

LA HUELLA DIGITAL DE BÚNKER PARA IDENTIFICACIÓN DE DERRAMES DE COMBUSTIBLE

Adrián Flores¹, Paola Fuentes Schweizer^{2*}

¹ Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, 11501-2060, San José, Costa Rica.

² CELEQ, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, 11501-2060, San José, Costa Rica.

Recibido enero 2019; aceptado setiembre 2020

Abstract

Validation and implementation of a method to obtain the fingerprint of bunker samples was performed by gas chromatography-mass spectrometry. The parameters considered in the validation were linearity, variance and analytical error. Linearity was evaluated with calibration curves from linear alkanes, the correlation coefficients obtained were greater than 0,9850. Variance was analyzed measuring eight times the same standard the coefficient of variation was less than 5%. For the analytical error a study of duplicate samples was performed, obtaining coefficients of variation between replicates under 5%. These data demonstrate that the validation is agreeing to the intended use of the method. A bunker sample was prepared by an extern to be unknown by the analyst to corroborate the method. The analyst was able to identify each of the samples by visual comparison and by diagnostic relations of the chromatograms. The results demonstrate that the method is effective to identify various samples by fingerprint comparison.

Resumen

Se realizó la validación e implementación de un método por cromatografía de gases-masas para la obtención de la huella digital de muestras de bunker. Los parámetros de mérito considerados en la validación fueron: linealidad, varianza y error analítico. La linealidad se evaluó con curvas de calibración de alcanos lineales obteniendo coeficientes de correlación superiores a 0.9850. Para la varianza se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 5 % al analizar ocho veces un mismo estándar. En cuanto al error analítico se realizó un estudio de duplicados de muestras, se obtuvieron coeficientes de variación entre réplicas menores al 5 %. Con estos datos se demuestra que la validación está de acuerdo con el uso previsto del método. Para la implementación se analizaron muestras de bunker incógnitas, se logró la identificación de cada una de las muestras al comparar visualmente y mediante relaciones de diagnóstico los cromatogramas. Con esto se comprueba la efectividad del método en la identificación de diversas muestras al comparar su huella digital.

Key words: Bunker, Oil Spill, Fingerprint, Gas Chromatography, Mass spectrometry.

Palabras clave: Bunker, Derrame petróleo, Huella Digital, Cromatografía de gases, Espectrometría de masas.

I. INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso que se aprovecha en diferentes áreas como lo son el abastecimiento de poblaciones, la generación de energía, actividades de bienes comerciales, entre otros. Si se contamina por alguna causa, se presentan afectaciones tanto para el ambiente como para los consumidores (González et al., 2006; Prieto Díaz & Martínez de Villa Pérez, 1999; Vargas Fallas et al., 2009).

El transporte de petróleo por vía marina entre las zonas productoras, zonas de procesamiento y las consumidoras, representa una de las principales fuentes de vertidos de petróleo al mar que

*Autor para correspondencia: paola.fuentes@ucr.ac.cr

pueden ser de tipo accidental o intencional, afectando tanto las zonas costeras como el mar abierto (Albaigés, 2007).

Se han realizado diversos estudios sobre la química de la huella digital de los contaminantes de petróleo en ambientes marinos, con el fin de identificar las fuentes del petróleo derramado. Esta huella digital se ha convertido en una herramienta de la ciencia forense. La fuente original de las mezclas químicas complejas se puede identificar por medio de la abundancia relativa de compuestos que son clave, por ejemplo, los hidrocarburos que formen un patrón químico, o mediante la identificación de compuestos o marcadores específicos característicos de la fuente. La gran variabilidad en la abundancia relativa de estos compuestos entre los diferentes crudos y sus productos refinados, es lo que permite la obtención de la huella digital (Boehm et al., 1997).

Una de las opciones de cromatografía de gases más avanzadas es la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS), la cual puede brindar una caracterización del contenido y distribución de los componentes principales del petróleo. Esta tiene un alto nivel de resolución, una mayor sensibilidad y representa en la actualidad, la principal forma de determinar la huella digital en muestras de petróleo, basados en los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y los biomarcadores (Christensen & Tomasi, 2007; Prieto Díaz & Martínez de Villa Pérez, 1999; Sandison et al., 2003).

La metodología europea CEN/TR 15522-2 es un ensayo forense que permite caracterizar e identificar una fuente de petróleo resultante de un derrame accidental o una descarga intencional, ya sea en aguas marinas, estuarios y otros ambientes acuáticos; mediante la comparación de muestras de vertidos con las fuentes sospechosas utilizando la técnica de GC-MS. La norma provee el procedimiento analítico y las especificaciones para el procesamiento de los datos para identificar petróleos derramados y correlacionarlos con las fuentes sospechosas. En el caso de que no se tengan a disposición las fuentes sospechosas, la metodología permite caracterizar al petróleo derramado. El protocolo a aplicar se encuentra restringido a que el petróleo contenga una proporción significativa de hidrocarburos con un punto de ebullición arriba de los 200 °C (Comité Europeo de Normalización, 2009).

En Costa Rica no se ha implementado una metodología con la técnica de GC-MS para obtener la huella digital del petróleo, la cual permitiría identificar los vertidos que se realicen intencional y accidentalmente en la zona costera.

El objetivo de este trabajo es la implementación y la validación del método de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para la obtención de la huella digital de bunker (producto derivado del petróleo).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras:

Para las posibles fuentes, la extracción de los componentes importantes en el estudio de huella digital del bunker se realizó disolviendo una masa de (125 a 150) mg de muestra en 1.00 mL de diclorometano. Se eluyó por una columna de sulfato de sodio utilizando 4 mL de hexano. Se concentró utilizando un flujo de nitrógeno hasta un volumen de aproximadamente 500 μ L. De acá se tomó 50 μ L y se eluyó en una segunda columna de alúmina previamente desactivada con 7 mL de hexano.

Para las muestras en agua se realizó una extracción líquido-líquido con tres porciones de diclorometano. El extracto se eluyó por un embudo con sulfato de sodio y se concentró utilizando un rotavapor inicialmente, seguido de un flujo de nitrógeno hasta un volumen de 500 μ L. De acá se tomó 50 μ L y se eluyó en una segunda columna de alúmina previamente desactivada con 7 mL de hexano.

Análisis de muestras:

Se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent modelo 7890A. Para el análisis de los datos se utilizó el programa MSD ChemStation (versión

E.02.00.493). La columna capilar utilizada fue una HP-5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). Se utilizó como gas de arrastre Helio UAP con un flujo de 1.1 mL/min. Para el horno se mantuvo la temperatura en 42 °C por 1.30 min y luego se aplicó una rampa de 5.5 °C/min hasta alcanzar los 300 °C. Para el método en modo de SCAN se trabajó en un intervalo de unidades de masa atómica de 50-450 (Comité Europeo de Normalización, 2009).

Para el desarrollo del método en el modo de monitoreo de iones (SIM) se preparó un coctél con los siguientes alcanos lineales: decano, tridecano, hexadecano, nonadecano, docosano, hexacosano y triacontano y con estos se determinó el tiempo de retención para cada uno de los grupos del SIM.

Optimización:

Se verificó la identificación y resolución del equipo utilizando diferentes compuestos, entre estos se pueden mencionar: nonano, decano, naftaleno, dodecano, bifenilo, fluoreno, antraceno, fenantreno, nonadecano, eicosano, heneicosano, pireno, docosano, tricosano, tetracosano, criseno, pentacosano, hexacosano, octacosano, triacontano, dotriacontano, hexatriacontano, octatriacontano, tetracontano, pristano, fitano, tridecano, hexadecano. Todos se prepararon a 100 mg/L.

Se preparó muestras de búnker de acuerdo al proceso de extracción para evaluar la concentración de inyección. Para esto se utilizó diferentes volúmenes entre 25 μ L y 300 μ L para la purificación de la muestra y se definió la concentración óptima para obtener la mejor resolución posible.

Se optimizó la rampa de temperatura y el tiempo total de corrida, variando las condiciones hasta obtener buena separación y una correcta identificación.

Validación del método:

Para la validación del método se preparó un coctel de los siguientes alcanos lineales: nonadecano, eicosano, heneicosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, octacosano y triacontano, y de ese coctel se prepararon estándares a tres niveles de concentración en un intervalo de (0.5 a 50) mg/L.

Se validaron los siguientes parámetros de mérito: linealidad (aceptable $r > 0.985$), precisión como repetibilidad de inyección a partir de ocho replicas del estándar intermedio (aceptable $CV < 5\%$), precisión como repetibilidad del método a partir de las variaciones en las relaciones de diagnóstico de réplicas de muestra de bunker (aceptable $CV < 5\%$).

Análisis de datos:

Se siguió la metodología empleada en la norma CEN/TR 15522-2(Comité Europeo de Normalización, 2009), con la modificación de la rampa de temperatura, se utilizaron únicamente 30 relaciones de diagnóstico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la optimización del método, para esto se desarrolló el método de monitoreo de iones (SIM) y se inyectó el coctel indicado en la sección anterior, una vez obtenidos los cromatogramas se analizaron y se determinó los tiempos de retención para cada alcano lineal. En el cuadro I se muestran los datos para el método SIM utilizados, además se comprobó el porcentaje de semejanza en la identificación de las señales, con semejanzas en espectros de masas superiores al 95% para todos los compuestos de la mezcla.

Cuadro I. Grupos para montar el método de monitoreo de iones para análisis de CGMS.

Grupo	Identificación de grupo (CX)	Iones
1		83, 85, 138
2	C10	83, 85, 123, 128, 134, 142, 148, 152, 166, 180, 194
3	C13	83, 85, 123, 152, 154, 156, 162, 166, 168, 170, 176, 180, 184, 190, 194
4	C16	83, 85, 178, 180, 184, 190, 191, 192, 194, 198, 208, 212, 240
5	C19	83, 85, 191, 192, 202, 206, 208, 212, 215, 216, 219, 220, 226, 234, 240
6	C22	83, 85, 191, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 228, 230, 231, 234, 240, 242, 244, 256
7	C26	83, 85, 191, 205, 217, 218, 231, 242, 244, 252, 256, 270, 284
8	C30	83, 85, 191, 205, 217, 218, 231, 276, 278

Se ensayó el método con el fin de ajustar condiciones con muestras de bunker, una vez optimizado los parámetros se procedió a realizar la validación. En la validación del método se contemplaron los siguientes parámetros de mérito: linealidad y precisión (en condiciones de repetibilidad tanto para el método como para el equipo).

La linealidad se ensayó al inyectar patrones en tres niveles de concentración de alcanos lineales (0.5 a 50.0) mg/L, se evaluó mediante el coeficiente de correlación para los tres niveles de concentración. En todos los casos se obtuvo un coeficiente mayor a 0.9850, por lo que se considera adecuada la linealidad del método. En el Cuadro II se pueden observar los valores de coeficiente de correlación obtenidos en la evaluación de la linealidad. Además, se aplicó un estudio estadístico de t de student ($p=0.05$) para correlación de datos con el siguiente modelo:

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde H_0 es que no existe una correlación entre las variables y H_1 es que si existe una correlación entre las variables, al obtener un valor de t calculado mayor al valor de t tabulado para $n-2$ ($t_{\text{tab}} = 2.37$) grados de libertad en un contraste de dos colas se rechaza H_0 en todos los casos.

Cuadro II. Resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del método.

Compuesto	Coefficiente de correlación	t calculado
Nonadecano	0.9998	49.99
Eicosano	0.9999	70.71
Heneicosano	0.9996	35.35
Tricosano	0.9995	31.61
Tetracosano	0.9998	49.99
Pentacosano	0.9971	13.10
Octacosano	0.9966	70.71
Triacotano	0.9857	9.77

La repetibilidad del instrumento se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV), se definió como parámetro un 5 % máximo de variación entre las áreas para cada alcano lineal. Se ensayó al inyectar un total de ocho veces un estándar de alcanos lineales de concentración media (respecto a la curva de calibración utilizada en el caso de la linealidad). Los datos obtenidos de CV oscilaron entre 3.7 % y 5.0 %. Con lo que se declara conforme este parámetro.

La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de duplicados de muestras de bunker. Se definió como parámetro de aceptación un 5 % como máximo de coeficiente de variación en las relaciones de diagnóstico. Los resultados arrojados por el análisis demuestran que el error aleatorio en el método es bajo y no afecta los resultados al obtener coeficientes de variación inferiores al entre 0.3 % y 4 %.

Una vez finalizado el proceso de separación cromatográfica y detección con el método SIM en el espectrómetro de masas, se analizó los cromatogramas de los siguientes iones (relación masa carga): 212, 226, 206, 220, 230, 242, 192, 198, 85, 234, 216, 217, 218, 231 y 191, estos iones corresponden a los cromatogramas principales aislados por el método SIM, de los compuestos de mayor importancia en el estudio de huella digital, como lo son los HAP, biomarcadores y alcanos.

Se trabaja con estos compuestos debido a las propiedades características que presentan, las cuales los convierten en compuestos de importancia en los procesos de envejecimiento, debido a su baja reactividad como los biomarcadores, o debido a su lenta degradación como los HAP respecto a otros componentes en el búnker o petróleo.

Para la identificación de las señales y la selección de las relaciones de diagnóstico a evaluar se siguió lo planteado en la norma europea CEN/TR 15522-2. En general en la Norma, los compuestos que se incluyen para poder identificar la fuente de un derrame o comparar si dos muestras pertenecen a una misma fuente original contemplan varias familias de compuestos que se mantienen bastante estables durante los procesos de envejecimiento, en el Cuadro III se observa que para las muestras de búnker se utilizaron compuestos poco volátiles como HAP y los HAP alquilados, especialmente los C1 a C4 (naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y la serie de los crisenos). Los HAP alquilados son una base muy importante en la caracterización química e identificación en los derrames de petróleo (Wang, 1999; Wang & Fingas, 2003) y biomarcadores: terpenos y esteranos principalmente (Wang, 1999; Wang & Fingas, 2003). Esto porque a diferencia del petróleo, la composición del búnker contiene menos compuestos volátiles y es rico en hidrocarburos poliaromáticos, asfaltenos y oleofinas aromáticas (ASTM International, 2015).

Entre los criterios que se utilizan para realizar la selección de las relaciones de diagnóstico se citan (Daling et al., 2002) especificidad, diversidad, resistencia a los procesos de envejecimiento y se utilizan relaciones entre compuestos con una misma relación carga masa. Entre los biomarcadores más utilizados que se han identificado y se usan en la caracterización del petróleo y sus derivados, se incluyen los terpenos (ion 191), hopanos (ion 205), esteranos (ion 217/218), metil esteranos (ion 217/231) y los diaesterano (ion 217/259), estos biomarcadores son usados debido a su especificidad, diversidad y resistencia a la biodegradación y los procesos de envejecimiento (Comité Europeo de Normalización, 2009) (Wang, 1999), casi todos estos biomarcadores pudieron ser identificados y utilizados para calcular relaciones de diagnóstico en el búnker, a excepción del hopano (ion 205) y los diaesteranos (ion 259)

Los biomarcadores son históricamente empleados en la geoquímica del petróleo en la caracterización en términos de fuente, familia genética, migración y propiedades de maduración. El análisis químico de las características de la fuente y persistencia ambiental de los biomarcadores brinda información de relevancia en la determinación de la fuente de un derrame de petróleo, diferenciación entre petróleo, monitoreo del proceso de degradación y estado del proceso de envejecimiento (Wang & Fingas, 2003), muchos de estos compuestos se mantienen en la fracciones más pesadas, y es por esto que la norma europea se pudo utilizar para discriminar diferentes fuentes de búnker, esta norma muestra referencias de cromatogramas de estudios realizados con diversos tipos de petróleo, y se indican las relaciones de diagnóstico más importantes con las que se debe de trabajar. Al analizar las muestras de búnker con la metodología basada en la norma se obtuvo como resultado principal que muchos de los cromatogramas presentaban semejanzas a los obtenidos con petróleo, lo que facilitó la identificación de las señales cromatográficas y grupos de las mismas.

Cuadro III. Relaciones de diagnóstico a calcular en la comparación de la huella digital del búnker (los números corresponden a los números asignados a cada señal de integración).

Relación de diagnóstico	Compuestos	Grupo	Ion
Biomarcadores			
57/59	C 20-esterano triaromático/ C 21-esterano triaromático	Esterano	231
59/24	C 21-esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
22/24	C 26, 20 S- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
27/24	C 28, 20 S- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
29/24	C 27, 20R-esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
32/24	C 28, 20 R- esterano triaromático/ C 26, 20R +C27, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
59/32	C 21- esterano triaromático/ C 28, 20 R- esterano triaromático	Esterano	231
22/27	C 26-esterano triaromático/C 28, 20 S- esterano triaromático	Esterano	231
29/32	C 27, 20 R- esterano triaromático/ C 28, 20 R- esterano triaromático	Esterano	231
19/18	13 β (H), 17 α (H), 20R - colestano/ 13 β (H), 17 α (H), 20S - colestano	Esterano	217
65/67	24-etil-5 α (H), 14 α (H), 17 α , 20S- colestano/24-etil-5 α (H), 14 α (H), 17 α , 20R- colestano	Esterano	217
38/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
41/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
43/42	C15H28-sesquiterpeno/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
44/42	C16H30-8b(H)-homodrimane/ C15H28-8b(H)-drimane	Sesquiterpenos	123
25/ (65+67)	24-etil-5 α (H), 14 β (H), 17 β , 20R- colestano/ (24-etil- 5 α (H), 14 α (H), 17 α , 20S- colestano + 24-etil-5 α (H), 14 α (H), 17 α , 20R- colestano)	Esterano	218-217
20/25	5 α (H), 14 β (H), 17 β (H), 20R-colestano/ 24-etil-5 α (H), 14 β (H), 17 β , 20R- colestano	Esterano	218
Hidrocarburos poliaromáticos			
7/8	2-metilfenantreno/1-metilfenantreno	Fenantreno	192
47/8	Metil antraceno/1-metilfenantreno	Fenantreno/Antraceno	192
5/6	4-metildibenzotiofeno/1-metildibenzotiofeno	Dibenzotiofeno	198
48/50	C2 Dibenzotiofenos/ C2 Fenantrenos antracenos	Dibenzotiofeno/ Fenantreno antraceno	212-206
51/52	C3 Dibenzotiofenos/ C3 Fenantrenos antracenos	Dibenzotiofeno/ Fenantreno antraceno	226-220
11/53	Reteno/C4 Fenantrenos	Reteno/ Fenantreno	234
11/16	Reteno/ Metil fenantreno	Reteno/ Fenantreno	234
17/16	Benzonaftotiofeno/ Tetrametil fenantreno	Benzotiofeno Fenantreno	234
9/14	Metilfluoranteno/4-metilpireno	Flouranteno/Pireno	216
10/14	Benzofluoreno/4-metilpireno	Fluoreno/Pireno	216
13/14	2-metilpireno/ 4-metilpireno	Pireno	216
15/14	1-metilpireno/ 4-metilpireno	Pireno	216
54/49	C23 terpeno tricíclico /C2-fenantreno/antraceno	Terpeno/ Fenantreno Antraceno	191-192

Se realizó como parte de la implementación del método un análisis de incógnitas. Se partió de dos tipos de bunker y se prepararon “derrames” en el laboratorio. Se le dio el tratamiento adecuado a cada una de las muestras identificadas con las letras de la A a la F y posteriormente se inyectó en el CG-MS utilizando el método adaptado y validado. Como ya se mencionó el análisis de los datos se llevó a cabo basándose en lo estipulado en la norma CEN/TR 15522-2. El cuadro IV resume las áreas obtenidas para la muestra B para calcular las relaciones de diagnóstico descritas anteriormente.

Cuadro IV. Áreas obtenidas para la muestra identificada como B.

Ion	Referencia	Grupo	Área
212	48	C2 Dibenzotiofenos	7764484
226	51	C3 Dibenzotiofenos	10414296
206	50	C2 Fenantrenos antracenos	27895187
220	52	C3 Fenantrenos antracenos	34247737
230	56	C2 Fluorenos pirenos	53421955
242	60	C1 crisenos	37272553
	7	2MP	8209245
192	47	MA	1043343
	8	1MP	5350760
	49	Pico más alto	6846837
198	5	4-MDBT	1257321
	6	1-MDBT	440904
	1	C17	2207937
85	2	Pristano	801250
	3	C18	2262539
	4	Fitano	1178449
192	53	C4 Fenantrenos	25114782
234	11	Reteno	1660857
	16	Tetrametil fenantreno	4724523
	17	BNT	3113036
	9	2-MFL	969307
	10	BaF	2356351
216	12	Benzofluoreno	3703400
	13	2-MPy	3703400
	14	4-Mpy	13994281
	15	1-MPy	13994281
	38	Ses 1	229610
	41	Ses 2	142710
123	42	Ses 3	251697
	43	Ses 4	232307
	44	Ses 8	345887
	20	27 bbR + 27bbS	226321
218	63	28 bbS + 28 bbR	258287
	25	29 bbS + 29 bbR	230362
	57	C20 TA	1455890
	59	C21TA	1444309
	22	SC 26 TA	154967
231	24	RC26 TA + SC27 TA	419079
	27	SC28 TA	560635
	29	RC27 TA	287050
	32	RC28 TA	460687

Se realizó una comparación visual de cada uno de los cromatogramas y luego se calcularon las relaciones de diagnóstico, las variaciones entre réplicas y la comparación entre muestras ciegas, esto permitió identificar las seis muestras. Como resultado se obtuvo que las muestras identificadas como A, B y E corresponden a una misma fuente de bunker y que las muestras identificadas como C, D y F proceden de un mismo bunker. Con esto se demuestra que el método cumple con el uso previsto y que su utilización es adecuada para la obtención de la huella digital en muestras de bunker. Como

ejemplo se muestran los resultados obtenidos para la muestra ciega B y su comparación con E, que demostraron ser de la misma fuente.

Las relaciones de diagnóstico se calculan según la siguiente ecuación 2

$$\frac{\text{Área señal 1}}{\text{Área señal 2}} = \text{Relación de diagnóstico} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Por ejemplo:

$$\frac{\text{Área señal\# 5}}{\text{Área señal \# 6}} = \frac{1257321}{440904} = 2,9 = \text{Relación de diagnóstico}$$

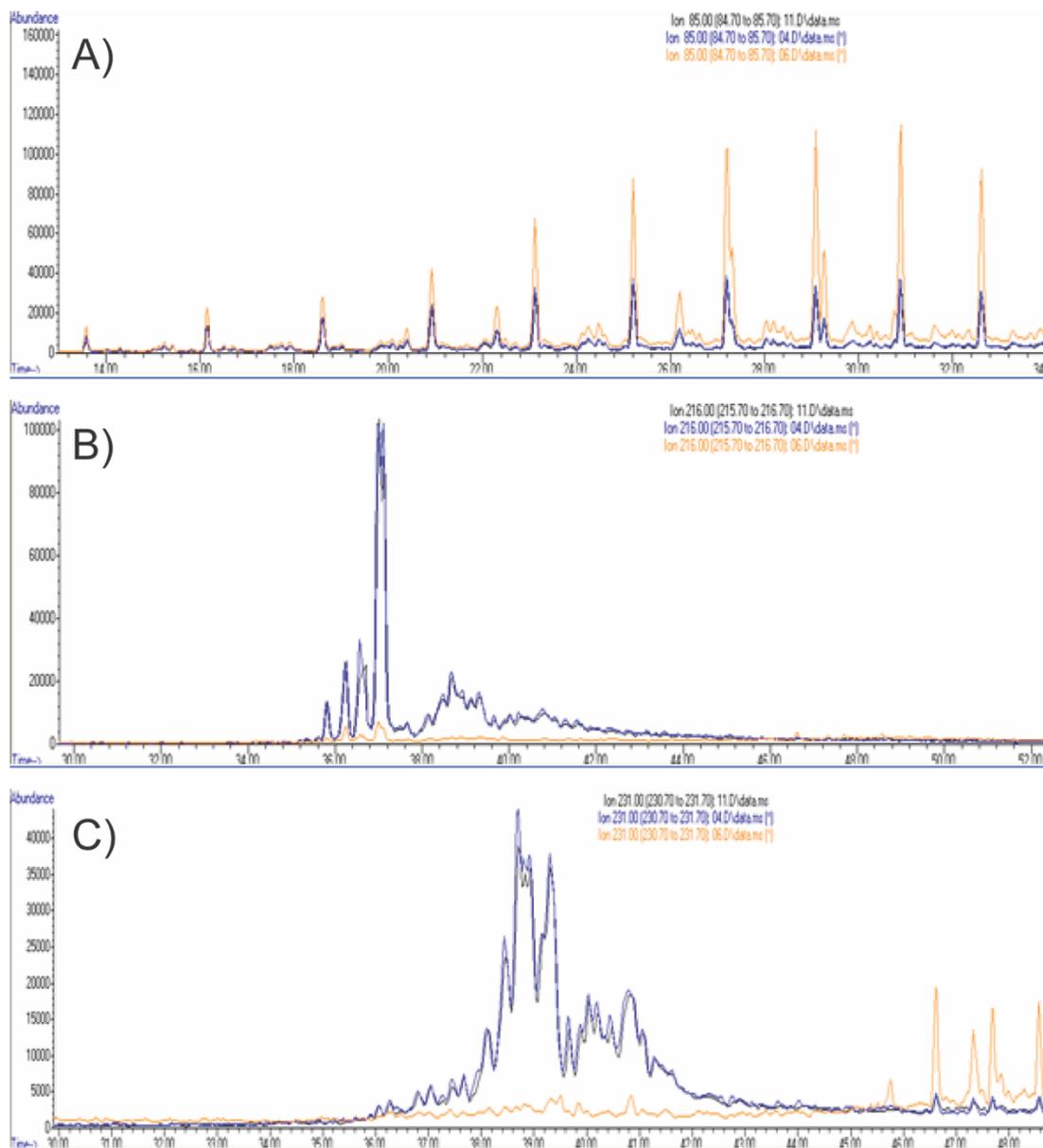


Figura 1. Cromatograma de iones superpuestos para las muestras identificadas como B (Azul), C (Naranja) y E (Negro) para los iones 85.00, 216.00, y 231.00.

De esta misma manera se calculó cada una de las siguientes relaciones de diagnóstico para una réplica específica independiente para la muestra identificada como B y los coeficientes de variación de los duplicados independientes para la muestra B, estos resultados se muestran en el Cuadro V, se puede observar que las relaciones utilizadas corresponden a compuestos marcadores obtenidos, estables en el tiempo, que permitieron diferenciar las diferentes muestras preparadas en el laboratorio además se observa que se cumple el criterio de obtener coeficientes de variación menores a 5 %, con estos resultados se demostró que el efecto ocasionado por la repetibilidad del método no es significativo en los resultados finales.

Cuadro V. Relaciones de diagnóstico y coeficientes de variación obtenidos para la muestra ciega B.

Relación de diagnóstico					
Relación	Valor	CV	Relación	Valor	CV
1/2	2.8	3.0	29/24	0.7	1.0
3/4	1.9	2.7	32/24	1.1	1.9
2/4	0.7	1.1	38/42	0.9	0.5
5/6	2.9	2.8	41/42	0.6	2.7
7/8	1.5	2.1	43/42	0.9	3.2
9/14	0.1	0.0	44/42	1.4	3.4
10/14	0.2	1.6	47/8	0.2	1.7
12/14	0.3	0.9	48/50	0.3	2.9
13/14	0.3	0.9	51/52	0.3	0.3
15/14	1.0	0.0	57/59	1.0	2.0
11/16	0.4	1.5	59/24	3.4	3.5
17/16	0.7	0.3	11/53	0.1	3.3
20/25	1.0	4.0	59/32	3.1	1.7
22/24	0.4	4.4	22/27	0.3	2.0
27/24	1.3	2.4	29/32	0.6	0.9

Para calcular el coeficiente de variación se utilizó la siguiente ecuación.

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio de los datos}} * 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Este mismo cálculo se realizó para las muestras A, B, C, D, E y F. Una vez obtenidas todas las relaciones de diagnóstico para cada señal, se procedió a calcular los coeficientes de variación entre cada relación obtenida entre cada par de muestras es decir se comparó la variación de A-B, A-C, A-D, A-E, A-F, luego B-C, B-D, B-E, B-F y así sucesivamente para probar el porcentaje de aciertos al relacionar las fuentes de búnker similares y separar las que no corresponden al mismo origen. Para poder demostrar que dos muestras tienen un mismo origen todas sus comparaciones deben tener valores de CV iguales o menores al 14 % según se establece en la norma europea.

Este valor (14 %) se justifica debido a que se trabaja con muestras que están en contacto con diversos compartimentos ambientales, como sedimentos, agua de mar, agua de río, tanques de almacenamiento, entre otros y no con un coctel de alcanos como en las pruebas de validación, en estas muestras se espera que los procesos de envejecimiento tomen mayor importancia por lo que se permite una variación mayor. Además, al trabajar con muestras que semejan las circunstancias del medio natural, se espera que la variación entre muestras sea mayor a lo que fue con los alcanos,

producto de la gran variabilidad de la composición de las mismas, esta gran variabilidad es la que adiciona un paso previo de purificación.

Como ejemplo, en el Cuadro VI se muestra la comparación de las relaciones de diagnóstico de las muestras identificadas como B y E que pertenecen a una misma fuente. Se lograron identificar adecuadamente todas las muestras preparadas, 100% de aciertos en distinguir las fuentes por similitud o diferencia.

Cuadro VI. Datos del cálculo del coeficiente de variación al comprar la muestra B con la muestra E.

Relación de diagnóstico	CV	Relación de diagnóstico	CV
1/2	1.4	38/42	7.7
3/4	12.9	41/42	8.4
2/4	3.4	43/42	5.4
5/6	5.6	44/42	0.4
7/8	9.1	47/8	1.5
9/14	0.7	48/50	0.2
10/14	3.0	51/52	0.3
12/14	2.8	57/59	1.5
13/14	2.8	59/24	3.0
15/14	0.0	11/53	6.6
11/16	11.1	59/32	0.3
17/16	2.7	22/27	11.0
22/24	3.3	29/32	8.4
27/24	7.7		
29/24	11.8		
32/24	3.3		

A partir de los datos anteriores se obtiene que ambas muestras corresponden a la misma, esto motivado por el hecho de que al comparar las relaciones de diagnóstico se obtienen coeficientes de variación inferiores al 14 %. Estos mismos cálculos se efectuaron al utilizar una hoja de cálculo diseñada para una manipulación más sencilla de los datos, obteniendo los mismos resultados. Por lo tanto, se valida así dicha hoja de cálculo y cumple con su uso.

Se logró implementar el método de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en el Centro de Electroquímica y Energía Química de la Universidad de Costa Rica, se validaron los parámetros de linealidad, precisión y repetibilidad instrumental. Basado en los resultados se concluye que el método es adecuado según el uso previsto, por lo cual la optimización e implementación del mismo se llevaron a cabo con éxito. La modificación más importante a la metodología fue el cambio en la rampa final de temperatura en la separación cromatográfica, debido a limitaciones del equipo utilizado. Se logró optimizar esta rampa al obtener una buena separación de los picos de interés a tiempos de retención en los cuales no se podía aplicar el cambio de temperatura del método original.

Se probó el método implementado y validado al analizar muestras de bunker obtenidas de varias fuentes. Con los resultados obtenidos se concluye que el método cumple su función ya que se logró identificar con su utilización correctamente todas las muestras.

La metodología europea está desarrollada para productos de petróleo. Se demostró que esta metodología es muy versátil ya que su utilización con búnker da resultados correctos a la hora de la determinación de la huella digital.

IV. REFERENCIAS

- Albaigés, J. (2007). CONTAMINACIÓN POR VERTIDOS DE HIDROCARBUROS AL MEDIO MARINO. In *¿Qué aprendimos de la catástrofe del Prestige?* (pp. 183–199).
- ASTM International. (2015). *ASTM D396-15c: Standard Specification for Fuel Oils*. <https://doi.org/10.1520/D0396-12.2>
- Boehm, P. D., Douglas, G. S., Burns, W. a., Mankiewicz, P. J., Page, D. S., & Bence, a. E. (1997). Application of petroleum hydrocarbon chemical fingerprinting and allocation techniques after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 34(8), 599–613.
- Christensen, J. H., & Tomasi, G. (2007). Practical aspects of chemometrics for oil spill fingerprinting. *Journal of Chromatography. A*, 1169(1–2), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.077>
- Comité Europeo de Normalización. (2009). *Oil spill identification — Waterborne petroleum and petroleum products — Part 2: Analytical methodology and interpretation of results based on GC-FID and GC-MS low resolution analyses* (p. 136). Comité Europeo de Normalización.
- Daling, P. S., Faksness, L. G., Hansen, A. B., & Stout, S. A. (2002). Improved and standardized methodology for oil spill fingerprinting. *Environmental Forensics*, 3(3–4), 263–278. <https://doi.org/10.1080/713848389>
- González, J. J., Viñas, L., Franco, M. A., Fumega, J., Soriano, J. A., Grueiro, G., Muniategui, S., López-Mahía, P., Prada, D., Bayona, J. M., Alzaga, R., & Albaigés, J. (2006). Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 53(5–7), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.09.039>
- Prieto Díaz, V., & Martínez de Villa Pérez, A. (1999). LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS POR HIDROCARBUROS : *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 37(1), 13–20.
- Sandison, C. M., Alexander, R., & Kagi, R. I. (2003). The analysis of polar fractions from sediment extracts and crude oils using reaction-gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 34(10), 1373–1389. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(03\)00156-6](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(03)00156-6)
- Vargas Fallas, L. C., Prieto Díaz, V., & Martínez de Villa Pérez, A. (2009). Remediación del derrame de hidrocarburos en el caso Barreal-Belén, Costa Rica. *Tecnología En Marcha*, 22(4), 3–17.
- Wang, Z. (1999). Oil spill identification. *Journal of Chromatography A*, 843, 369–411. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00120-X)
- Wang, Z., & Fingas, M. F. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47(9–12), 423–452. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00215-7)

AGRADECIMIENTO

Se agradece al personal del Centro de Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica por el apoyo en la realización de este proyecto.