 2012, p. 14-79.

AGUILERA, Roberto F., *et al.* Organic Geochemistry Atlas of Colombia. *Earth Sciences Research Journal*, 2010, 14, p. 105-117.

Annual Statistical Bulletin OPEC, *Organization of the Petroleum Exporting Countries*, 2016.

ASIF, Muhammad; GRICE, Kliti; FAZEELAT, Tahira. Assessment of petroleum biodegradation using stable hydrogen isotopes of individual saturated hydrocarbon and polycyclic aromatic hydrocarbon distributions in oils from the Upper Indus Basin, Pakistan. *Organic Geochemistry*, 2009, 40(3), p. 301-311.

ATLAS, Ronald M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31(4), p. 178-179.

BARRERO, Dario, *et al.* Colombian sedimentary basins: Nomenclature, boundaries and petroleum geology, a new proposal. En *Agencia Nacional de Hidrocarburos*, ANH and B&M Exploration Ltd Bogotá, 2007, p. 18-81.

BAUTISTA, Diego Fernando García; DOS SANTOS NETO, Eugenio Vaz; PENTEADO, Henrique L. de B. Controls on petroleum composition in the Llanos basin, Colombia: implications for exploration. *AAPG Bulletin*, 2015, 99 (8), p. 1503-1535.

BENOTTI, Mark J., *et al.* HPLC/TOF-MS: An Alternative to LC/MS/MS for Sensitive and Selective Determination of Polar Organic Contaminants in the Aquatic Environment. *ACS Symposium Series*, 2003, 850, p. 109-127.

BLANDÓN, A., *et al.* Evaluación geoquímica de la Cuenca de los Llanos Orientales. *En 4th Simposio Bolivariano-Exploracion Petrolera en las Cuencas Subandinas, Venezuela.* 1991.

BRAITHWAITE, Alan; SMITH, Jean F. *Chromatographic Methods: Resolution.* 5^a Ed. *Kluwer Academic Publishers*, 1996, p. 228.

BROCKS, Jochen J.; SUMMONS, Roger. *Treatise on Geochemistry.* *Amsterdam: Elsevier*, 2003, 81, 63-115.

BUDZINSKI, H., *et al.* Alkylated phenanthrene distributions as maturity and origin indicators in crude oils and rock extracts. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1995, 59 (10), p. 2043-2056.

BURNS, Ralph A. *Fundamentos en Química: Masas atómicas de los elementos.* 5^a Ed. *Pearson Educación*, Mexico, 2011, p. 100.

CADENA DEL PETRÓLEO 2013. Ministerio de Minas y Energía: unidad de planeación minero energética. Bogotá D.C. Diciembre, 2013.

CALLES, Ivama, *et al.* Comparación entre pirolizados de la Formación la Luna y crudos de la Cuenca del Valle Medio del Magdalena. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2016.

CASSANI, Fernando, *et al.* Methylphenanthrene maturity index of marine source rock extracts and crude oils from the Maracaibo Basin. *Organic Geochemistry*, 1998, 13(1-3), p. 73-80.

CHENG, Chu-Nian; LAI, Jia-Hong; HUANG, Min-Zong. Crude Oil Emulsions – Composition Stability and Characterization: Analysis of polar components in crude oil by ambient mass spectrometry. INTECH Open Access Publisher, 2012, p. 107-120.

CLEMENTE, Joyce S.; FEDORAK, Phillip M. A review of the occurrence, analyses, toxicity, and biodegradation of naphthenics acids. *Chemosphere*, 2005, 60(5), p. 585-600.

CÓRDOBA, Fabio, *et al.* Provincia petrolífera del Valle Medio del Magdalena, Colombia. En *7th Simposio Bolivariano-Exploración Petrolera en las Cuencas Subandinas*. 2000, p. 603-609.

CORTES, Jorge E., *et al.* Molecular organic geochemistry of the Apiay Field in the Llanos Basin, Colombia. *Journal of South American Earth Sciences*, 2013, 47, p. 166-178.

CUÑADO CARRASCO, Ester. Estudio geoquímico de los petróleos de los campos Jilguero y Caracara, Cuenca de los Llanos, Colombia. Tesis pregrado. Universidad de Barcelona, Facultad de Geología, 2012, p. 92.

DIAS, Heloisa P. *et al.* Evidencing the crude oil corrosión by Raman spectroscopy, atomic force microscopy and electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. *Fuel*, 2015, 139, p. 328-336.

DIAS, Heloísa P., *et al.* Catalytic decarboxylation of naphthenic acids in crude oils. *Fuel*, 2015, 158, p. 113-121.

ELIUK, Shannon; MAKAROV, Alexander. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual review of analytical chemistry*, 2015, 8, p. 61-80.

ENGEL, Michael H.; MACKO, Stephen A. Organic Geochemistry: Principles and Applications. *Springer Science and Business Media*, New York, 1993, p. 523.

FARALDOS, Marisol; GOBERNA, Consuelo (ed). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales: Cromatografía de gases (GC)*. 2a Ed. Consejo Superior de Investigadores Científicos (CSIC) Biblioteca de Ciencias, Madrid, 2011, p. 745.

FISHER, Steven James, *et al.* Aromatic hydrocarbons as indicator of biodegradation in north western Australian reservoirs. *The sedimentary basins of Western Australia*, 1998, 2, p. 185-194.

GALPERIN, Yakov; KAPLAN, Isaac R. Review of Microbial processes in the near surface environment and their implications for the chemical fingerprinting of hydrocarbon fuels. *Environmental Forensics*, 2011, 12(3), p. 236-252.

GARCIA, Alejandra; BARRON, Andrew. Principles of gas chromatography OpenStax-CNX module: m50228. 2014, p. 10.

HAN, Jeonghoon, *et al.* Identification of the full 46 Cytochrome P450 (CYP) complement and modulation of CYP expression in response to water-accommodated fractions of crude oil in the cyclopoid copepod *paracyclopsina nana*. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(11), p. 6982-6992.

HARRIS, Daniel C. Análisis químico cuantitativo: Espectrometría de masas. 3^a Ed. Editorial Reverté, S.A., 2006, p. 519.

HEADLEY, John V.; PERU, Kerry M.; BARROW, Mark P. Mass spectrometric characterization of naphthenic acids in environmental samples: a review. *Mass spectrometry reviews*, 2009, 28(1), p. 121-134.

HUDGE, William B. Use of thiophenic organosulphur compounds in characterizing of oils derived from carbonate versus siliciclastic sources. (ed). *Petroleum Geochemistry and Source Rock Potential of Carbonate Rocks: AAPG Studies in Geology*, 1985, 18, p. 181-196.

HUGHES, William B.; HOLBA, Albert G.; DZOU, Leon IP. The ratios of dibenzothiophene to phenanthrene and pristane to phytane as indicators of depositional environment and lithology of petroleum source rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1995, 59(17), p. 3581–3598.

HUGHEY, Christine A.; GALASSO, Samantha A.; ZUMBERGE, John E. Detail compositional comparison of acidic NSO compounds in biodegraded reservoir and surface crude oils by negative ion electrospray Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Fuel*, 2007, 86(5), p. 758-768.

HUNT, Melvyn J. *Petroleum Geochemistry and Geology*. 2^a Ed. W.H. Freedman and Company, New York, 1996, 1, p. 394.

JACQUOT, Frédéric, *et al.* Biodegradation of the (aliphatic + aromatic) fraction of Oural crude oil. Biomarker identification using GC/MS SIM and GC/MS/MS. *Talanta*, 1996, 43(3), p. 319-330.

Ji, Changjun, *et al.* Aromatic hydrocarbons in the Biluo Co oil shale of the Shuanghu area, Northern Tibetan Plateau, and their implications. *Oil Shale*, 2014, 31(4), p. 351.

JIE, Wang, *et al.* Quantification and characterization of naphthenic acids in soils from oil exploration areas in China by GC/MS. *Analytical Methods*, 2015, 7(5), p. 2149-2154.

JOHNSTON, Colin D.; BASTOW, Trevor P.; INNES, Nathan L. The use of biodegradation signatures and biomarkers to differentiate spills of petroleum hydrocarbon liquids in the subsurface and estimate natural mass loss. *European Journal of Soil Biology*, 2007, 43(5), p. 328-329.

KANALY, Robert A.; HARAYAMA, Shigeaki. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (8), p. 2059-2067.

KILLOPS, Stephen D.; KILLOPS, Vanessa J. *Introduction to Organic Geochemistry*. 2^a ed. EE.UU, Wiley-Blackwell, 2005, p. 393.

KIM, Sunghwan, *et al.* Microbial alteration of the acidic and neutral polar NSO compounds revealed by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 2005, 36(8), p. 1117-1134.

KITSON, Fulton G.; LARSEN, Barbara S.; MCEWEN, Charles N. *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide*. Academic Press, 1996, p.4.

KVENVOLDEN, Keith A. Origins of organic geochemistry. *Organic Geochemistry*, 2008, 39(8), p. 905-909.

LI, Meijun, *et al.* The significance of 24-norcholestanes, triaromatic steroids and dinosteroids in oils and Cambrian–Ordovician source rocks from the cratonic region of the Tarim Basin, NW China. *Applied Geochemistry*, 2012, 27(8), p. 1643-1654.

LI, Sumei, *et al.* Origin and quantitative source assessment of deep oils in the Tazhong Uplift, Tarim Basin. *Organic Geochemistry*, 2015, 78, p. 1-22.

LOPEZ, Liliana; MÓNACO, Salvador Lo; VOLKMAN, John K. Evidence for mixed and biodegraded crude oils in the Socorro field, Eastern Venezuela Basin. *Organic Geochemistry*, 2015, 82, p. 12-21.

LOURENÇO, Rafael A.; BÍCEGO, Marcia Caruso. Metodología para la determinación de biomarcadores geoquímicos orgánicos en sedimentos– Hidrocarburos alifáticos y aromáticos, esteroides y alquienonas. 2003, p. 12-13.

MALVIYA, Rishabha, *et al.* High Performance Liquid Chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2010, 2(5), p. 22-26.

McKENNA, Amy M., *et al.* Heavy petroleum composition. 3. Asphaltene aggregation. *Energy and Fuels*, 2013, 27(3), p. 1246-1256.

MEJIA, C.; LAVERDE, Dionisio. Application of near infrared spectroscopy, NIR and chemometric methods for prediction of corrosion in crude oil refining units. En *Corrosion Conference 2013*. NACE International, 2013.

MEYER, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Introduction. 4^a Ed. Wiley and Sons, 1994, p. 4.

MIRANDA, Carlos Mejia; CATAÑO, D. L.; BECERRA, H. Q. Method for simulating the effect of pressure in transfer lines in the corrosivity of HAC. En *CORROSION 2015*. NACE International, 2015.

MOJICA, Jairo; ARÉVALO, Oscar; CASTILLO, Hardany. Cuencas Catatumbo, Cesar – Ranchería, Cordillera Oriental, Llanos Orientales, Valle Medio y Superior del Magdalena. *ANH*, 2009, p. 20-44.

MOLDOWAN, J. Michael; WALTERS, Clifford C.; PETERS, Kenneth E. The Biomarker Guide: Biomarkers and isotopes in petroleum exploration and earth History. 2^a Ed. *Cambridge University Press: United Kingdom, Cambridge*, 2005, 1, p. 471.

MONTES, L. Organic Geochemistry Atlas of Colombia by: ANH, Universidad Nacional de Colombia, RA Geología E.U. and GEMS Ltda., *Earth Sciences Research Journal, Edición especial*, 2009, 13, p. 1-134.

MORETTI, Isabelle, *et al.* Integrated Exploration workflow in the south Middle Magdalena Valley (Colombia). *Journal of South American Earth Sciences*, 2010, 29 (2), p. 187-197.

NEUE, Uwe D., *et al.* Characterization of HPLC packings. *Journal of Separation science*, 2003, 26(3-4), p. 174-186.

NIESSEN, Wilfried MA. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Liquid chromatography and simple pretreatment*, 3^a Ed. *Taylor and Francis*, 2006, p. 4-5.

OLARIU, Romeo-Iulian, *et al.* Sample preparation for trace analysis by chromatographic methods. *Journal of liquid Chromatography and Related Technologies*, 2010, 33(9-12), p. 1174-1207.

ORTIZ, J. E.; GARCÍA, M. J.; RODRIGUEZ GALLEGO, J. L. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 2003, (351), p. 41-45.

ORTIZ, J. E.; GARCÍA, M. J.; RODRÍGUEZ GALLEGO, J. L. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 2003, no 351, p. 41-45.

PERRY, Richard H.; COOKS, R. Graham; NOLL, Robert J. Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*, 2008, 27(6), p. 661-699.

PETERS, Kenneth E.; WALTERS, Clifford C.; MOLDOWAN J. Michael. The Biomarker Guide: Biomarker separation and analysis. 2 Ed. *Cambridge University Press: United Kingdom*, Cambridge, 2005, 1, p. 488.

PETROV, Alexander A. *Petroleum hydrocarbons*. 1^a Ed. Springer-Verlag, Berlin, 1987. p. 255.

PHILP, R. Paul, *et al.* A comparison of organosulphur compounds produced by pyrolysis of asphaltenes and those present in related crude oils and tar sands. *Organic geochemistry*, 1988, 13(4-6), p. 915-926.

PODGORSKI, David C., *et al.* Heavy petroleum composition. 5. Compositional and structural continuum of petroleum revealed. *Energy and Fuels*, 2013, 27(3), p. 1268-1276.

POVEDA, Gloria Isabel Duarte, *et al.* Sulfidation and naphthenic acid corrosion of UNS S31603, UNS S31703 AND UNS S44400 serie stainless steels in crude processing. En *Corrosion Conference 2013*. NACE International, 2013.

RADKE, Matthias; WELTE, Dietrich H. The Methylphenanthrene Index (MPI): a maturity parameter based on aromatic hydrocarbons. *Advances in Organic Geochemistry*, 1981, 1983, p. 504-512.

RADKE, Matthias; WELTE, Dietrich H.; WILLSCH, Helmut. Geochemical study on a well in the Western Canada Basin: relation of the aromatic distribution pattern to maturity of organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1981, 46(1), p. 1-10.

RAMON, J. Caro; DZOU, Leon. IP. Petroleum geochemistry of Middle Magdalena Valley Colombia. *Organic Geochemistry*, 1999, 30(4) p. 249-266.

RANGEL, A.; ESCALANTE, C.; MORA, C. Evaluación Geoquímica Integrada de los Gases y Crudos Colombianos: Un Nuevo Enfoque para la Exploración de Hidrocarburos. En *8th Simposio Bolivariano- Exploracion Petrolera en las Cuencas Subandinas*, 2003, p. 285-293.

RANGEL, VO Antonio, *et al.* Evaluación geoquímica de la cuenca Llanos Orientales. En *4th Simposio Bolivariano- Exploracion Petrolera en las Cuencas Subandinas*, 1991.

SEPTHON, Mark A.; HAZEN, Robert M. On the origins of Deep hydrocarbons. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2013, 75, p. 449-465.

SILVA, Raphael SF, *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time of flight mass spectrometry applied to biomarker analysis of oils from Colombia. *Fuel*, 2011, 90 (8), p. 2694-2699.

SIM, Arum, *et al.* Molecular-level characterization of crude oil compounds combining reversed-phase high-performance liquid chromatography with off-line high-resolution mass spectrometry. *Fuel*, 2015, 140, p. 717-723.

SOARES, Renata F., *et al.* Comprehensive two-dimensional gas chromatography couple to time of flight mass spectrometry: new biomarker parameter proposition for the characterization of biodegraded oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2013, 24, p. 1570-1581.

SPRINGER, M. V. S. Application of diamondoids parameters to distinguish source rock facies in Llanos Orientales basin, Colombia. En *72nd EAGE Conference and Exhibition incorporating SPE EUROPEC 2010*, 2010.

SPRINGER, Mellanie V., *et al.* Diamondoid and biomarker characterization of oils from the Llanos Orientales Basin, Colombia. *Organic Geochemistry*, 2010, 41(9), p. 1013-1018.

STANDARD, A. S. T. M. D2007-11. *Test Method for Characteristic Groups in Rubber Extender and Processing Oils and Other Petroleum-Derived Oils by the Clay-Gel Absorption Chromatographic Method*. American society for testing and materials. ASTM International, PA, 2011.

STANDARD, A. S. T. M. D6560-12. *Test Method for Determination of Asphaltenes (Heptane Insoluble) in Crude Petroleum and Petroleum Products*. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. GC y GC-MS: Configuración del Equipo Versus Aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2010, 2 (3), p. 33-59.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. GC-MS: Más de un analizador de Masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica*, 2010, 2(4), p. 25-48.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como herramienta de alta selectividad para caracterizar fósiles químicos en el petróleo. *Scientia Chromatographica*, 2012, 4(3), p. 125-138.

STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René; ROBLES, Mayra. Extracción selectiva y detección específica de biomarcadores saturados del petróleo. *Scientia Chromatographica*, 2014, 6 (4), p. 251-268.

STASHENKO, Elena; MARTÍNEZ, Jairo René; CASTRILLÓN, Julián. Aplicación del método de dispersión de matriz en fase sólida al aislamiento de hidrocarburos de rocas bituminosas. *Boletín de Geología*, 2014, 36(1), p. 29-35.

STEVENS, Douglas; SHI, Quan; HSU, Chang Samuel. Novel analytical technique for petroleum biomarker analysis. *Energy and Fuels*, 2012, 27(1), p. 167-171.

SUÁREZ, Mario A.; SERRANO, Martha; MORALES, Martín. Estilos estructurales y potencial de entrapamiento de la sección cretácea, Cuenca del Valle Medio del Magdalena, Colombia. En *7th Simposio Bolivariano- Exploracion Petrolera en las Cuencas Subandinas*, Santafé de Bogotá, Colombia, 2000, pp. 356-364.

SUAREZ, Mario. Tectonoestratigrafía del terciario y potencial petrolífero de la formación la Paz, cuenca del Valle Medio del Magdalena (parte norte), Colombia.

Asociación Colombiana de Geólogos y Geofísicos del Petróleo (ACGGP), Bogotá, Colombia, 1997, p. 1-4.

VAZ, Boniek G., *et al.* Assessing biodegradation in the Llanos orientales crude oils by electrospray ionization ultrahigh resolution and accuracy Fourier transform mass spectrometry and chemometrics analysis. *Energy and fuels*, 2013, 27 (3), p. 1277-1284.

VOLKMAN, John K. Sterols in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60(5), p. 495-506.

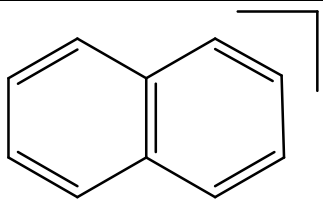
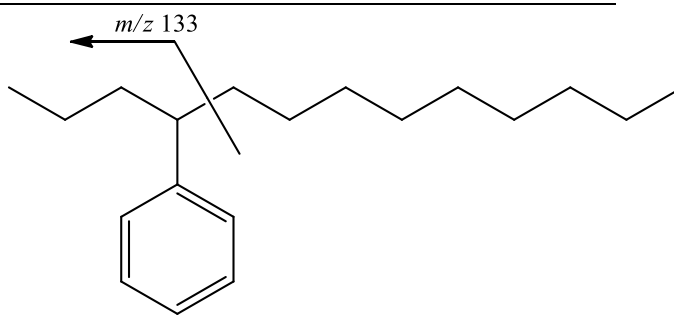
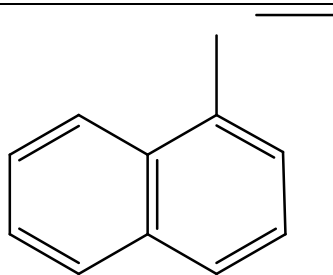
WIDDEL, Friedrich; RABUS, Ralf. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Environmental Biotechnology*, 2001, 12 (3), p. 259-276.

XIANGCHUN, Chang, *et al.* Aromatic biomarkers and oil source of the Ordovician crude oil in the Halahatang Sag, Tarim Basin. *Oil and Gas Geology*, 2015, 36(2), p. 175-182.

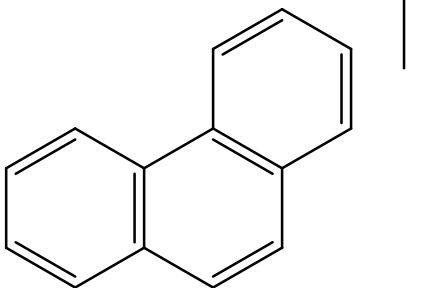
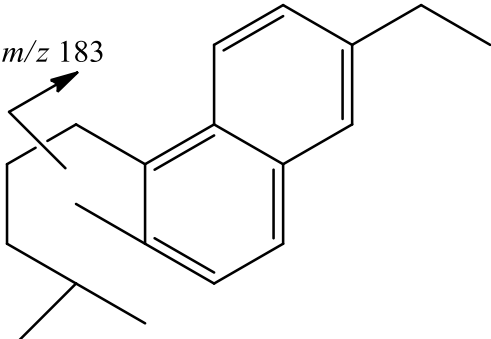
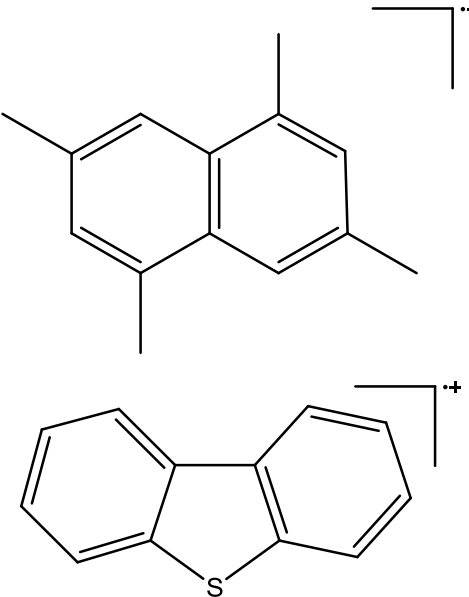
ZHANG, Shuichang, *et al.* Geochemistry of alkylbenzenes in the Paleozoic oils from the Tarim Basin, NW China. *Organic Geochemistry*, 77, 2014. pp. 126-139.

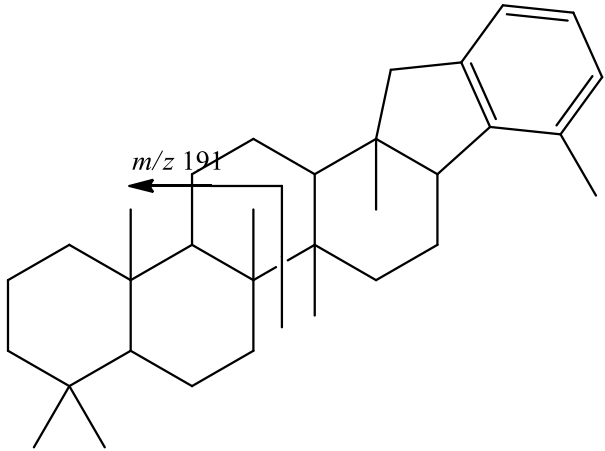
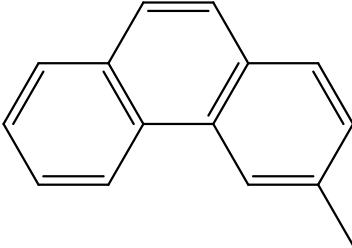
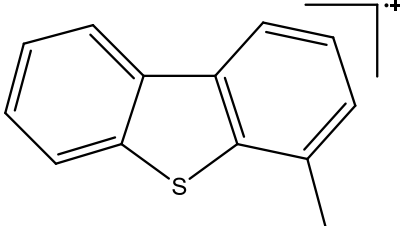
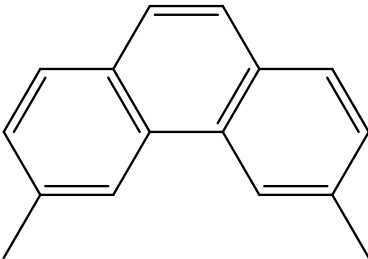
ANEXO 1

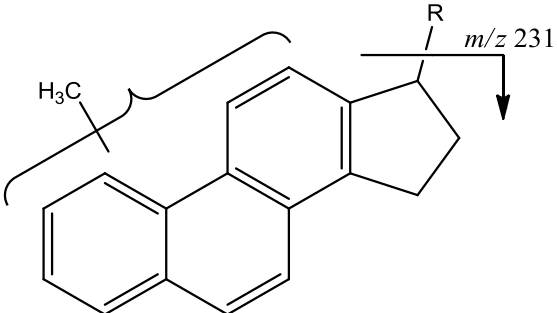
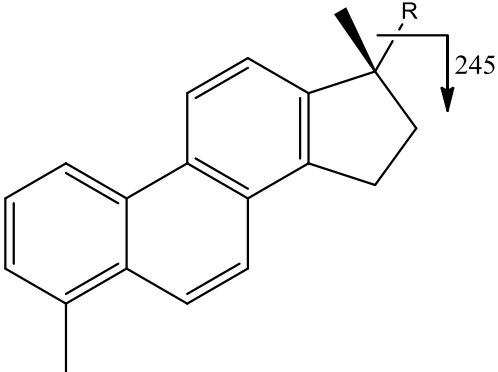
Tabla 1. Estructura química de los iones seleccionados para el análisis de biomarcadores aromáticos por GC-MS/SIM.

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
57*	Alifáticos	$[C_4H_9]^+$
85*	Alifáticos	$[C_6H_{13}]^+$
128	Naftalenos	
133	Fenilalcanos	
142	Metilnaftalenos	

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
156	Dimetilnaftalenos	
168	Bifenilo monosustituido	
170	Trimetilnaftalenos	

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
178	Hidrocarburo aromático policíclico (PAH)	 <p>The structure shows a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) consisting of four fused benzene rings. A positive charge (+) is indicated at the top right corner of the structure.</p>
183	PAH	 <p>The structure shows a naphthalene ring system with three alkyl substituents: an ethyl group at position 1, a methyl group at position 2, and a propyl group at position 3. An arrow labeled <i>m/z</i> 183 points to the ethyl group. A positive charge (+) is indicated at the top right corner of the structure.</p>
184	Tetrametilnaftalenos y benzotiofenos	 <p>Two chemical structures are shown. The top structure is tetramethylnaphthalene, a naphthalene ring with four methyl groups at positions 1, 2, 3, and 4. The bottom structure is benzothiophene, consisting of a benzene ring fused to a thiophene ring. A positive charge (+) is indicated at the top right corner of the benzothiophene structure.</p>

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
191	Benzohopano	
192	PAH	
198	Benzotiofenos	
206	PAH	

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
231	Esteroides triaromáticos	
239	Esteroides monoaromático	<p>El fragmentograma <i>m/z</i> 239 de la fracción de hidrocarburos monoaromática se ha usado como <i>fingerprint</i> para correlaciones crudo-roca y crudo-crudo. Probablemente, las estructuras son esteroides monoaromáticos que tienen una pérdida de un grupo metileno del núcleo, y algunos pueden tener reordenamientos a antrasteroides aromáticos.</p>
245	Esteroides triaromáticos	

Ion seleccionado (<i>m/z</i>)	Familia	Estructura
252	PAH	
253	Esteroides monoaromáticos	

*Los iones corresponden a compuestos alifáticos, se usan para asegurar la separación de los hidrocarburos saturados de la fracción aromática.
R: Cadena alquílica, eg. CH₃.

ANEXO 2

Figura 1. Corriente iónica extraída (m/z 142) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo C-GQ-1, columna DB-5MS (60m x 0.25mm x 0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. N2M (2-Metilnaftaleno). 2. N1M (1-Metilnaftaleno).

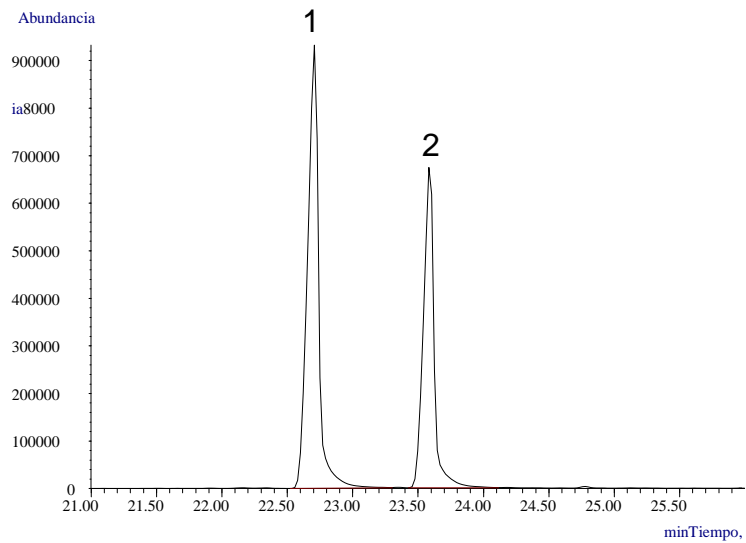


Figura 2. Corriente iónica extraída (m/z 156) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. N2E (2- Etilnaftaleno). 2. N1E (1- Etilnaftaleno). 3. N26DM (2,6-Dimetilnaftaleno). 4. N27DM (2,7-Dimetilnaftaleno). 5. N1317DM (1,3+1,7)-Dimetilnaftalenos. 6. N16DM (1,6-Dimetilnaftaleno). 7. N14DM (1,4-Dimetilnaftaleno). 8. N15DM (1,5-Dimetilnaftaleno). 9. N12DM (1,2-Dimetilnaftaleno).

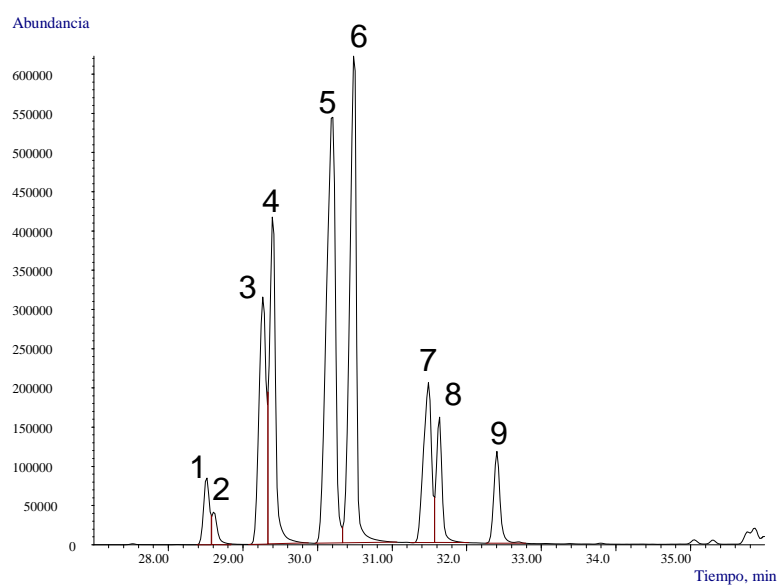


Figura 3. Corriente iónica extraída (m/z 168) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BP3M (3-Metilbifenilo). 2. BP4M (4-Metilbifenilo).

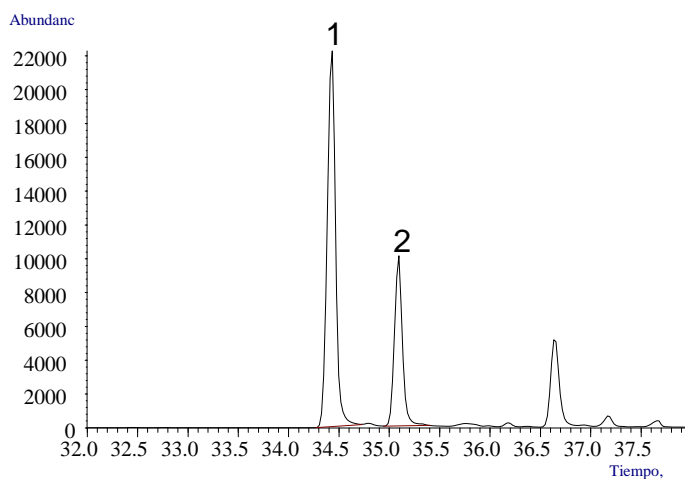


Figura 4. Corriente iónica extraída (m/z 170) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BB_EMN (Etil-metilnaftaleno). 2. AB_EMN (Etil-metilnaftaleno). 3. N137TM (1,3,7-Trimetilnaftaleno). 4. N136TM (1,3,6-Trimetilnaftaleno). 5. N146135T (1,4,6 + 1,3,5)-Trimetilnaftaleno. 6. N236TM (2,3,6-Trimetilnaftaleno). 7. N127M (1,2,7-Trimetilnaftaleno). 8. N167126T (1,6,7 + 1,2,6)-Trimetilnaftaleno. 9. N124TM (1,2,4-Trimetilnaftaleno). 10. N125TM (1,2,5-Trimetilnaftaleno).

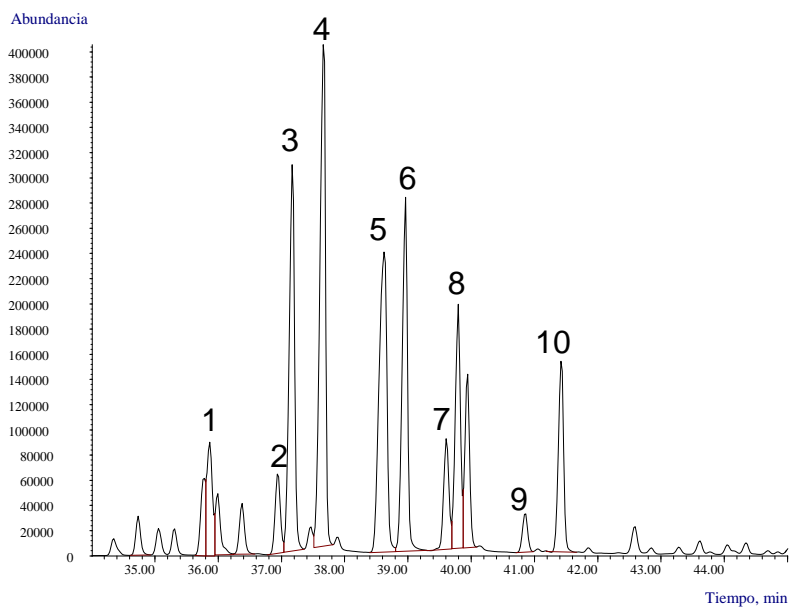


Figura 5. Corriente iónica extraída (m/z 178) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. PHEN (Fenantreno).

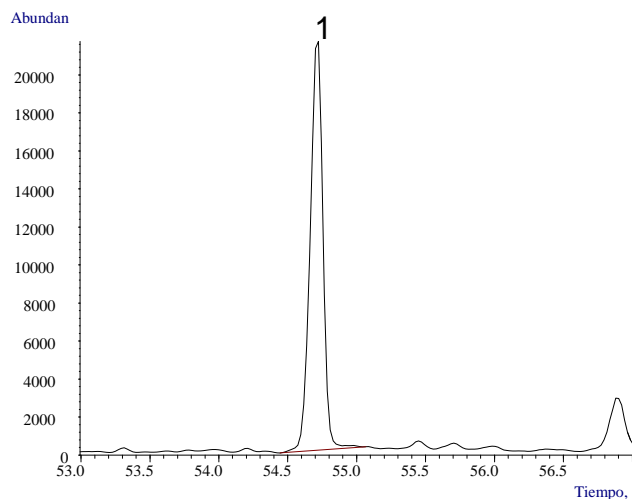


Figura 6. Corriente iónica extraída (m/z 184) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. 1357(1,3,5,7-Tetrametilnaftaleno). 2. 1367 (1,3,6,7-Tetrametilnaftaleno). 3. 1247 (1,2,4,7 + 1,2,4,6 + 1,4,6,7)-Tetrametilnaftalenos. 4. 1257 (1,2,5,7-Tetrametilnaftaleno). 5. 2367 (2,3,6,7-Tetrametilnaftaleno). 6. 1267 (1,2,6,7-Tetrametilnaftaleno). 7. 1237 (1,2,3,7-Tetrametilnaftaleno). 8. 1236 (1,2,3,6-Tetrametilnaftaleno). 9. 1256 (1,2,5,6-Tetrametilnaftaleno). 10. DBT (Dibenzotiofeno).

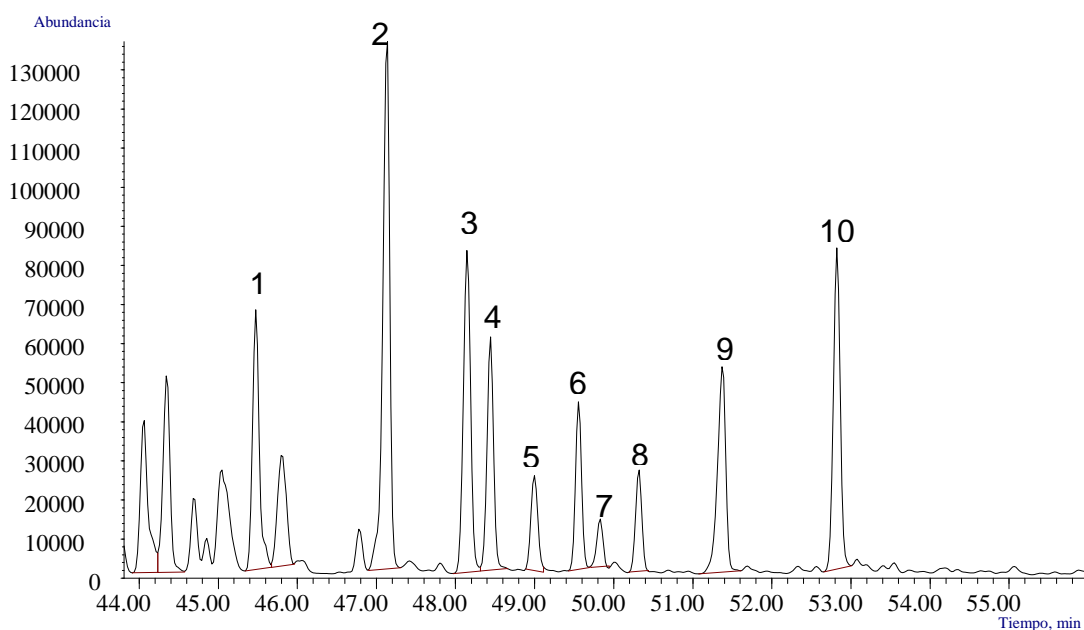


Figura 7. Corriente iónica extraída (m/z 191) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60m \times 0.25mm \times 0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BH32 (C32 Benzohopano). 2. BH33 Benzohopano. 3. BH34 (C34 Benzohopano). 4. BH35 (C35 Benzohopano).

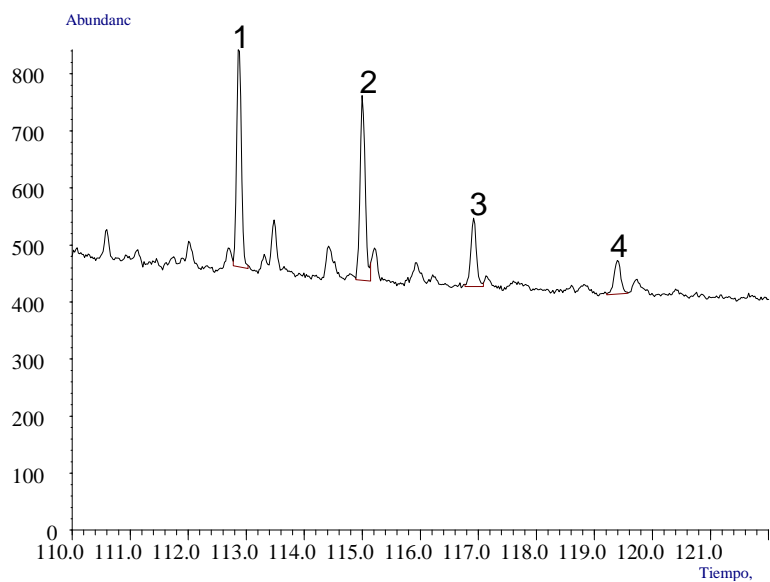


Figura 8. Corriente iónica extraída (m/z 192) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. P3M (3-Metilfenantreno). 2. P2M (2-Metilfenantreno). 3. P9M (9-Metilfenantreno). 4. P1M (1-Metilfenantreno).

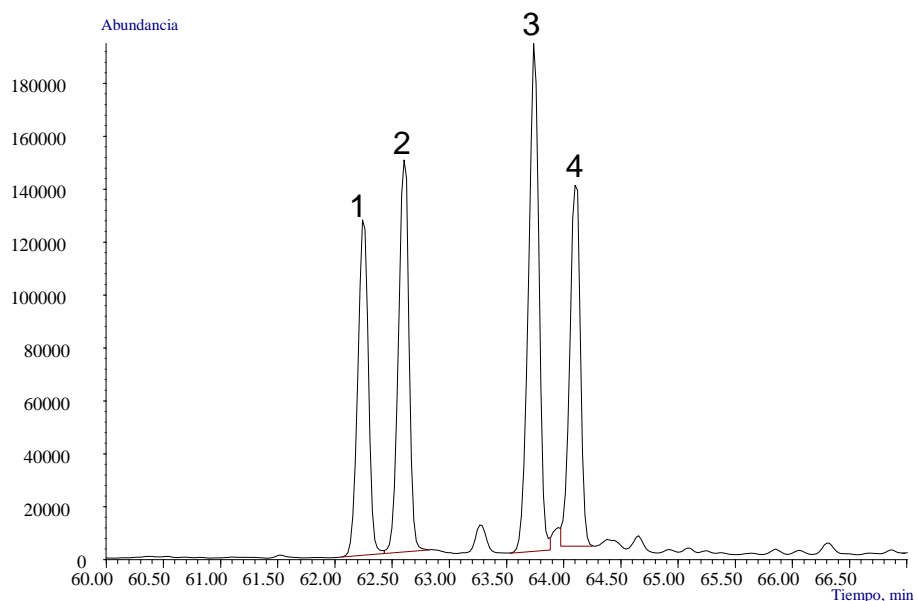


Figura 9. Corriente iónica extraída (m/z 198) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. DBT4M (4-Metildibenzotiofeno). 2. DBT23M (2+ 3)-Metildibenzotiofenos. 3. DBT1M (1-Metildibenzotiofeno).

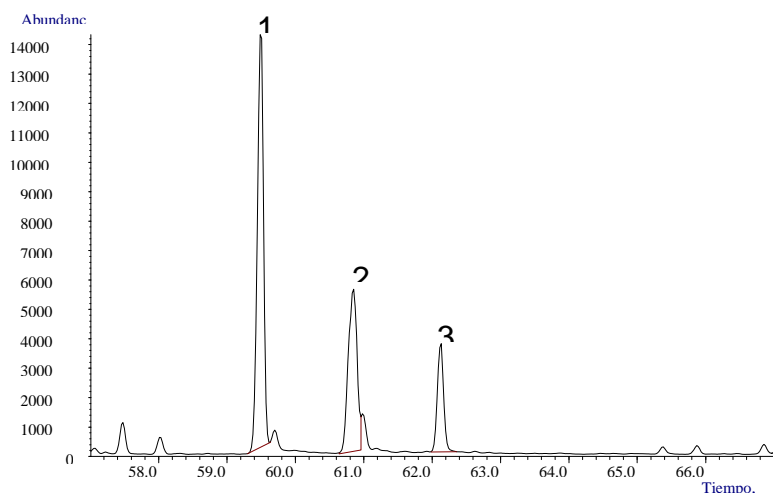


Figura 10. Corriente iónica extraída (m/z 206) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. P36DM (3,6-Dimetilfenantreno). 2. P26DM (2,6-Dimetilfenantreno). 3. P27DM (2,7-Dimetilfenantreno). 4. P12390DM (3,9+3,10+2,10+1,3)-Dimetilfenantrenos. 5. P29DM (2,9-Dimetilfenantreno). 6. P17DM (1,7-Dimetilfenantreno). 7. P23DM (2,3-Dimetilfenantreno). 8. P19DM (1,9-Dimetilfenantreno). 9. P18DM (1,8-Dimetilfenantreno). 10. P12DM (1,2-Dimetilfenantreno).

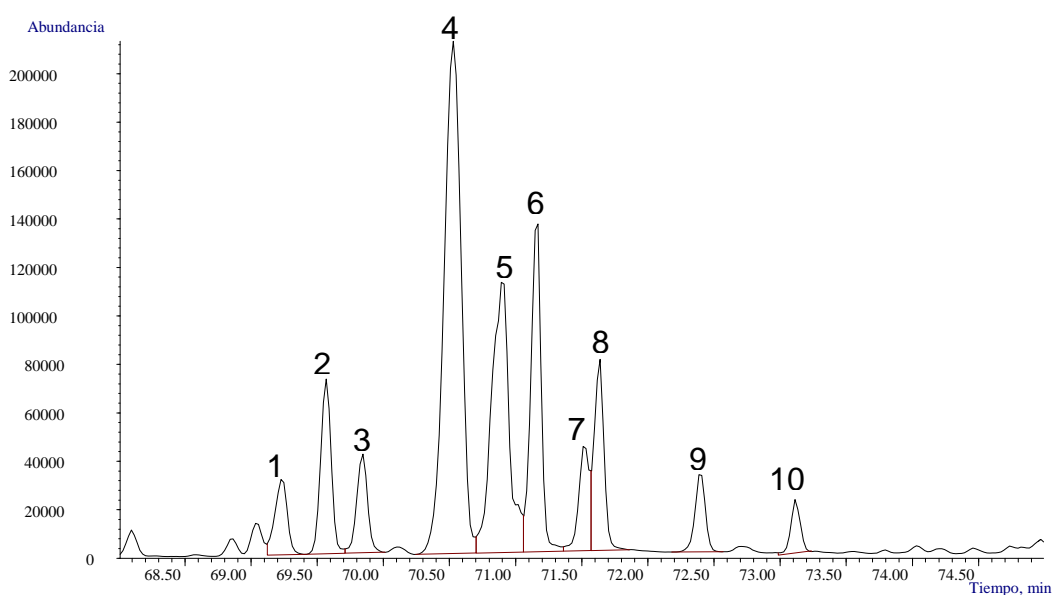


Figura 11. Corriente iónica extraída (m/z 231) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. TA20 (C20 Esteroide triaromático (TAS)). 2. TA21 (C21 TAS). 3. TA26S (C26 20S triaromático). 4. TA26R27S (C27 20S + C26 20R triaromático). 5. TA-DMCa. 6. TA-DMCb. 7. TA28S (C28 20S triaromático). 8. TA27R (C27 20R triaromático). 9. TA28R (C28 20R triaromático). 10. TA20 (C20 TAS).

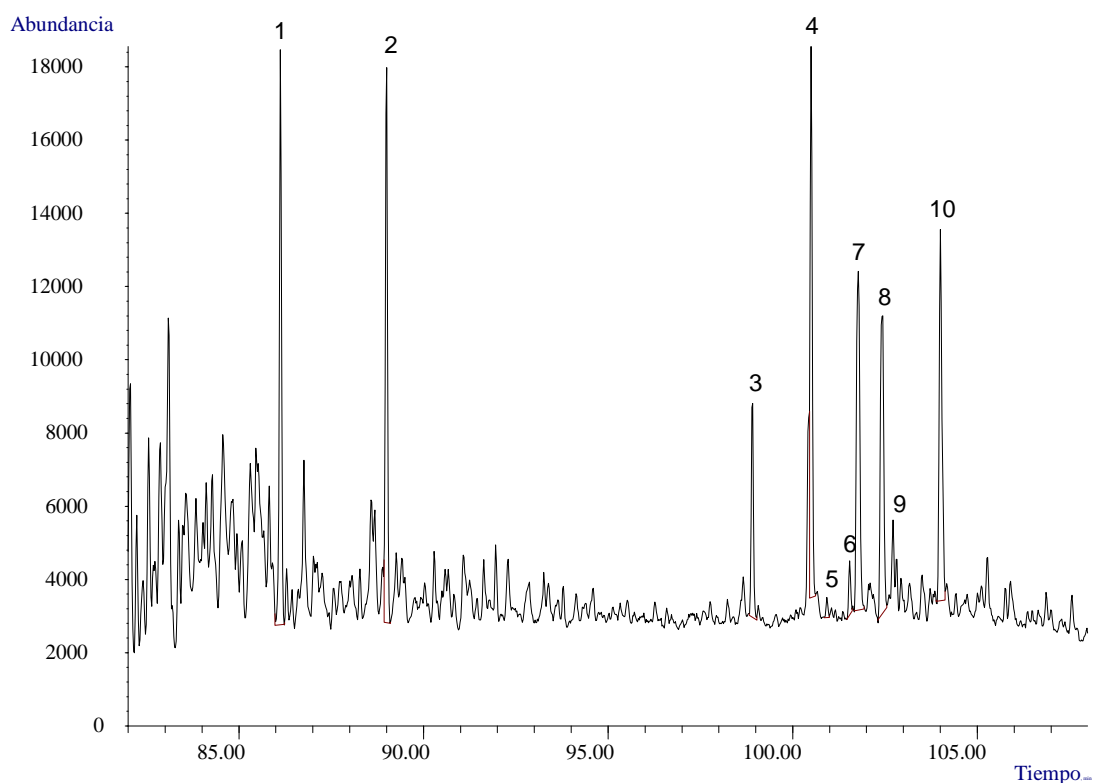


Figura 12. Corriente iónica extraída (m/z 245) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. TA3CS (C27 20S 3-Metil TAS). 2. TA4CS (C27 20S 4-Metil TAS). 3. TA2ES (C28 20S 2-Metil TAS). 4. TA3ES3CR (C28 20S 3-Metil y C27 20R 3-Metil TAS). 5. TA4ES4CR (C28 20S 4-Metil y C27 20R 4-Metil TAS). 6. TADA (Dinosteroide triaromático a). 7. TA3SS (C29 20S 3-Metil TAS). 8. TADB (Dinosteroide triaromático b). 9. TA4SS2ER (C29 20S 4-Metil y C28 20R 2-Metil TAS). 10. TA3ER (C28 20R 3-Metil TAS). 11. TA4ER (C28 20R 4-Metil TAS). 12. TADC (Dinosteroide triaromático c). 13. TADD (Dinosteroide triaromático d). 14. TA2SR (C29 20R 2-Metil TAS). 15. TA3SR (C29 20R 3-Metil TAS). 16. TADE (Dinosteroide triaromático e). 17. TA4SR (C29 20R 4-Metil TAS). 18. TADF (Dinosteroide triaromático f).

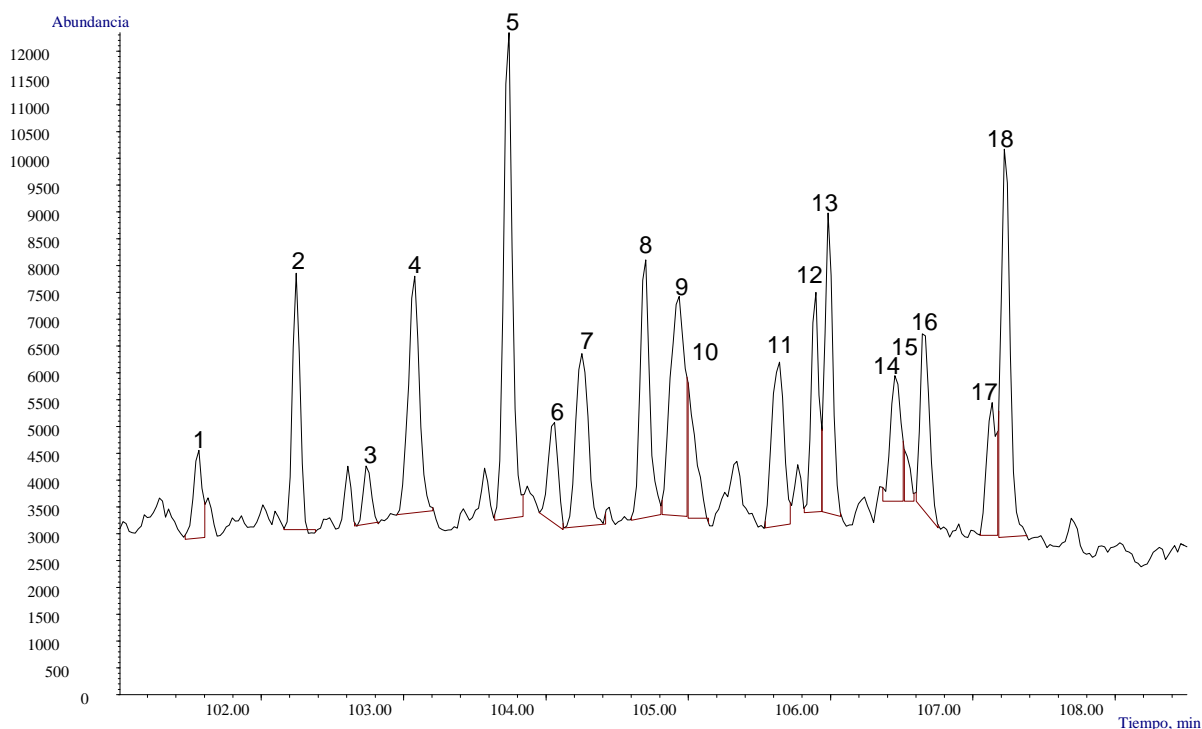
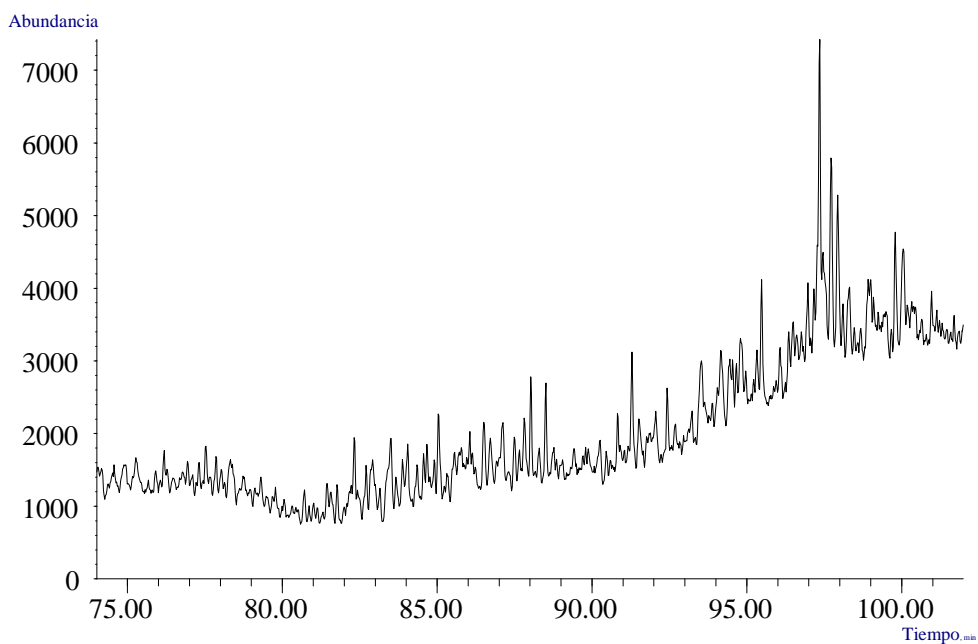


Figura 13. Corriente iónica extraída (m/z 253) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra C-GQ-1, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). No se determinó ninguno de estos biomarcadores: 1. MA21 (C21 esteroide monoaromático anillo C). 2. MA22 (C22 esteroide monoaromático). 3. MAB27S (C27 Reg 5b(H)10b (CH3)20S). 4. MAD27S (C27 Dia 10b(H)5b (CH3)20S). 5. MADB27R (C27 Dia 10b(H)5b (CH3)20R + C27 Reg 5b(H)10b (CH3)20R). 6. MAA27S (C27 Reg 5a(H)10b(CH3)20S). 7. MADB28S (C28 Reg 5b(H)10b (CH3)20S + C27 Dia 10a(H)5b (CH3)20S + C28 Dia 10b(H)5b (CH3)20S). 8. MADB28R (C28 Dia 10a(H)5a (CH3)20R + C28 Reg 5b(H)10b (CH3)20R). 9. MAA29S (C29 Reg 5a(H)10b (CH3)20S). 10. MADB29R (C29 Dia 10b(H)5b (CH3)20R + C29 Reg 5b(H)10b (CH3)20R). 11. MAA29R (C29 Reg 5a(H)10b (CH3)20R).



ANEXO 3

Figura 1. Corriente iónica extraída (m/z 142) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. N2M (2-Metilnaftaleno). 2. N1M (1-Metilnaftaleno).

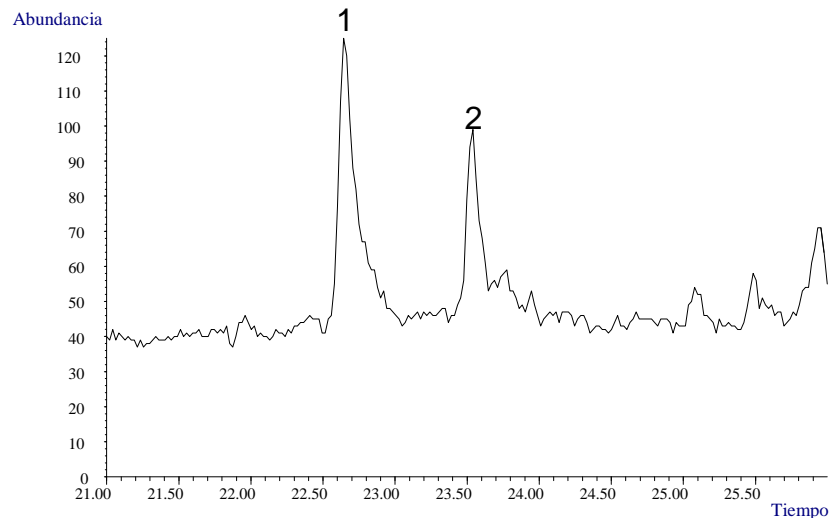


Figura 2. Corriente iónica extraída (m/z 156) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, Boyacá, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. N2E (2-Etilnaftaleno). 2. N1E (1-Etilnaftaleno). 3. N26DM (2,6-Dimetilnaftaleno). 4. N27DM (2,7-Dimetilnaftaleno). 5. N1317DM (1,3+1,7)-Dimetilnaftaleno. 6. N16DM (1,6-Dimetilnaftaleno). 7. N14DM (1,4-Dimetilnaftaleno). 8. N15DM (1,5-Dimetilnaftaleno). 9. N12DM (1,2-Dimetilnaftaleno).

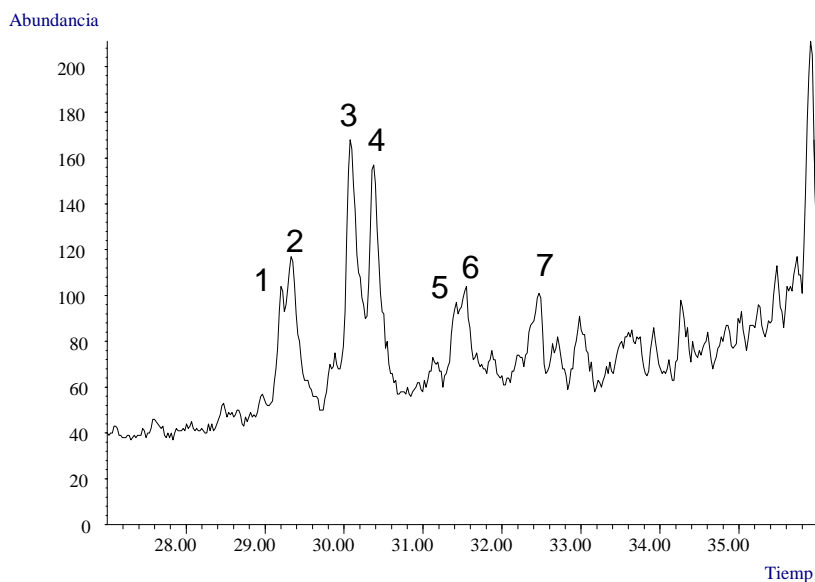


Figura 3. Corriente iónica extraída (m/z 168) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, Boyacá, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BP3M (3-Metilbifenilo). 2. BP4M (4-Metilbifenilo).

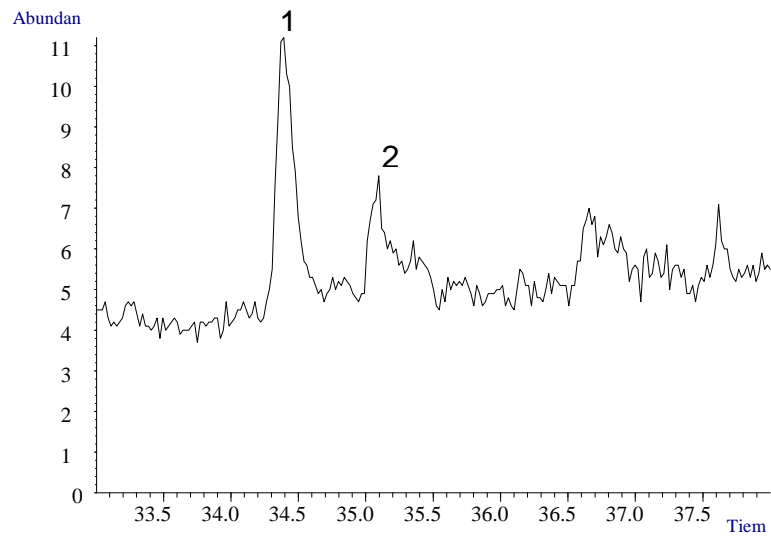


Figura 4. Corriente iónica extraída (m/z 170) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, Boyacá, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BB_EMN (Etil-metilnaftaleno). 2. AB_EMN (Etil-metilnaftaleno). 3. N137TM (1,3,7-Trimetilnaftaleno). 4. N136TM (1,3,6-Trimetilnaftaleno). 5. N146135T (1,4,6 + 1,3,5)-Trimetilnaftaleno. 6. N236TM (2,3,6-Trimetilnaftaleno). 7. N127M (1,2,7-Trimetilnaftaleno). 8. N167126T (1,6,7 + 1,2,6)-Trimetilnaftaleno. 9. N124TM (1,2,4-Trimetilnaftaleno). 10. N125TM (1,2,5-Trimetilnaftaleno).

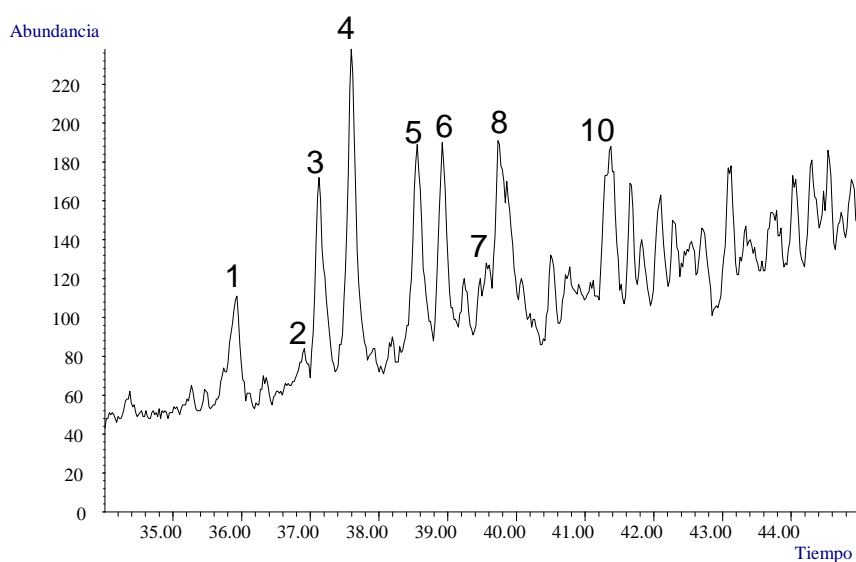


Figura 5. Corriente iónica extraída (m/z 178) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. PHEN (Fenantreno).

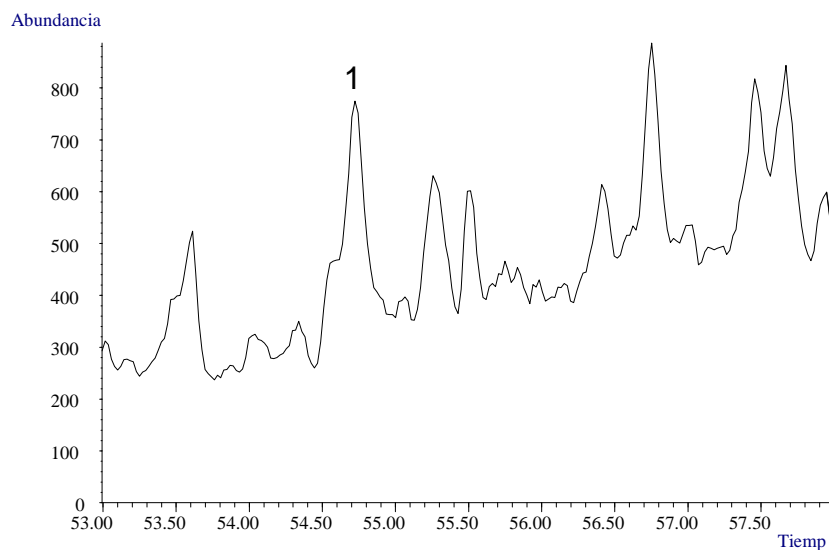


Figura 6. Corriente iónica extraída (m/z 184) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. 1357(1,3,5,7-Tetrametilnaftaleno). 2. 1367 (1,3,6,7-Tetrametilnaftaleno). 3. 1247 (1,2,4,7 + 1,2,4,6 + 1,4,6,7)-Tetrametilnaftalenos. 4. 1257 (1,2,5,7-Tetrametilnaftaleno). 5. 2367 (2,3,6,7-Tetrametilnaftaleno). 6. 1267 (1,2,6,7-Tetrametilnaftaleno). 7. 1237 (1,2,3,7-Tetrametilnaftaleno). 8. 1236 (1,2,3,6-Tetrametilnaftaleno). 9. 1256 (1,2,5,6-Tetrametilnaftaleno). 10. DBT (Dibenzotiofeno).

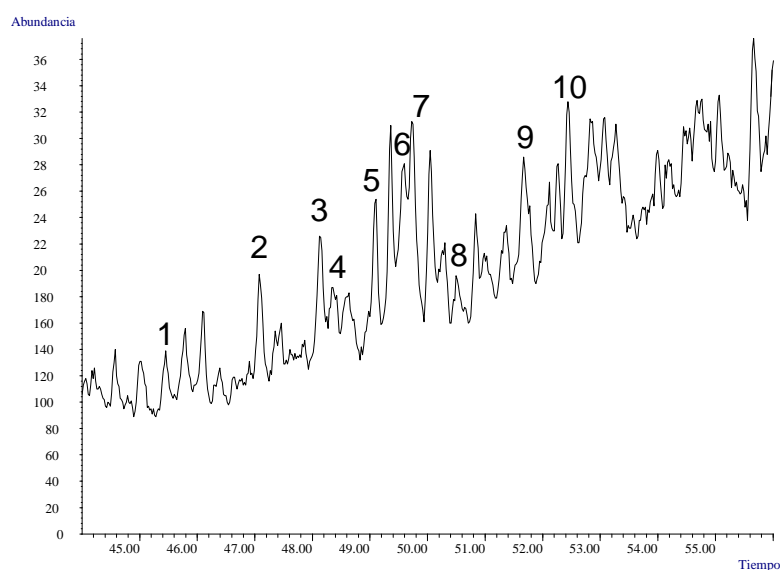


Figura 7. Corriente iónica extraída (m/z 191) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. BH32 (C32 Benzohopano). 2. BH33 Benzohopano. 3. BH34 (C34 Benzohopano). 4. BH35 (C35 Benzohopano).

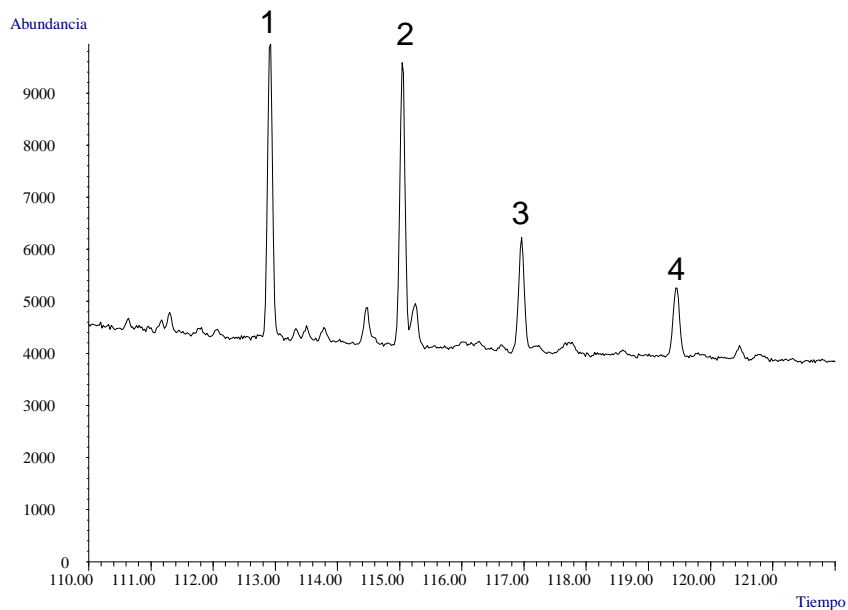


Figura 8. Corriente iónica extraída (m/z 192) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, Boyacá, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. P3M (3-Metilfenantreno). 2. P2M (2-Metilfenantreno). 3. P9M (9-Metilfenantreno). 4. P1M (1-Metilfenantreno).

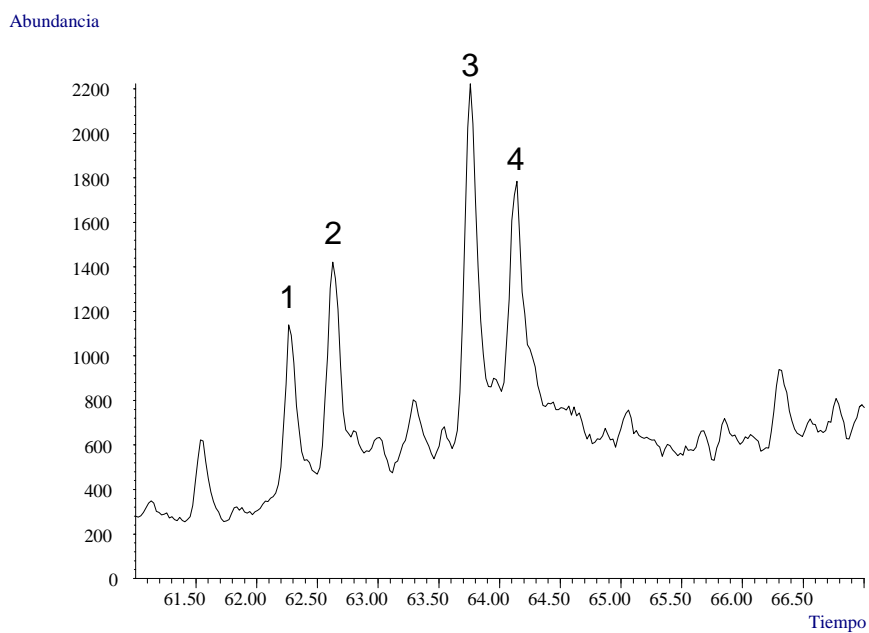


Figura 9. Corriente iónica extraída (m/z 198) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5M (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. DBT4M (4-Metildibenzotiofeno). 2. DBT23M (2+ 3)-Metildibenzotiofenos. 3. DBT1M (1-Metildibenzotiofeno).

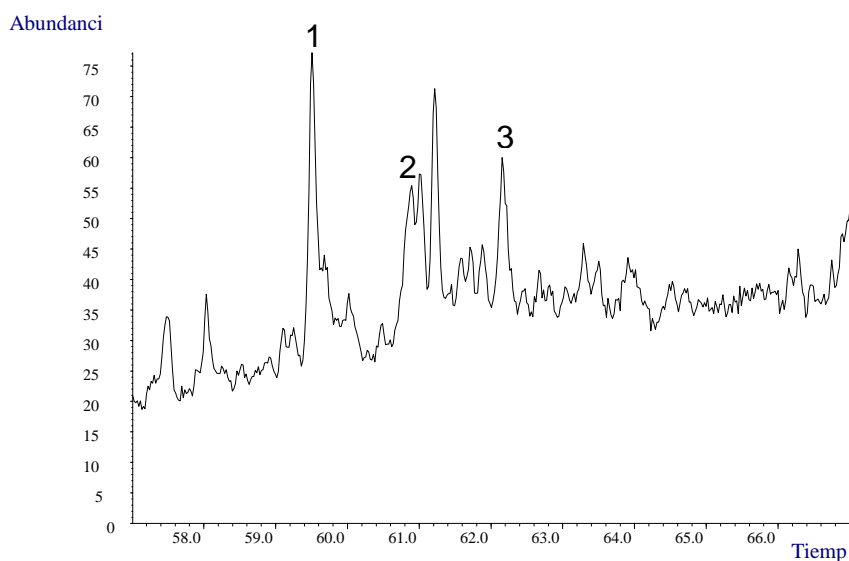


Figura 10. Corriente iónica extraída (m/z 206) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. P36DM (3,6-Dimetilfenantreno). 2. P26DM (2,6-Dimetilfenantreno). 3. P27DM (2,7-Dimetilfenantreno). 4. P12390DM (3,9+3,10+2,10+1,3)-Dimetilfenantrenos. 5. P29DM (2,9-Dimetilfenantreno). 6. P17DM (1,7-Dimetilfenantreno). 7. P23DM (2,3-Dimetilfenantreno). 8. P19DM (1,9-Dimetilfenantreno). 9. P18DM (1,8-Dimetilfenantreno). 10. P12DM (1,2-Dimetilfenantreno).

Abundancia

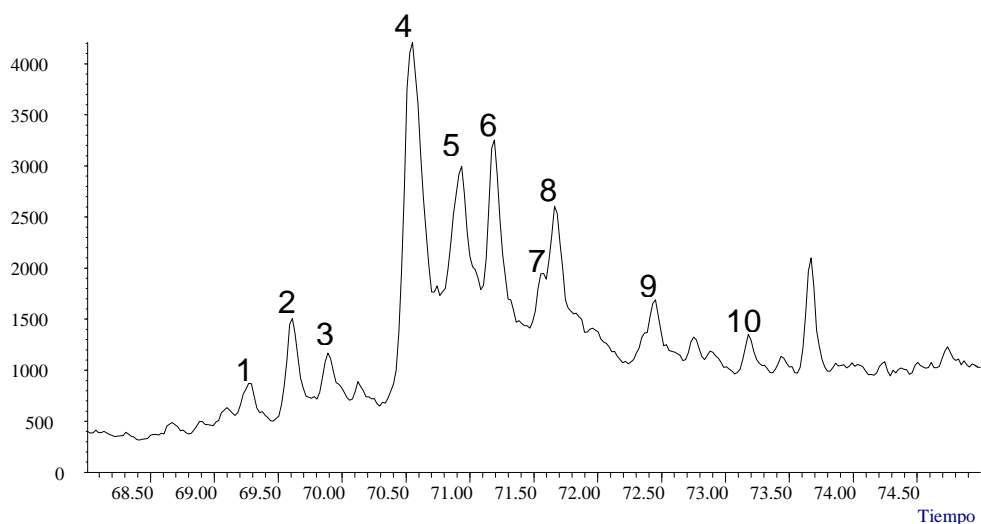


Figura 11. Corriente iónica extraída (m/z 231) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. TA20 (C20 Esteroide triaromático (TAS)). 2. TA21 (C21 TAS). 3. TA26S (C26 20S triaromático). 4. TA26R27S (C27 20S + C26 20R triaromático). 5. TA-DMCa. 6. TA-DMCb. 7. TA28S (C28 20S triaromático). 8. TA27R (C27 20R triaromático). 9. TA28R (C28 20R triaromático). 10. TA20 (C20 TAS).

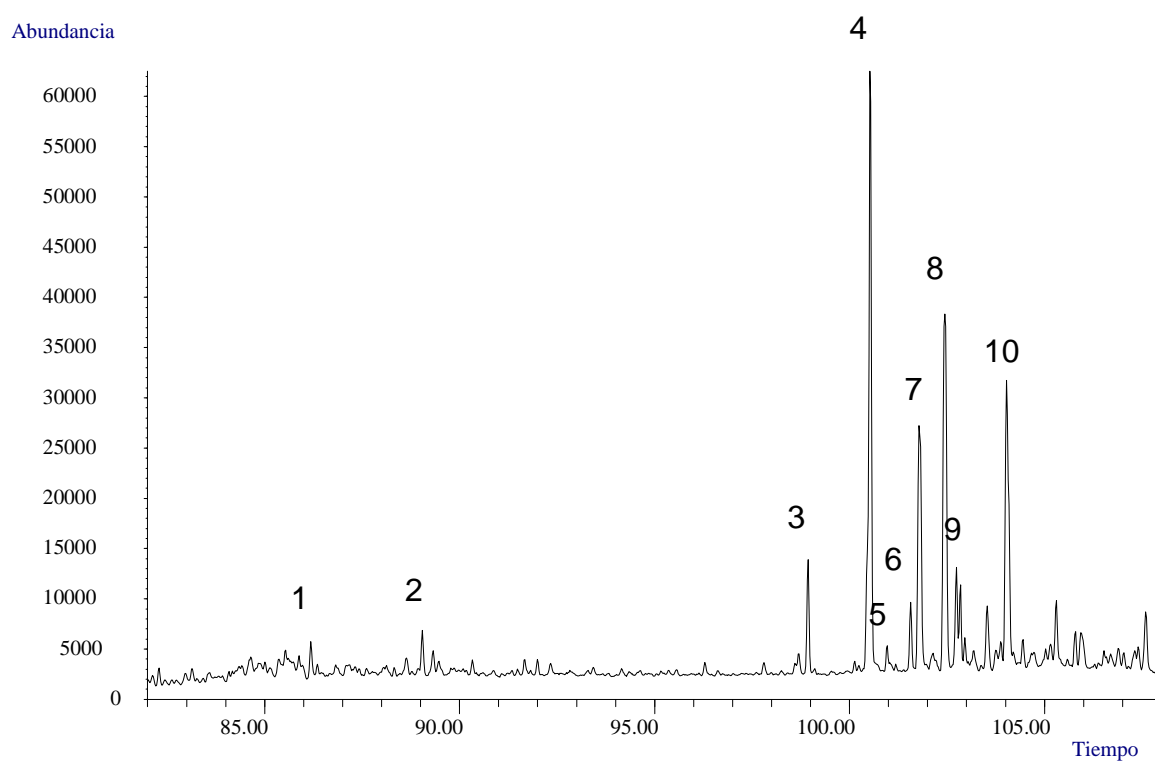


Figura 12. Corriente iónica extraída (m/z 245) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60mx0.25mmx0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. TA3CS (C27 20S 3-Metil TAS). 2. TA4CS (C27 20S 4-Metil TAS). 3. TA2ES (C28 20S 2-Metil TAS). 4. TA3ES3CR (C28 20S 3-Metil y C27 20R 3-Metil TAS). 5. TA4ES4CR (C28 20S 4-Metil y C27 20R 4-Metil TAS). 6. TADA (Dinosteroide triaromático a). 7. TA3SS (C29 20S 3-Metil TAS). 8. TADB (Dinosteroide triaromático b). 9. TA4SS2ER (C29 20S 4-Metil y C28 20R 2-Metil TAS). 10. TA3ER (C28 20R 3-Metil TAS). 11. TA4ER (C28 20R 4-Metil TAS). 12. TADC (Dinosteroide triaromático c). 13. TADD (Dinosteroide triaromático d). 14. TA2SR (C29 20R 2-Metil TAS). 15. TA3SR (C29 20R 3-Metil TAS). 16. TADE (Dinosteroide triaromático e). 17. TA4SR (C29 20R 4-Metil TAS). 18. TADF (Dinosteroide triaromático f).

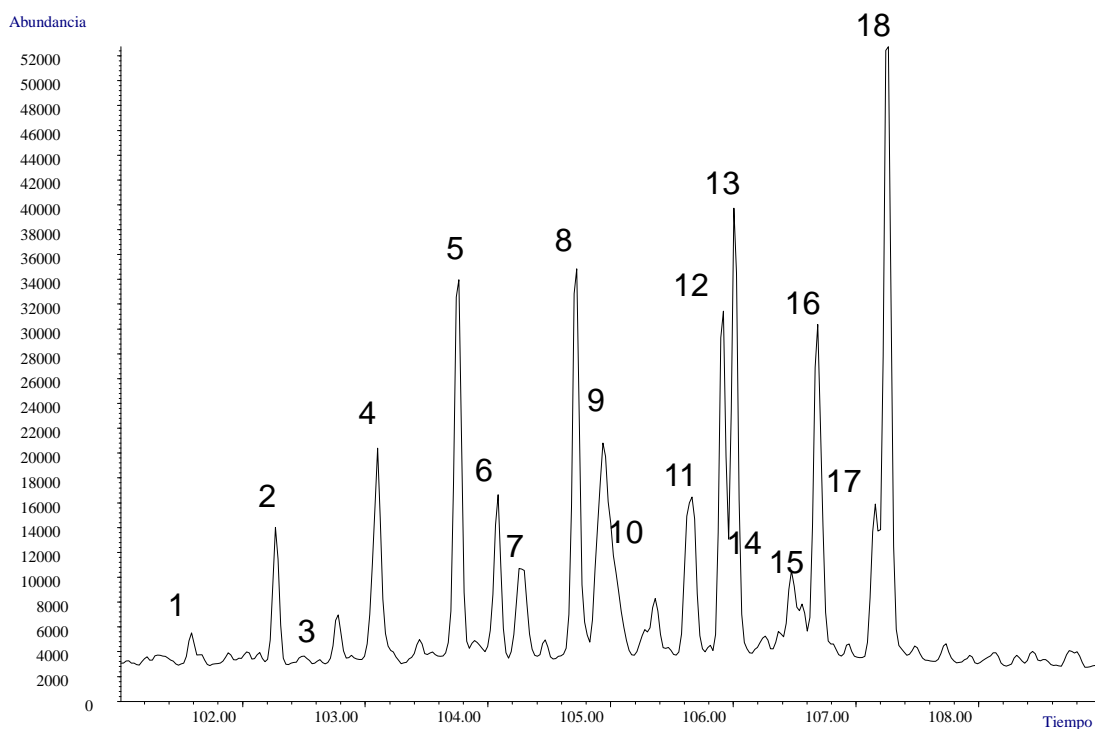
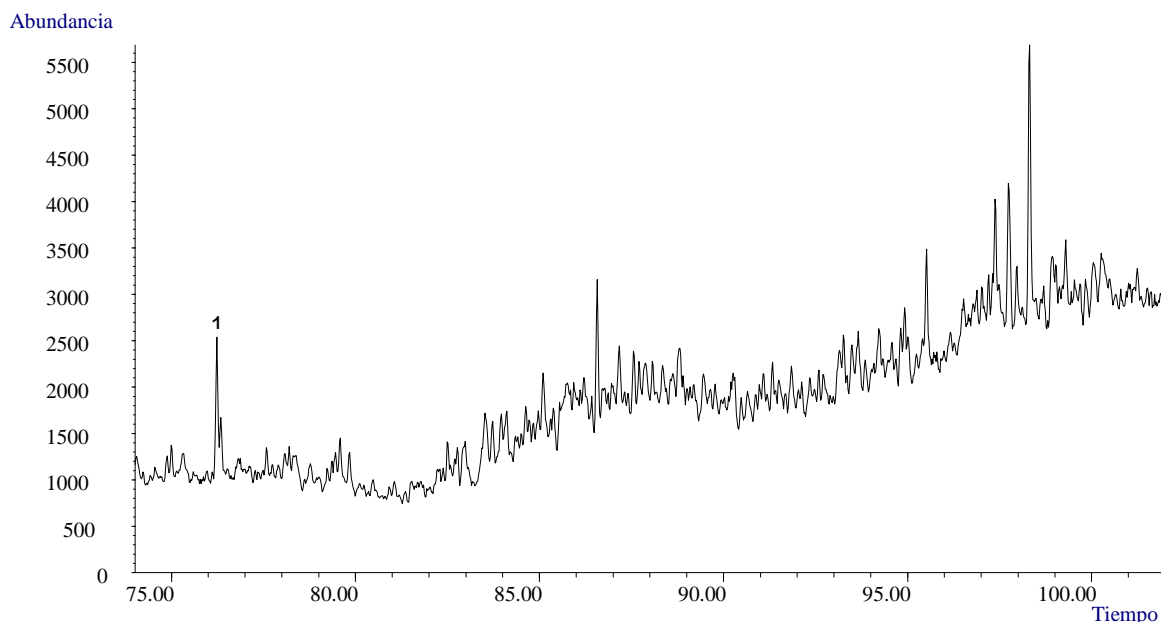

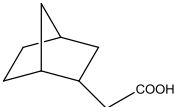
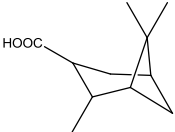
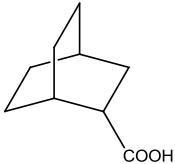
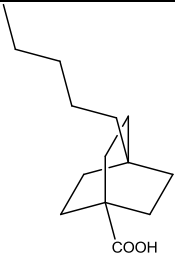
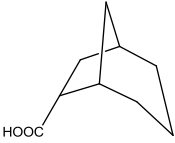
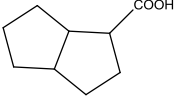


Figura 13. Corriente iónica extraída (m/z 253) obtenida por GC-MS en modo SIM de la fracción aromática de crudo, muestra de crudo biodegradado C-MSTB, columna DB-5MS (60m x 0.25mm x 0.25 μ m), MSD (EI, 70 eV). 1. MA21 (C21 esteroide monoaromático anillo C). 2. MA22 (C22 esteroide monoaromático). 3. MAB27S (C27 Reg 5b(H)10b (CH₃)₂OS). 4. MAD27S (C27 Dia 10b(H)5b (CH₃)₂OS). 5. MADB27R (C27 Dia 10b(H)5b (CH₃)₂OR + C27 Reg 5b(H)10b (CH₃)₂OR). 6. MAA27S (C27 Reg 5a(H)10b(CH₃)₂OS). 7. MADB28S (C28 Reg 5b(H)10b (CH₃)₂OS + C27 Dia 10a(H)5b (CH₃)₂OS + C28 Dia 10b(H)5b (CH₃)₂OS). 8. MADB28R (C28 Dia 10a(H)5a (CH₃)₂OR + C28 Reg 5b(H)10b (CH₃)₂OR). 9. MAA29S (C29 Reg 5a(H)10b (CH₃)₂OS). 10. MADB29R (C29 Dia 10b(H)5b (CH₃)₂OR + C29 Reg 5b(H)10b (CH₃)₂OR). 11. MAA29R (C29 Reg 5a(H)10b (CH₃)₂OR). Los biomarcadores 2 al 11 no se determinaron en la muestra de crudo biodegradado mina Santa Teresa (superficie), Boyacá.



ANEXO 4

Tabla 1. Estructura química de productos de la biodegradación de crudo para el análisis por UHPLC-Orbitrap-MS (modo negativo).

Estructura	Fórmula molecular	Masa [M-H] ⁻ , u.m.a
	$C_8H_{12}O_2$	139.07590
	$C_9H_{14}O_2$	153.09155
	$C_{11}H_{18}O_2$	181.12285
	$C_9H_{14}O_2$	153.09155
	$C_{14}H_{24}O_2$	223.16980
	$C_9H_{14}O_2$	153.09155
	$C_9H_{14}O_2$	153.09155

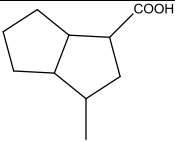
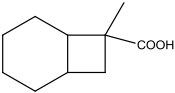
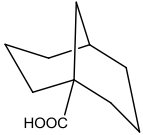
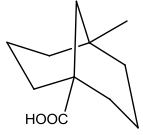
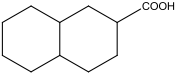
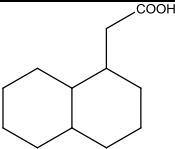
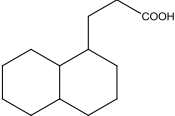
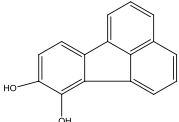
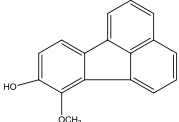
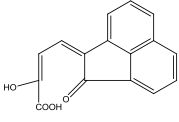
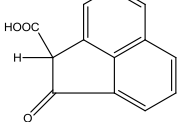
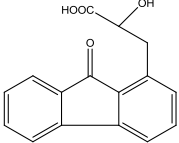
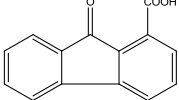
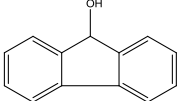
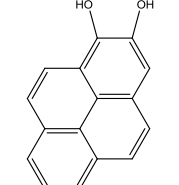
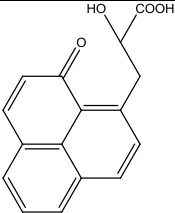
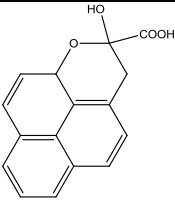
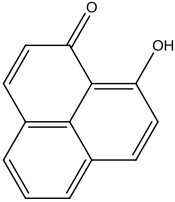
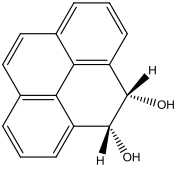
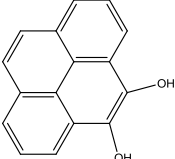
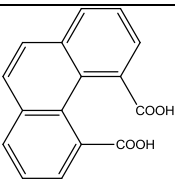
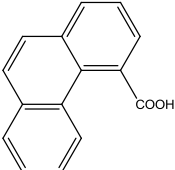
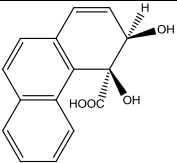
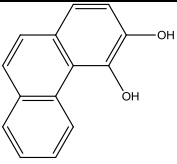
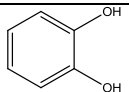
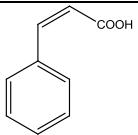
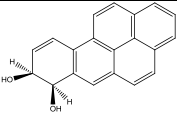
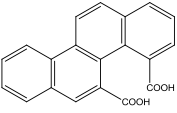
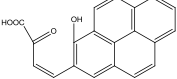
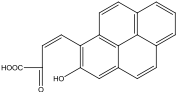
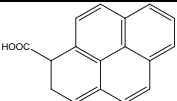
Estructura	Fórmula molecular	Masa [M-H] ⁻ , u.m.a
	$C_{10}H_{16}O_2$	167.10720
	$C_{10}H_{16}O_2$	167.10720
	$C_{10}H_{16}O_2$	167.10720
	$C_{11}H_{18}O_2$	181.12285
	$C_{11}H_{18}O_2$	181.12285
	$C_{12}H_{20}O_2$	195.13850
	$C_{13}H_{22}O_2$	209.15415

Tabla 2. Estructura química de biomarcadores aromáticos biodegradados para el análisis por UHPLC-Orbitrap-MS (modo negativo).

Estructura	Fórmula molecular	Masa [M-H] ⁻ , u.m.a
	C ₁₆ H ₁₀ O ₂	233.06025
	C ₁₇ H ₁₂ O ₂	247.07590
	C ₁₆ H ₁₀ O ₄	265.05008
	C ₁₃ H ₈ O ₃	211.03952
	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.06573
	C ₁₄ H ₈ O ₃	223.03952
	C ₁₃ H ₁₀ O	181.06534
	C ₁₆ H ₁₀ O ₂	233.06025

Estructura	Fórmula molecular	Masa [M-H] ⁻ , u.m.a
	$C_{16}H_{12}O_4$	267.06573
	$C_{16}H_{12}O_4$	267.06573
	$C_{13}H_8O_2$	195.04460
	$C_{16}H_{12}O_2$	235.07590
	$C_{16}H_{10}O_2$	233.06025
	$C_{16}H_{10}O_4$	265.05008
	$C_{15}H_{10}O_2$	221.06025

Estructura	Fórmula molecular	Masa [M-H] ⁻ , u.m.a
	$C_{15}H_{12}O_4$	255.06573
	$C_{14}H_{10}O_2$	209.06025
	$C_6H_6O_2$	109.02895
	$C_9H_8O_2$	147.04460
	$C_{20}H_{14}O_2$	285.09155
	$C_{20}H_{12}O_4$	315.06573
	$C_{20}H_{12}O_4$	315.06573
	$C_{20}H_{12}O_4$	315.06573
	$C_{17}H_{12}O_2$	247.07590

ANEXO 5

Figura 1. Fragmentogramas de masas $[M-H]^-$: 211.03952 ($C_{13}H_8O_3$) obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ con diferentes energías HCD (10, 30 y 50 eV) de la fracción F2 con *clean-up* de la muestra C-MSTB.

RT: 0.00 - 12.01 SM: 7G

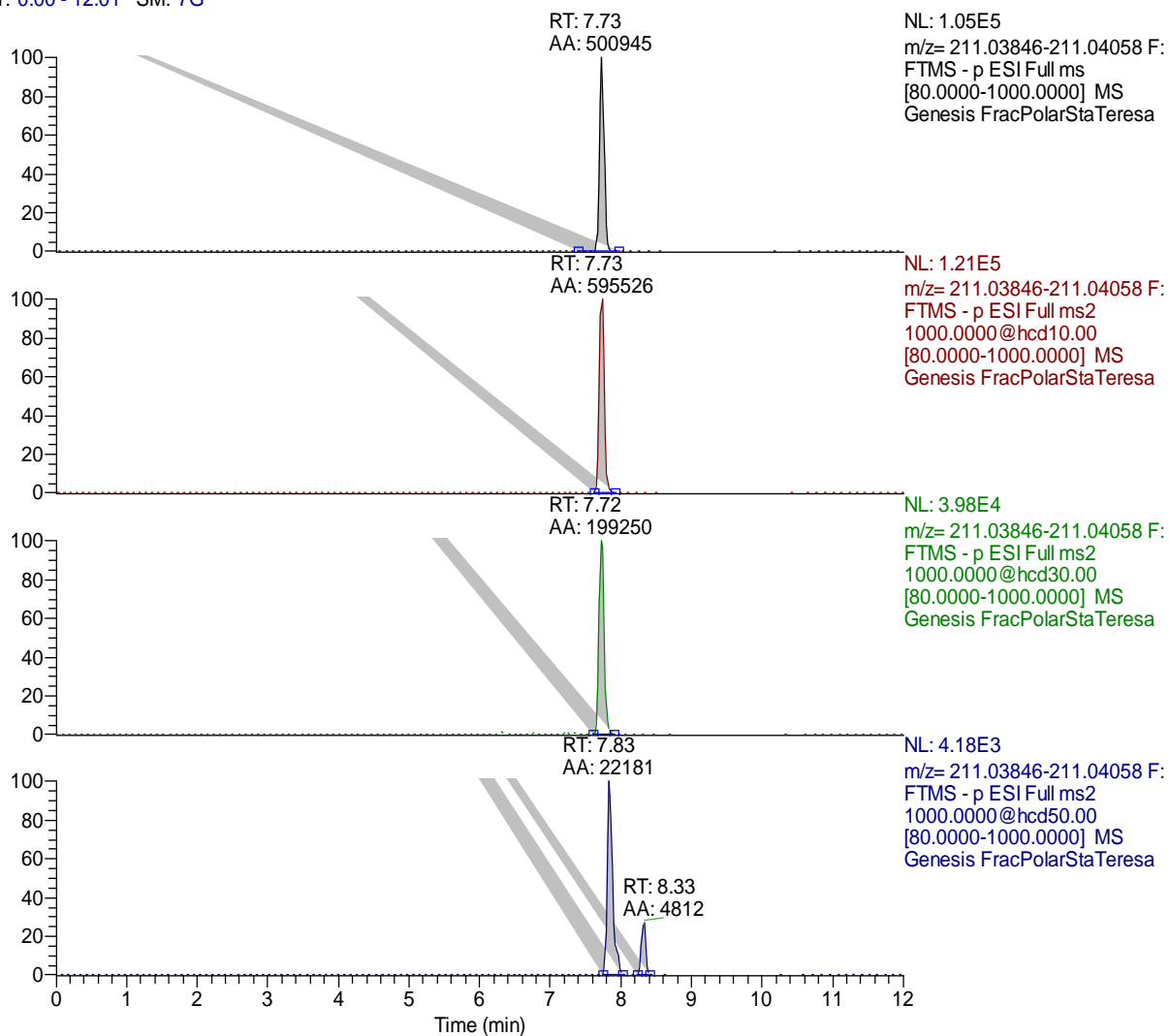


Figura 2. Fragmentogramas de masas [M-H]⁻: 181.06534 (C₁₃H₁₀O) obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁻ con diferentes energías HCD (10, 30 y 50 eV) de la fracción F2 con *clean-up* de la muestra C-MSTB.

RT: 0.00 - 12.01 SM: 7G

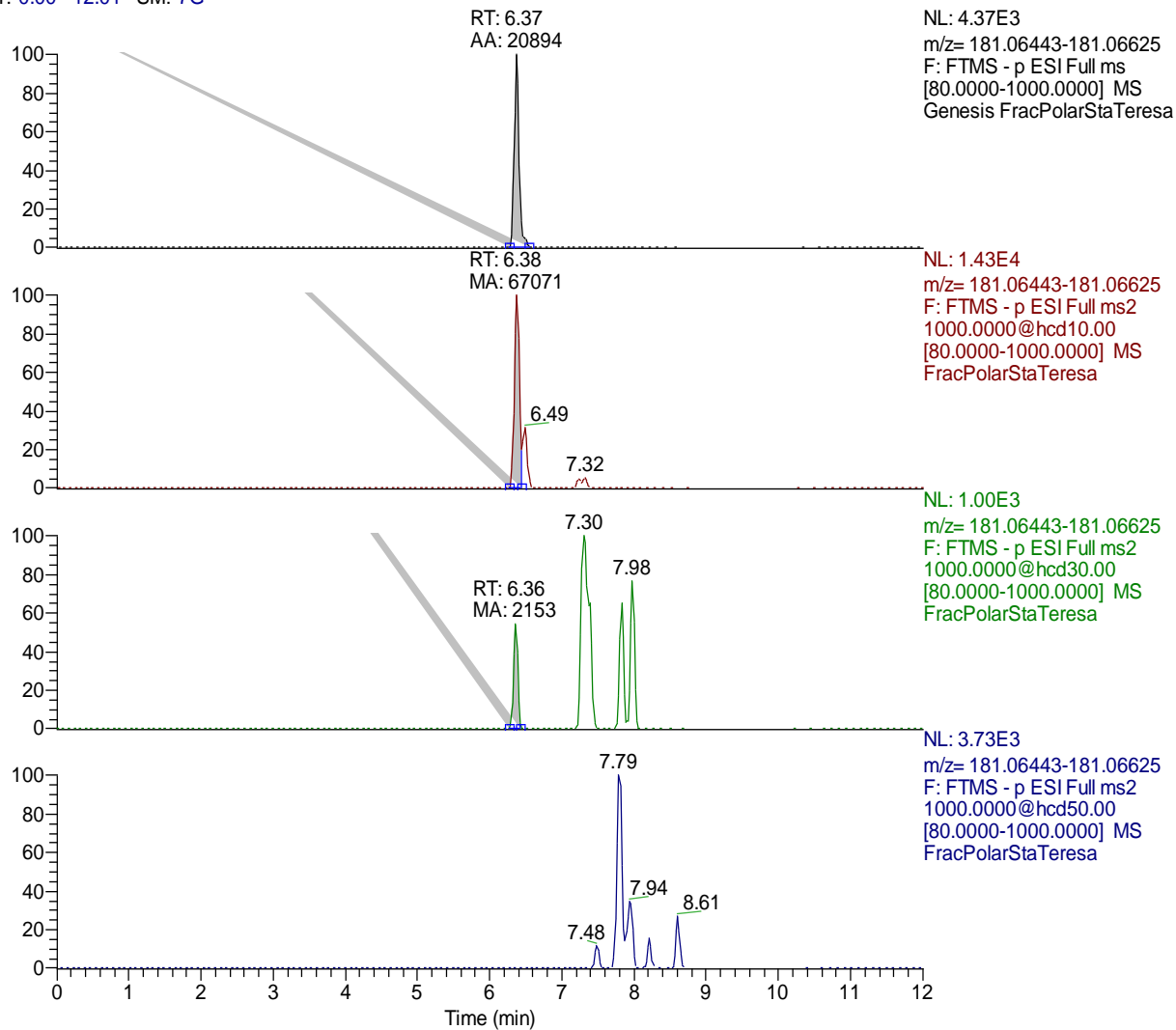


Figura 3. Fragmentogramas de masas [M-H]⁺: 255.06573 (C₁₅H₁₂O₄) obtenidos por UHPLC-Orbitrap-MS con interfaz ESI⁺ con diferentes energías HCD (10, 30 y 50 eV) de la fracción F2 con *clean-up* de la muestra C-MSTB.

RT: 0.00 - 12.01 SM: 7G

