



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**Uso de la extracción en fase sólida para la
preparación de muestra en el análisis de
biomarcadores en sedimentos costeros**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

P R E S E N T A

José David Chávez Romo



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof.: M. en C. Santiago Capella Vizcaíno
Vocal	Prof.: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
Secretario	Prof.: M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
1er. Suplente	Prof.: M. en C. Georgina Artemisa Duarte
Lisci	
2º. Suplente	Prof.: M. en C. Erika Ramírez Maya

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica, Laboratorio 101 División de Estudios de Posgrado Edificio B Facultad de Química, UNAM.

Asesor

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

Sustentante

José David Chávez Romo

Quiero agradecer de forma muy atenta al M. en C. Santiago Capella Vizcaíno por haberme aceptado y dirigido en este proyecto para la realización de la tesis, al igual, agradezco a la Maestra Carmen Labastida por su enorme paciencia y a la Dra. Araceli Peña Álvarez por sus consejos y regaños que me sirvieron tanto, pero en especial les agradezco por permitirme formar parte del laboratorio 101.

A mis amigos del laboratorio: Alejandra, Andrea, Erika, Jorge, Lupita, Magali, Miguel, Rodrigo y Rocío por hacer más agradable mi estancia.

Gracias a mis amigos de las donas por todas las cosas para bien o para mal que hemos pasado: Arturo, Blanca, Brenda, Carla, Ceci, Fidel, Lucia, María, Maya, Mela, Mónica, Pablito, Paola, Paty, Raúl, Wendy, Zaragoza y a quien se me haya olvidado no por mala persona, si no por prisas.

Yahveh, gracias por darme a esta familia que me ha aceptado y apoyado en todos los momentos de mi vida.

Papá y mamá (Arturo y Petra) no sería posible escribir toda mi gratitud y amor hacia ustedes por todo lo que me han enseñado y dado, son ustedes junto con mis hermanos Pablo y Kennia el principal motor de mi vida y la razón por la cual siga en esto.
Gracias, los amo.

“Aunque camine por valle de tinieblas
ningún mal he de temer...”

Salmos 22 (23)

Índice

¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
1 INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
2 ANTECEDENTES	¡Error! Marcador no definido.
2.1 Propiedades físicas y fisicoquímicas del mar	¡Error! Marcador no definido.
2.1.1 Temperatura.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.2 Salinidad	¡Error! Marcador no definido.
2.1.3 Densidad	¡Error! Marcador no definido.
2.1.4 pH	¡Error! Marcador no definido.
2.1.4.1 El sistema de los carbonatos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.4.2 El sistema de los boratos	¡Error! Marcador no definido.
2.2 Composición química y <i>biomarcadores</i> en aguas y sedimentos marinos: una mezcla orgánica compleja.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1 Biomarcadores	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2 Hidrocarburos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2.1 Clases de hidrocarburos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2.2 Hidrocarburos saturados	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2.3 Hidrocarburos insaturados	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2.4 Hidrocarburos aromáticos.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3 Lípidos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.1 Clases de lípidos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.2 Lípidos complejos y ácidos grasos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3.3 Lípidos Simples	¡Error! Marcador no definido.
2.2.4 Carbohidratos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.5 Aminoácidos y proteínas	¡Error! Marcador no definido.
2.2.6 Otros compuestos	¡Error! Marcador no definido.
2.2.6.1 Aldehídos y cetonas.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.6.2 Alcoholes	¡Error! Marcador no definido.
2.3 Producción del petróleo en el medio marino	¡Error! Marcador no definido.
2.3.1 El petróleo	¡Error! Marcador no definido.
2.3.2 Una mezcla compleja.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.3 Diagénesis.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3.4 Catagénesis	¡Error! Marcador no definido.
2.3.5 Metagénesis	¡Error! Marcador no definido.
2.4 Análisis de <i>biomarcadores</i>	¡Error! Marcador no definido.
2.4.1 CG-EM: una técnica apropiada	¡Error! Marcador no definido.
2.4.1.1 Técnicas de preparación de muestra para CG	¡Error! Marcador no definido.
3 OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
3.1 OBJETIVO GENERAL	¡Error! Marcador no definido.
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	¡Error! Marcador no definido.
4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Toma y almacenamiento de muestra	¡Error! Marcador no definido.
4.2 Equipo, material y disolventes.....	¡Error! Marcador no definido.
4.3 Procedimientos para la preparación de muestra	¡Error! Marcador no definido.
4.3.1 Extracto lipídico	¡Error! Marcador no definido.
4.3.2 Análisis del Extracto lipídico total (ELT)	¡Error! Marcador no definido.

4.3.3	Análisis de la Fracción Saponificable y No saponificable (FSN)	;	Error! Marcador no definido.
4.3.4	Extracción en fase sólida (EFS)	;	Error! Marcador no definido.
4.4	Procedimiento para el análisis cromatográfico	;	Error! Marcador no definido.
4.4.1	Estándares	;	Error! Marcador no definido.
4.4.2	Muestras de sedimentos	;	Error! Marcador no definido.
4.5	Identificación	;	Error! Marcador no definido.
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	;	Error! Marcador no definido.
5.1	Eficacia en la separación de estándares por EFS con fase de sílice	;	Error! Marcador no definido.
5.2	Caracterización de las muestras de sedimentos	;	Error! Marcador no definido.
5.3	Resultados de las técnicas de preparación de muestra	;	Error! Marcador no definido.
5.3.1	Extracto lipídico total (ELT)	;	Error! Marcador no definido.
5.3.2	Fracciones Saponificable y No saponificable del extracto lipídico	;	Error! Marcador no definido.
5.3.3	Extracción en Fase Sólida (EFS)	;	Error! Marcador no definido.
5.4	Análisis de resultados por familias químicas para los procedimientos de preparación de muestra	;	Error! Marcador no definido.
5.4.1	Ácidos grasos	;	Error! Marcador no definido.
5.4.2	Hidrocarburos	;	Error! Marcador no definido.
5.4.3	Aldehídos, cetonas, alcoholes y esteroides	;	Error! Marcador no definido.
5.5	Interpretación de la composición química	;	Error! Marcador no definido.
5.5.1	Ácidos grasos	;	Error! Marcador no definido.
5.5.2	Hidrocarburos	;	Error! Marcador no definido.
5.5.3	Alcoholes	;	Error! Marcador no definido.
5.5.4	Aldehídos y cetonas	;	Error! Marcador no definido.
5.6	Compuestos resueltos por los procedimientos de preparación de muestra	;	Error! Marcador no definido.
6	CONCLUSIONES	;	Error! Marcador no definido.
8	BIBLIOGRAFÍA	;	Error! Marcador no definido.

Índice de figuras

Figura 1.	Temperaturas del océano	;	Error! Marcador no definido.
-----------	-------------------------	---	-------------------------------------

Figura 2. Composición porcentual de iones inorgánicos en agua de mar; **Error! Marcador no definido.**

Figura 3. Ciclo de los carbonatos; **Error! Marcador no definido.**

Figura 4. Diagrama logarítmico para los sistemas carbonato/borato; **Error! Marcador no definido.**

Figura 5. Clasificación general de hidrocarburos; **Error! Marcador no definido.**

Figura 6. Estructura general de los terpanos tetracíclicos; **Error! Marcador no definido.**

Figura 7. Estructura general de los hopanos; **Error! Marcador no definido.**

Figura 8. Estructura general de un esterano; **Error! Marcador no definido.**

Figura 9. Estructuras: a) Isopreno, b) Pirofosfato de isopentenilo; **Error! Marcador no definido.**

Figura 10. Construcción del colesterol; **Error! Marcador no definido.**

Figura 11. Ácido graso; **Error! Marcador no definido.**

Figura 12. Síntesis general de un triacilglicerol.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Estructura de un fosfolípido; **Error! Marcador no definido.**

Figura 14. Bicapa lipídica; **Error! Marcador no definido.**

Figura 15. Estructura de una ceramida; **Error! Marcador no definido.**

Figura 16. Ácido dehidrobiótico; **Error! Marcador no definido.**

Figura 17. β -Caroteno; **Error! Marcador no definido.**

Figura 18. a) Equinenona, b) Astaxantina.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Clorofila; **Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Esteroides.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 21. Diferentes tipos de esteroides.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 22. Proceso general de la fotosíntesis; **Error! Marcador no definido.**

Figura 23. D-Glucosa a) cadena abierta b) estructura cerrada; **Error! Marcador no definido.**

Figura 24. Unidad estructural de la celulosa; **Error! Marcador no definido.**

Figura 25. Polisacáridos a) Ácido alginico b) Quitina; **Error! Marcador no definido.**

Figura 26. Estructura general de un aminoácido; **Error! Marcador no definido.**

Figura 27. Formación de un enlace peptídico; **Error! Marcador no definido.**

Figura 28. Estructuras de compuestos carbonílicos.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 29. a) *Emiliania huxleyi*, productora de las alquenonas C_{37} (b) y C_{39} .; **Error! Marcador no definido.**

Figura 30. a) Pristano, b) Fitol, c) Fitano; **Error! Marcador no definido.**

Figura 31. Etapas de la formación del petróleo; **Error! Marcador no definido.**

Figura 32. Diagrama del sistema CG-EM; **Error! Marcador no definido.**

Figura 33. Estructura base de un cartucho de EFS; **Error! Marcador no definido.**

Figura 34. Distribuidor de vacío para cartuchos de EFS; **Error! Marcador no definido.**

Figura 35. Estrategias de fraccionamiento de muestras por EFS.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 36. Localización geográfica del Sisal Yucatán.; **Error! Marcador no definido.**

Figura 37. Lugar de la toma de muestra junto al UMDI; **Error! Marcador no definido.**

Figura 38. Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación y análisis realizado a las muestras de arena (MA) y darsena (MD).; **Error! Marcador no definido.**

Figura 40. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracto lipídico total (ELT) para la muestra de arena (MA).; **Error! Marcador no definido.**

Figura 41. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracto lipídico total (ELT) para la muestra de darsena (MD).; **Error! Marcador no definido.**

Figura 42. Cromatograma del análisis de sedimento por Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arena (MA) Fracción saponificable; **Error! Marcador no definido.**

Figura 43. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arena (MA) Fracción No saponificable.; **Error! Marcador no definido.**

- Figura 44. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arsénica (MD) Fracción saponificable; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 45. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arsénica (MD) Fracción No saponificable; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 46. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción A eluida con hexano; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 47. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arsénica (MD) Fracción A eluida con hexano; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 48. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción C eluida con tolueno/acetato de etilo (95:5); **Error! Marcador no definido.**
- Figura 49. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arsénica (MD) Fracción C eluida con tolueno/acetato de etilo (95:5); **Error! Marcador no definido.**
- Figura 50. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción D eluida con tolueno/acetato de etilo (3:1); **Error! Marcador no definido.**
- Figura 51. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arsénica (MD) Fracción D eluida con tolueno/acetato de etilo (3:1); **Error! Marcador no definido.**
- Figura 52. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción E eluida con acetato de etilo; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 53. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arsénica (MD) Fracción E eluida con acetato de etilo; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 54. Perfil de ácidos grasos para las muestras MA y MD por cada uno de los procedimientos; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 55. Perfil de hidrocarburos para las muestras MA y MD por cada uno de los procedimientos; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 56. Perfil de aldehídos, cetonas, alcoholes y esteroides para las muestras MA y MD por cada uno de los procedimientos; **Error! Marcador no definido.**
- Figura 57. Comparación del número de compuestos resueltos por los diferentes procedimientos de análisis.....; **Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un procedimiento para fraccionar el extracto orgánico obtenido de sedimentos costeros basado en la *extracción en fase sólida (EFS)* con columnas de sílice, utilizando como eluyente una serie de mezclas de disolventes de polaridad creciente. Los resultados se compararon con los obtenidos al analizar las muestras *sin fraccionar (ELT)* y separándola en las porciones *saponificable e insaponificable (FSN)*. En todos los casos, se formaron derivados silanizados para favorecer el comportamiento cromatográfico de los compuestos polares. Los resultados muestran que, si bien los dos procedimientos de referencia son relativamente más simples, el fraccionar la muestra en grupos de diferente polaridad permite mejoras sustanciales en manipulación, recuperación, identificación de analitos y principalmente en la claridad y resolución de los cromatogramas obtenidos de las muestras. Es por tal motivo que su uso en la determinación de *biomarcadores* en sedimentos proporciona mayores beneficios ante las otras técnicas (ELT y FSN). Además tiene las ventajas conocidas de reducción en tiempo y consumo de disolventes frente a los que utilizan la cromatografía en columna clásica.

1 INTRODUCCIÓN

Los equilibrios presentes en el planeta se regulan en gran parte debido a los océanos, pues regulan el clima evitando que sea extremo y proveen humedad al aire. En el mar se encuentran las principales reservas alimenticias del mundo. Los océanos cubren el 71% de la superficie del planeta y almacenan casi el 97% del agua total. Es difícil explicar todos los fenómenos que involucran al océano, sin embargo es de vital importancia su entendimiento para su adecuada explotación y preservación ante la contaminación global. El análisis de aguas y sedimentos nos permite conocer la composición química de este complejo ecosistema y con ello acercarnos a la comprensión de las relaciones y significados en el ciclo de la vida.

Debido a la gran cantidad de compuestos presentes en aguas y sedimentos marinos, su análisis resulta una ardua tarea, sin embargo, la cromatografía de gases es una muy importante técnica analítica que permite separar, identificar y cuantificar este tipo de muestras tan complejas. Como toda técnica de análisis, la cromatografía de gases tiene limitaciones que impiden el adecuado análisis para la mayoría de las muestras. Es por ello que el tratamiento de muestra previo al análisis cromatográfico juega un importante papel. Mientras más libres de interferencias estén las muestras, más fácil será el análisis de sus componentes.

Existen numerosas técnicas de preparación de muestra para CG registradas en la literatura. Entre ellas se encuentran: el uso de disolventes en extracciones sucesivas y la EFS. La extracción líquido-líquido aunque es simple normalmente requiere del uso y evaporación de volúmenes considerables de disolventes costosos y/o tóxicos y no es infrecuente que presente problemas de manipulación como la formación de emulsiones estables. En contraste, con la EFS se utilizan cantidades de disolventes muy reducidas y por ser un proceso cromatográfico no existe el riesgo de la formación de emulsiones y permite la obtención de fracciones múltiples.

El objetivo de este trabajo experimental fue el de evaluar el desempeño de la EFS en el análisis de sedimentos costeros y comparar los resultados con otras técnicas de preparación de muestra. A modo que la hipótesis sería la siguiente:

“La EFS permite separar el extracto lipídico de sedimentos costeros en fracciones más simples que facilitan el análisis cromatográfico sin un gasto excesivo de tiempo y costo”.

Los criterios de evaluación fueron el número de compuestos que es posible separar cromatográficamente con una resolución y detectabilidad adecuada para su caracterización por espectrometría de masas y por los tiempos de retención con detección por ionización de llama.

2 ANTECEDENTES

2.1 Propiedades físicas y fisicoquímicas del mar

El mar es una mezcla heterogénea con infinidad de componentes, con *propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas* vitales para **los diversos equilibrios que en él se efectúan**. Debido a la gran extensión de estas masas de agua y a los mecanismos físicos como corrientes marinas y mareas o a la posición geográfica de la región los valores de estas propiedades varían espacial y temporalmente. Esto no constituye un obstáculo para su estudio ya que el orden de magnitud de las variaciones es similar al valor promedio de estas propiedades.

2.1.1 Temperatura

En el océano la temperatura del agua depende de la *localización geográfica, latitud* (Figura 1. a), y de la profundidad (Figura 1. b).

En el ecuador se presentan las temperaturas más cálidas que pueden ser de hasta 32°C y va disminuyendo hacia los polos en donde pueden llegar a ser de -2°C , favoreciendo la formación de grandes depósitos de hielo. En la superficie generalmente la temperatura es similar a la temperatura ambiente, debido al calentamiento por los rayos solares y decrece hacia profundidades mayores hasta alcanzar un valor constante de -2°C ¹.

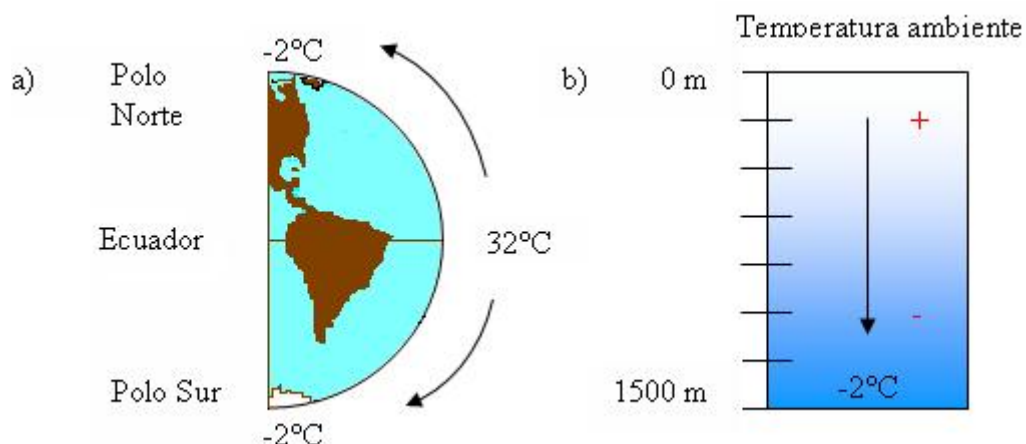


Figura 1. Temperaturas del océano: a) en función de la latitud, b) en función de la profundidad. La disminución del gradiente de temperatura se señala con flechas.

2.1.2 Salinidad

Se entiende por salinidad la concentración de sales iónicas totales disueltas expresada en gramos por kilogramo de agua de mar. La ecuación que nos permite calcular esta propiedad es la siguiente:

$$S = \frac{\text{g de iones inorgánicos disueltos}}{1 \text{ kg de agua de mar}}$$

Donde se obtiene como resultado la salinidad. El origen de la salinidad en el agua oceánica se debe principalmente a la disolución en la hidrosfera primitiva de materiales inorgánicos que formaron a la primera corteza terrestre. La salinidad puede variar por diversas razones, los cambios físicos como la eliminación de agua por evaporación o por congelación pueden provocar un aumento en la salinidad y la adición de agua dulce por ríos o por precipitación y la sedimentación de compuestos inorgánicos provocan una disminución de la salinidad. Además está la adición de sales provenientes los continentes, que arrastran los ríos. En conjunto todos estos fenómenos permiten mantener en estado estacionario las concentraciones por lo que las principales sales disueltas están siempre en proporciones constantes. La composición química inorgánica del agua de mar se representa en la Figura 2 ¹.

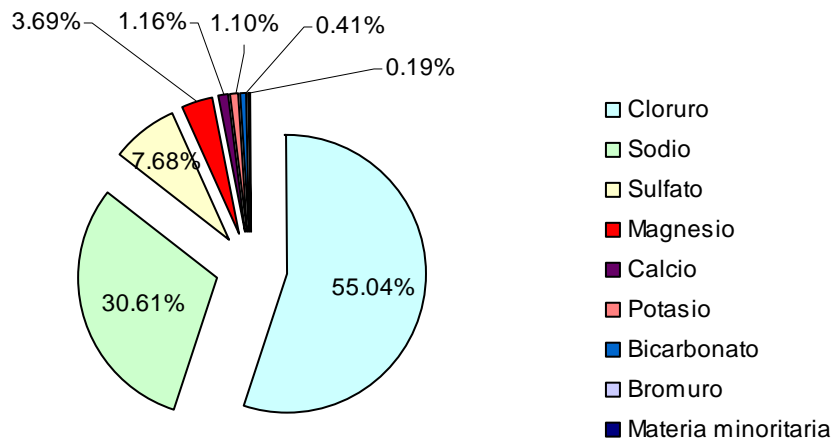


Figura 2. Composición porcentual de iones inorgánicos en agua de mar

2.1.3 Densidad

La densidad del agua de mar es una propiedad difícil de determinar, la profundidad, la temperatura y la salinidad son algunos de los factores que inciden sobre su valor, por lo que varía para diferentes puntos específicos en comparación con otro. La densidad es función directa de la profundidad y de la salinidad, pero es inversamente proporcional con respecto a la temperatura. Esto quiere decir que las aguas más salinas, frías y profundas

tienen una densidad mayor. Se estima que el valor promedio para la densidad del agua oceánica es de $1.03 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$.

Una forma de obtener una *densidad absoluta*, que puede emplearse para el agua de mar, consiste en utilizar la densidad específica. Este término se entiende como la relación existente entre el peso de un volumen determinado de agua a la temperatura en que se encuentra esa muestra y el peso del mismo volumen a una temperatura de 4°C. Como resultado se obtiene un número adimensional ¹.

2.1.4 pH

El pH del mar es una propiedad de importancia vital en todos los organismos; incide en la dirección de múltiples vías metabólicas o de procesos biogeoquímicos en el medioambiente acuático. Se estima que su valor (promedio) es de 8.1 ± 0.1 ², sin embargo cambia considerablemente por diversos factores como la temperatura, la presión e incluso la fotosíntesis.

Existen numerosas sustancias con propiedades ácido-base en el océano, sin embargo el valor ligeramente básico del mar se debe a dos agentes principales: el sistema de los carbonatos y el sistema de los boratos.

2.1.4.1 El sistema de los carbonatos

Cuando debido a su solubilidad el CO_2 se introduce en el mar, se presenta un sistema complejo que da origen a múltiples equilibrios acuáticos (Figura 3).

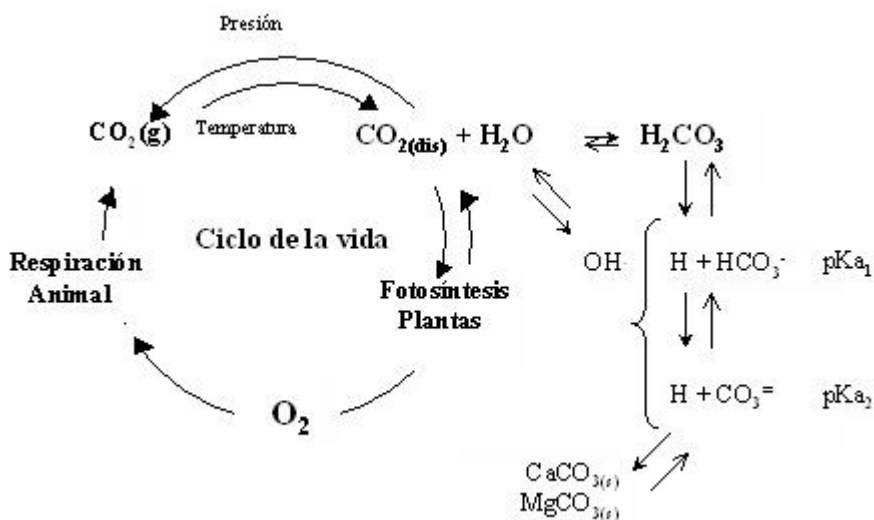
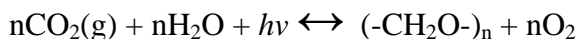


Figura 3. Ciclo de los carbonatos: ciclo de la vida e imposición del pH marino

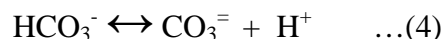
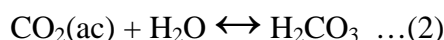
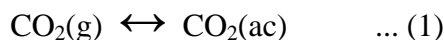
Una gran cantidad del CO₂ introducido se consume por organismos fotosintéticos como fitoplancton y algas para realizar la producción de carbohidratos, lo que se representa con la ecuación simplificada:



Que resulta en la captación y transformación de energía luminosa en energía química para la biosíntesis celular, permitiendo así el inicio del complicado ciclo de la vida.

Por otra parte, una parte del CO₂ disuelto encuentra una serie de reacciones (hidratación, ionización, hidrólisis, disociación y precipitación) que tienen como efecto el de imponer el pH del medio marino ³.

El sistema de los carbonatos (presentado de forma simplificada) presenta al inicio la disolución del CO₂ gaseoso para formar CO₂ acuoso el cuál puede hidratarse para formar ácido carbónico. Esta especie presenta disociaciones protónicas para formar al ión bicarbonato y carbonato, sucesivamente:



Al tomar en cuenta que los valores de las constantes de disociación dependen, como siempre, de las condiciones existentes en el medio (fuerza iónica y temperatura) podemos aproximar las constantes de los pares H₂CO₃/HCO₃⁻ y HCO₃⁻/CO₃⁼ a 10^{-6.35} y 10^{-10.15} respectivamente. Si además estimamos la concentración del ión HCO₃⁻ en 10^{-2.63} M, debido a que es su valor promedio en agua de mar, podemos obtener el gráfico de variación de especies en función del pH para este sistema ^{1,4} (Figura 4).

2.1.4.2 El sistema de los boratos

Aunque la concentración de boratos en el mar es baja, de aproximadamente 10^{-3.5} M, su influencia en la imposición del pH marino es similar a la de los carbonatos. El par BO₃H₃/BO₃H₂⁻ con una K_a de 10^{-8.6} tiene un diagrama logarítmico que se muestra en la Figura 4, en donde podemos notar que interviene de manera importante para mantener el pH en 8.1 debido a que está en su zona de amortiguamiento, donde su especie más concentrada es el BO₃H₃.

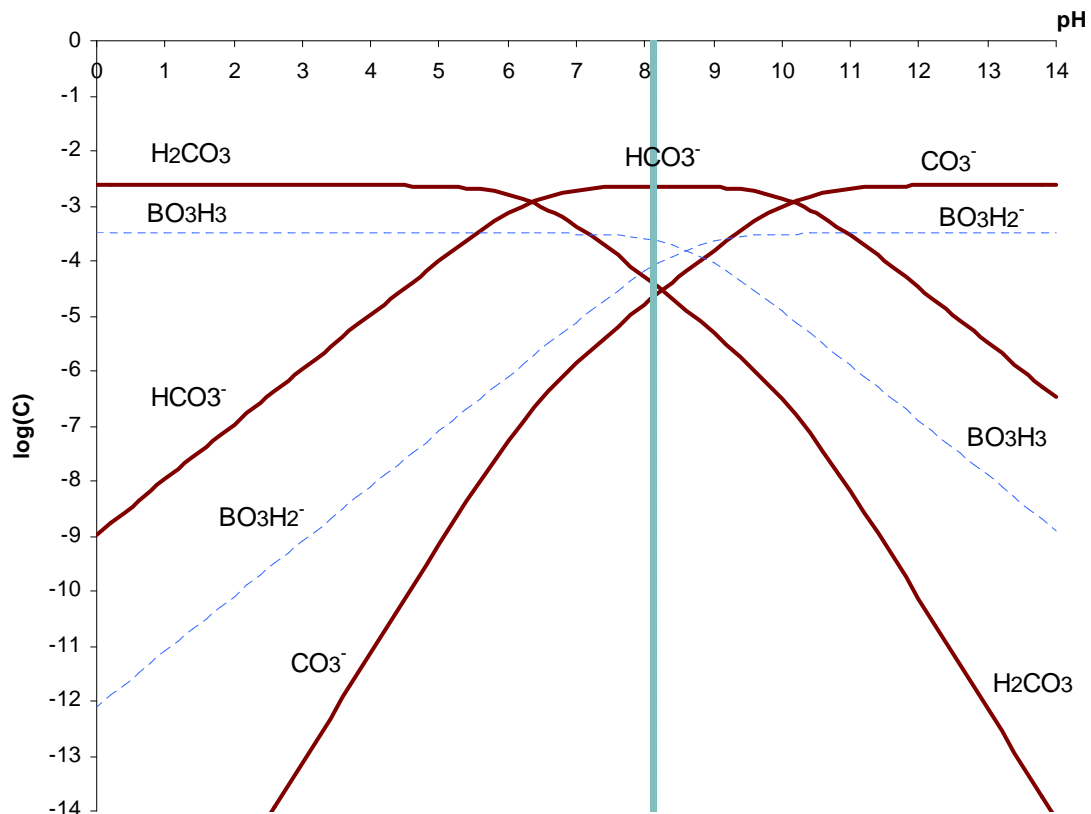


Figura 4. Diagrama logarítmico de variación de especies para los sistemas carbonato/borato

Por el diagrama anterior podemos observar que el establecimiento del pH de 8.1 se debe a la especie de mayor concentración HCO₃⁻ la cual está cien veces más concentrada que la especie CO₃⁼ ($10^{-2.6}$ contra $10^{-4.7}$ respectivamente). A estas dos especies se atribuye este valor básico para el agua de mar, debido en gran parte a que es el compuesto con propiedades ácido-base de mayor concentración en el mar¹.

2.2 Composición química y biomarcadores en aguas y sedimentos marinos: una mezcla orgánica compleja

El mar es un enorme contenedor de centenares de sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas y suspendidas las cuales intervienen en los equilibrios que en él se llevan a cabo y también en el ciclo de vida de los organismos que allí viven.

Por tradición (limitaciones analíticas y cuestiones prácticas), la materia orgánica se divide en dos categorías: Materia orgánica particulada (POM por sus siglas en inglés) y materia orgánica disuelta (DOM). La clasificación anterior se efectúa cuando se hace pasar una muestra de agua de mar a través de un filtro de fibra de vidrio con un tamaño de poro

de 0.4µm. La materia orgánica que se retiene (materia sólida suspendida y coloides) se llama POM^{3,5}.

La materia orgánica disuelta está extremadamente diluida y sólo una pequeña parte de ella se ha podido caracterizar (~20%). Carbohidratos, aminoácidos, hidrocarburos, alcoholes y otros compuestos de gran importancia bioquímica constituyen esta fracción. La materia orgánica particulada se compone principalmente de materia celular (viva y muerta) de fitoplancton, zooplancton y bacterias, además de productos de descomposición y secreciones de estos organismos^{2,3}.

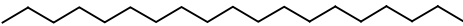
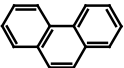
El origen principal de la materia orgánica en el mar se debe a los procesos fotosintéticos de varios microorganismos. La fijación de dióxido de carbono y su transformación en azúcares son el principio de los nutrientes que se utilizan por toda la cadena alimentaria para formar más y nuevos compuestos orgánicos que se producen en organismos superiores. La producción de nuevos compuestos por descomposición de animales y sustancias provenientes de ellos, aportan riqueza a la materia orgánica total. La entrada terrestre de materia orgánica debida a afluentes de ríos y vientos también es de gran importancia^{3,5}.

2.2.1 Biomarcadores

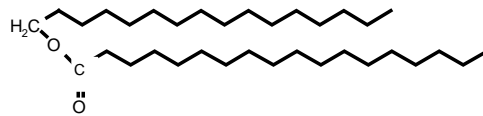
Desde hace un par de décadas, en el desarrollo de la investigación biogeoquímica se han empleado compuestos que sirven como huellas digitales de organismos individuales o de ciertos procesos medioambientales⁶. Estos compuestos llamados *biomarcadores* pueden hablarnos de la historia de una muestra: ambiente deposicional del lugar, edad geológica de sedimentos y rocas, fuente de la materia orgánica en mares e inclusive sobre el impacto ambiental que tiene un determinado ecosistema, así como el futuro de este^{2,6}.

Los *biomarcadores* (también llamados fósiles geoquímicos) comprenden familias muy diversas e incluyen desde estructuras muy simples, como las n-parafinas hasta compuestos muy complejos como esteranos, terpanos o porfirinas^{6,7} (Tabla 1).

Tabla 1. Clases de lípidos. Algunos ejemplos estructurales de *biomarcadores*

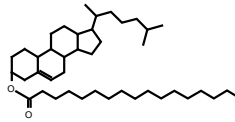
Clases de lípidos	Ejemplo	
	Estructura	Nombre
Hidrocarburos alifáticos		n-Nonadecano
Hidrocarburos policíclicos aromáticos		Fenantreno

Ésteres céricos



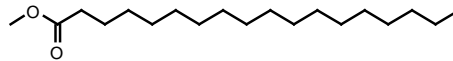
Palmitato de hexadecilo

Ésteres de esterol



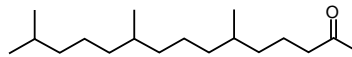
Palmitato de colesterolo

Ésteres de cadenas cortas



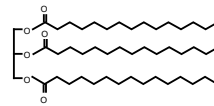
Palmitato de metilo

Cetonas



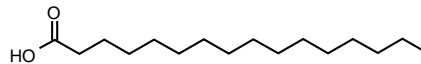
2,6,10-trimetil-pentadecan-2-ona

Triglicéridos



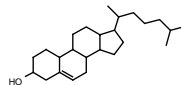
Tripalmitina

Ácidos grasos libres



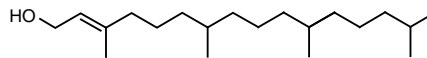
Ácido palmítico

Esteroles



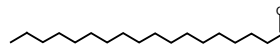
Colesterol

Alcoholes alifáticos libres



Fitol

Aldehídos



Octadecanal

La característica principal de los *biomarcadores* es que su estructura base se mantiene constante, cambia muy poco con los procesos químicos y bioquímicos de su ambiente ^{2,3,8}. La diagénesis, la degradación microbiana y otros factores promueven sólo ligeros cambios en la cadena carbonada central que pueden interpretarse y relacionarse con el origen y el ambiente en que estas moléculas se han encontrado ^{2,3}. En general los *biomarcadores* proceden de moléculas orgánicas de origen biogénico con menor estabilidad, y en algunos casos corresponden a moléculas íntegras de su fuente generadora ^{3,8}. Que los *biomarcadores* sean estables y que sus estructuras puedan ser relacionadas a las peculiaridades estructurales de las moléculas que les dieron origen, es lo que permite su amplia utilidad en el conocimiento de los ecosistemas, principalmente el marino ^{8,9,10}.

2.2.2 Hidrocarburos

2.2.2.1 Clases de hidrocarburos

Los hidrocarburos son una familia de compuestos formados exclusivamente con carbono e hidrógeno que pueden formar arreglos con diferentes grados de complejidad. La estructura base es un esqueleto con enlaces C-C, completando la molécula con enlaces C-H. Los enlaces C-C pueden ser sencillos, con un solo par de electrones involucrados, dobles (con cuatro electrones) o triples (con seis). Se pueden clasificar según el tipo de estructura en: alifáticos y aromáticos, además los primeros se subdividen en familias: por el tipo de instauración como alcanos, alquenos, alquinos y alifáticos cíclicos ¹¹ (Figura 5).

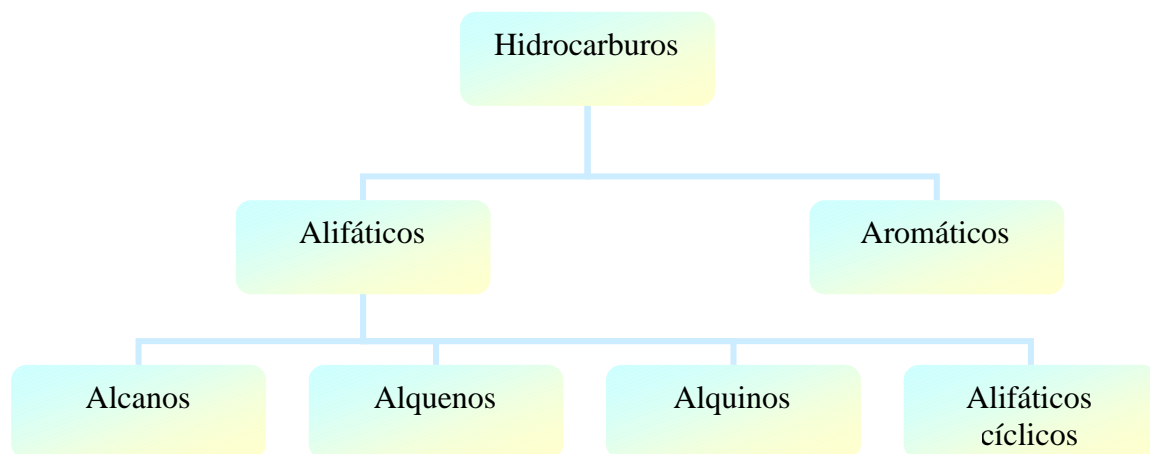


Figura 5. Clasificación general de hidrocarburos

Una clasificación más simple para fines prácticos en el estudio del medio marino, consiste en separar a los hidrocarburos en dos tipos: *saturados* e *insaturados*.

2.2.2.2 Hidrocarburos saturados

Se consideran como hidrocarburos saturados a aquellos compuestos constituidos sólo por átomos de carbono e hidrógeno, unidos entre sí únicamente con enlaces sencillos. Familias de estos compuestos pueden ser por ejemplo: alcanos, y hopanos ⁸.

2.2.2.2.1 Alcanos

Los alcanos, también llamados parafinas, tienen la fórmula general C_nH_{n+2} , cuentan con estructuras muy variadas porque pueden presentar ramificaciones a lo largo de la cadena principal. Poseen enlaces covalentes entre carbono y carbono, son sustancias no polares, dándoles así la característica solubilidad en compuestos de polaridad similar como benceno, cloroformo y éter, además de insolubilidad en agua. Los puntos de fusión y

ebullición son bajos para los primeros compuestos de la serie homóloga (Tabla 2) e incrementan notablemente estas propiedades, como toda serie homóloga, a medida que crece el número de carbonos en sus estructuras ¹¹.

Tabla 2. Características físicas de algunos alcanos

Nombre	Fórmula	P.f. (°C)	P.e. (°C)
Metano	CH ₄	-183	-162
Etano	CH ₃ CH ₃	-172	-88.5
Propano	CH ₃ CH ₂ CH ₃	-187	-42
n-Butano	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₃	-138	0
n-Pentano	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₃	-130	36
n-Hexano	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	-95	69
n-Decano	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH ₃	-30	174
n-Pentadecano	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CH ₃	10	266
n-Eicosano	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ CH ₃	36	-

El compuesto orgánico más simple es un alcano: metano. Es un gas producto de la descomposición bacteriana de restos de materia orgánica depositada en el fondo marino: la metanogénesis, que es un proceso natural por medio del cual se efectúa la descomposición de sustancias orgánicas en un ambiente anóxico y que lleva a la formación de metano por vías metabólicas ³. Su concentración en el océano esta limitada por su volatilidad más que por su solubilidad. La concentración del metano varía por los diferentes equilibrios presentes en el medio acuático, sin embargo, se sabe que la entrada de sustancias antropogénicas aumenta su concentración en las costas ^{8,10}.

Los hidrocarburos más abundantes en el mar son los n-alcanos, son producidos por diversas clases de organismos como bacterias, fitoplancton, zooplancton, algunos tipos de algas (verdes, rojas) y algunos organismos superiores tanto de origen terrestre como acuático. Los hidrocarburos de mayor concentración corresponden al n-pentadecano (C₁₅) y al n-heptadecano (C₁₇), así como los que se encuentran en el intervalo del C₁₃ a C₃₆. Puede atribuirse la presencia del C₁₅ y del C₁₇ principalmente al fitoplancton, pues presenta un predominio de cualquiera de los dos. Las algas rojas y verdes muestran una abundancia mayor de C₁₅, mientras que las algas marrones la tienen de C₁₇. Los hidrocarburos también son producidos por la fragmentación de biomoléculas mayores durante la catagénesis dando lugar a depósitos petrolíferos. Un ejemplo de estos es el pristano que es un producto de la descomposición del fitol ^{2,3,12}.

Los hidrocarburos pueden utilizarse como *biomarcadores* para la determinación del origen de la materia orgánica en el medio acuático marino. Se considera la distribución de los carbonos en sus estructuras, además de tomar en cuenta la cantidad de carbonos y la predominancia de números de carbonos pares sobre impares; a esto se le llama *distribución del número de carbonos y predominancia de número impar sobre par* de carbonos. Se sabe que, los hidrocarburos de más bajo peso molecular, en un intervalo entre C₁₅ a C₂₁, con una predominancia de cadenas impares (que corresponden a las cadenas C₁₅, C₁₇ y C₁₉) tienen un origen acuático (principalmente de algas) mientras que los hidrocarburos de alto peso

molecular, en el intervalo de C_{23} a C_{33} , y con una predominancia de estructuras con números de carbono impar, se les asigna a las plantas terrestres como origen ^{2,3,7,8}.

2.2.2.2 Hidrocarburos cíclicos saturados

De gran importancia son también los hidrocarburos cíclicos saturados, pues la mayoría de ellos se forman gracias a cambios estructurales de precursores que se encuentran en organismos vivos, formándose a través del proceso diagenético. Ejemplo de estos son los hopanos, esteranos y terpanos ^{2,3}.

2.2.2.2.1 Terpanos

El origen de los terpanos es microbiano, principalmente se producen a partir de bacterias y cianobacterias. Algunos de ellos se derivan de componentes de la membrana celular de procariontes o por la oxidación del bacteriohopanetetrol durante el proceso diagenético. Se clasifican en tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos, dependiendo de la cantidad de anillos en su estructura. Los terpanos tricíclicos cuentan con una base de entre diecinueve y cuarenta carbonos, los tetracíclicos (Figura 6) entre veinticuatro y veintiséis mientras que los pentacíclicos se subdividen en hopanos y moretanos, siendo la única diferencia la configuración isomérica de la estructura base ^{3,8}.

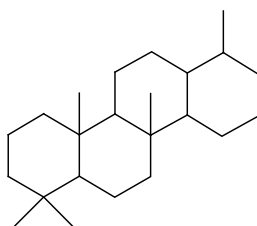


Figura 6. Estructura general de los terpanos tetracíclicos

El uso de los terpanos como *biomarcadores* permite determinar la fuente y madurez de petróleos crudos. También se aplican como indicadores de oxidadad de los sedimentos, como es el caso de los hopanos ^{7,8}.

2.2.2.2.2 Hopanos

Estos compuestos policíclicos tienen una estructura general representada en la Figura 7, en la cuál posee cuatro ciclos saturados de seis carbonos y uno de cinco, además de grupos alilo como sustituyentes. Se ha encontrado que su presencia mantiene una estrecha relación con la actividad bacteriana debido, entre otras cosas, a que esta subclase de compuestos está ampliamente distribuida en la pared celular de algas verde-azules ^{3,8}.

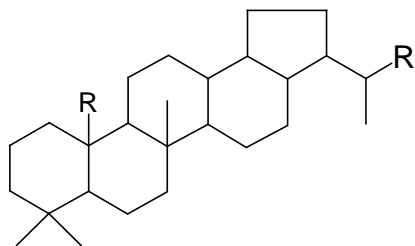


Figura 7. Estructura general de los hopanos. R y R' representan grupos alquilo.

Los hopanos han sido utilizados como *biomarcadores* para profundizar en los estudios de diagénesis y biodegradación de aceites crudos: sirven para determinar el ambiente deposicional (óxico/anóxico) y para la determinación de la madurez de las rocas fuente en la producción de petróleo durante la exploración de nuevos yacimientos ^{3,8}.

Los hopanos C₂₉ y C₃₀ son los terpanos dominantes en la mayoría de las muestras geológicas. La relación de concentraciones [C₂₉]/[C₃₀] es, por lo general, de aproximadamente 0.5. Cuando esta relación es mayor a la unidad, se tiene un ambiente predominantemente carbonatado. Por otra parte, altas concentraciones relativas de hopanos C₃₅ se asocia con carbonatos marinos, por lo que una relación [C₃₄]/[C₃₅] mayor que la unidad es característica de ambientes marinos carbonatados anóxicos ^{3,7}.

Una relación muy utilizada como parámetro térmico de madurez de un petróleo es la que considera que con el incremento de la madurez, la concentración de 17 α -(H)-22,29,30-trisnorhopano (Tm) disminuye mientras que la concentración relativa de 18 α -(H)-22,29,30-trisnorhopano (Ts) se incrementa, por lo cual la relación Tm/Ts empieza a decrecer a medida que aumenta la madurez ⁷.

2.2.2.2.3 Esteranos

No existen los esteranos como tales en sistemas vivos. Como se mencionó anteriormente, estos compuestos se crean a partir de otros ya existentes durante la diagénesis y la catagénesis, principalmente de esteroides de algas, con estructuras planas que tienen como función la de proporcionar rigidez a la membrana celular ^{3,7,8}. Los esteranos poseen tres anillos saturados con seis átomos de carbono y un anillo de cinco, además cuentan con una cadena lateral tal como se muestra en la Figura 8.

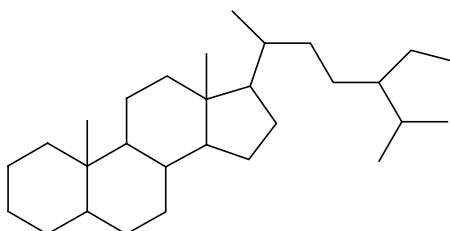


Figura 8. Estructura general de un esterano

Cuando los esteranos mantienen esencialmente el mismo esqueleto carbonado que sus precursores se les llamas *esteranos regulares*, estos comúnmente corresponden a estructuras de C₂₇, C₂₈, C₂₉ y C₃₀⁸.

En los procesos de diagénesis y catagénesis, los esteranos pueden sufrir cambios importantes en sus estructuras, esencialmente transposiciones metílicas en posiciones determinadas (posiciones 10 y 13 a 5 y 14). Esta clase de esteranos resultantes reciben el nombre de *esteranos transpuestos* o *diasteranos*^{7,8}.

Los esteranos sirven como biomarcadores que aportan una valiosa información paleoambiental en el análisis de aceites. Una predominancia de esteroides C₂₉ sugiere una contribución significativa de material orgánico terrestre en el ambiente deposicional, mientras que una predominancia de los C₂₇ indican un aporte importante de fitoplancton marino². Estos compuestos sirven también para determinar la madurez de petróleos: una de los más importantes indicadores de madurez, es la variación de la proporción existente entre dos formas epiméricas de esteranos como la 20R y 20S en la relación de concentraciones:

$$\frac{[20S]}{(20R + [20S])}$$

Donde se considera que el epímero 20R es producido biológicamente, mientras que el 20S es producido con el incremento en la madurez térmica. Este proceso de isomerización llega a su límite cuando la ecuación adquiere un valor de 0.55, por lo que una vez alcanzado este equilibrio ya no es posible registrar cambios en la madurez⁷.

2.2.2.3 Hidrocarburos insaturados

Estos compuestos se caracterizan por contar con estructuras con menos hidrógenos que el número máximo permitido, por lo cual se les llama insaturados. Presentan propiedades muy similares a los hidrocarburos saturados, sin embargo se diferencian en propiedades muy importantes como la reactividad química. Ejemplo de estas sustancias son los alquenos, alquenos cíclicos y ramificados así como los alquinos¹¹.

2.2.2.3.1 Alquenos

Los alquenos tienen como fórmula general C_nH_n también se les llaman oleofinas, son insolubles en agua pero bastante solubles en benceno, cloroformo y éter. Son poco polares, pero a diferencia de los saturados, algunos isómeros pueden presentar momentos dipolares netos. Sus densidades son menores a la del agua. Sus puntos de ebullición, como

toda serie homóloga, aumentan al aumentar el número de carbonos en la cadena principal, pero disminuye al haber ramificaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Características físicas de algunos alquenos

Nombre	Fórmula	P.f. (°C)	P.e. (°C)
Etileno	CH ₂ =CH ₂	-169	-102
Propileno	CH ₂ =CHCH ₃	-185	-48
1-Buteno	CH ₂ =CHCH ₂ CH ₃	-	-6.5
1-Penteno	CH ₂ =CH(CH ₂) ₂ CH ₃	-	30
1-Hexeno	CH ₂ =CH(CH ₂) ₃ CH ₃	-138	63.5
1-Deceno	CH ₂ =CH(CH ₂) ₇ CH ₃	-87	171
<i>cis</i> -2-Buteno	<i>cis</i> CH ₃ CH=CHCH ₃	-139	4
<i>trans</i> -2-Buteno	<i>trans</i> CH ₃ CH=CHCH ₃	-106	1
Isobutileno	CH ₂ =C(CH ₃) ₂	-141	-7

Una doble ligadura entre carbonos representa una fuente rica en electrones que es susceptible a ataques por diversas especies químicas, produciendo así nuevos compuestos con propiedades muy distintas. Esto explica que los hidrocarburos insaturados (en general) se encuentren en bajas concentraciones en sedimentos marinos, en comparación con los alcanos ¹¹.

El eteno (el más sencillo de los alquenos) es liberado por frutos maduros. Los aceites y ceras de plantas terrestres contienen hidrocarburos homólogos superiores, contando con cadenas hidrocarbonadas con un número de carbonos en un intervalo del C13 al C31. En el medio marino, son componentes de lípidos biológicos en mayores concentraciones que los hidrocarburos saturados. Estos compuestos han podido aislarse de zooplancton, fitoplancton, algas y bacterias. En fitoplancton se caracterizan estructuras de alquenos con números de carbonos impares, frecuentemente el *n*-heicosahexano (*n*-C_{20:6}) ^{2,3}.

2.2.2.3.2 Alquenos cíclicos y ramificados

El isopreno (Figura 1.3.2.E a) es uno de los bloques constructivos favoritos de la naturaleza pues muchos de los compuestos aislados de animales y plantas están constituidos por unidades de esta molécula. Se le llama *regla isoprénica* a esta composición regular de sus estructuras. Se sabe además que el origen de estas unidades isoprénicas es el pirofosfato de isopentenilo ^{2,3} (Figura 9).

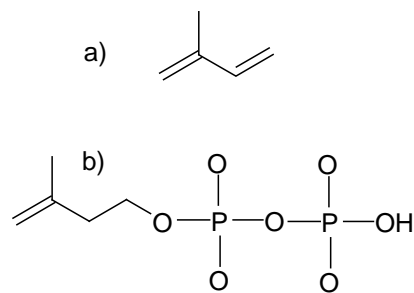


Figura 9. Estructuras: a) Isopreno, b) Pirofosfato de isopentenilo

2.2.2.3.2.1 Terpenos

Esta subclase de compuestos, que son responsables de los aromas de los llamados “*aceites esenciales*”, son un tipo de isoprenoides que están presentes de forma abundante en organismos vivos. Cuentan con estructuras abiertas o cíclicas que pueden subdividirse dependiendo del número de isoprenos (cinco carbonos) que las conforman: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40)^{2,3}.

Los terpenos pueden encontrarse en una gran variedad de organismos vivos. En las plantas terrestres, en aceites, ceras y resinas los terpenos se encuentran como monoterpenos. Los diterpenos son compuestos que pueden sintetizarse como cadenas laterales de moléculas como la *clorofila a*. Los triterpenos tienen funciones específicas como intermediarios para la formación de compuestos mayores: por ejemplo, se ha demostrado que muchos de los triterpenos cíclicos se pueden derivar *in vivo* de varios pliegues del *escualeno* (Figura 10), un triterpeno acíclico. También se sabe que compuestos tan diferentes como el colesterol, se construyen, paso a paso a partir de unidades isoprénicas^{11,13} (Figura 10).

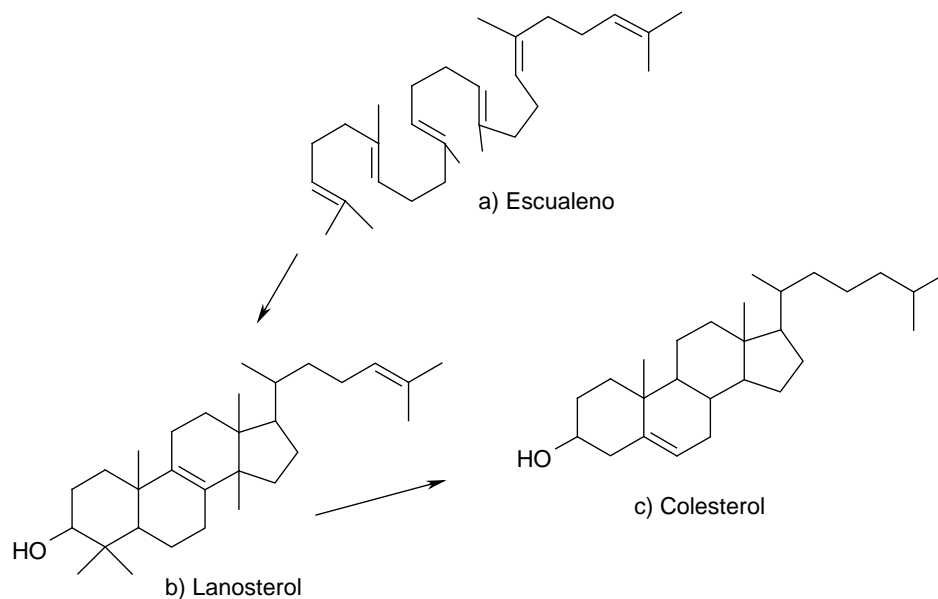


Figura 10. Construcción del colesterol (a) a partir del plegamiento del triterpeno acíclico escualeno (c).

Los hidrocarburos alquino no se encuentran en organismos vivos, salvo algunas extrañas excepciones en las que son sintetizados compuestos con triples ligaduras. Muy difícilmente pueden encontrarse compuestos de este tipo en el mar, muy posiblemente a su gran reactividad ³.

2.2.2.4 Hidrocarburos aromáticos

Estos hidrocarburos se encuentran a nivel traza en sedimentos marinos. No provienen directamente de organismos vivos, con la excepción de pequeñas cantidades atribuidas a algunas algas, bacterias y plantas. Estos compuestos se producen *in situ* durante procesos químicos en la diagénesis de posibles precursores como esteroides e isoprenoides. También se debe su presencia a la combustión de madera, contaminación petrolera y factores antropogénicos ^{2,3}.

2.2.3 Lípidos

2.2.3.1 Clases de lípidos

Los lípidos son un diverso grupo de sustancias ricas en carbono, todos de origen biológico, solubles en compuestos no polares e insolubles en agua. Son además utilizados en la célula como un almacén de energía. Una clasificación muy general para estos compuestos es el catalogarlos en complejos y simples ².

2.2.3.2 Lípidos complejos y ácidos grasos

Los lípidos complejos están compuestos por ácidos grasos. Se llama *ácidos grasos* a los ácidos carboxílicos de cadenas largas; estos compuestos se caracterizan por la presencia de un grupo carboxilo (COOH) terminal adherido principalmente a una cadena alifática (Fig. 11). La variedad en estructuras posibles para la cadena conjunta al grupo carboxilo (R-COOH) permite la existencia tanto de grupos alifáticos saturados como insaturados con uno o más dobles enlaces (poli-insaturados).

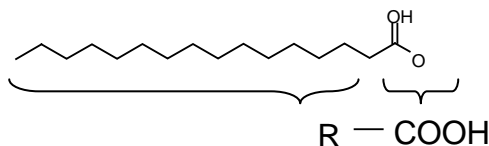


Figura 11. Ácido graso. El grupo carboxilo se une al alifático -R.

El punto de fusión de esta familia aumenta al aumentar el peso molecular y disminuye al existir insaturaciones. Es así que para una -R alifática de C₁₅ el punto de fusión es de 63.1 °C, mientras que para un insaturado con el mismo número de carbonos con una doble ligadura en la posición 9 es de -0.5°C. Hay que mencionar que los ácidos grasos insaturados provenientes de biosíntesis presentan, casi siempre, una configuración *cis*¹¹.

El tipo de lípido complejo biosintetizado por un organismo es una adaptación a la temperatura de su ambiente. Por ejemplo, un pez de las profundidades es más apto para tener lípidos de bajos pesos moleculares que los peces de la superficie. Los bajos puntos de congelación de los lípidos pequeños les impiden que se solidifiquen a las bajas temperaturas que se encuentran en el mar profundo³.

Los ácidos grasos más abundantes en la mayoría de los animales son los saturados, de cadena lineal y de una estructura con un número de carbonos pares: C₁₆ y C₁₈. En el medio acuático los más abundantes corresponden a los ácidos de cadenas lineales, con un número de carbonos pares y con una o más insaturaciones, principalmente los ácidos con C₁₆ y C₁₈. Los ácidos grasos de bajos pesos moleculares (<5) se producen por degradación microbiana, mientras que los que están en el intervalo de C₁₀ a C₂₂ provienen principalmente de plancton. Estos últimos además, poseen predominantemente estructuras con un número de carbonos pares y son poco ramificados. A los ácidos grasos en el intervalo de C₂₄ a C₄₆, con cadena lineal, con predominancia de números de carbonos pares y poco ramificados, se les atribuyen un origen terrestre^{2,3,10}.

Por lo anterior, podemos decir que los ácidos grasos, a pesar de que no son compuestos que los produzca un solo organismo si no que son sintetizados por todo ser vivo superior, pueden ayudarnos en su conjunto como marcadores para el origen de la materia orgánica en el medioambiente marino. Por ejemplo, la relación de las concentraciones de los ácidos 16:1/16:0 y la proporción de la suma de todos los ácidos con 16 carbonos entre la suma de todos los ácidos que contienen 18 carbonos ($\Sigma C_{16}/\Sigma C_{18}$) se utilizan como *biomarcadores* de diatomeas. Un valor mayor que 1.6 para la ecuación 16:1/16:0 señala la predominancia en la presencia de diatomeas^{6,14}.

Varios ácidos grasos como los 15:0, 17:0 y todos los ramificados, que se producen primariamente por bacterias aerobias y anaerobias, al sumarse se utilizan para estimar la contribución bacterial¹. Los ácidos de cadenas largas (>24 carbonos) se emplean para determinar la contribución de materia orgánica de plantas terrestres⁶.

2.2.3.2.1 Acilgliceroles

En la naturaleza, los ácidos grasos se encuentran principalmente como grasas en animales y como ceras o aceites en plantas. Los ácidos grasos que se hallan en cantidades mayoritarias son los correspondientes a las especies C₁₆ y C₁₈. Estos compuestos se presentan como una mezcla de ésteres de glicerol llamadas triacilgliceroles (o triglicéridos)

(con terminación general *acilgliceroles*) o grasas neutras. La reacción de síntesis se describe en la Figura 12.

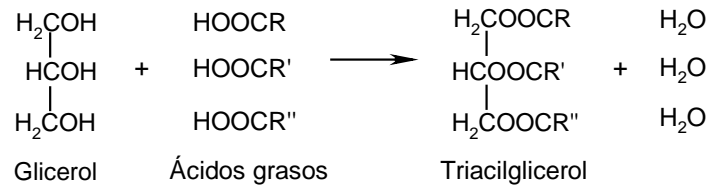


Figura 12. Síntesis general de un triacilglicerol.

Estos *acilgliceroles* sirven como moléculas almacenadoras de energía debido a que las grasas están menos oxidadas que los glucósidos o las proteínas, por lo que su rendimiento de energía en la oxidación sea representativamente mayor^{11,13}.

2.2.3.2.2 Fosfolípidos

Cuando a un triglicérido se le separa uno de sus ácidos grasos en la posición C³ del esqueleto carbonado central (glicerol) y se sustituye por un grupo organofosfato (PO₄⁻) da origen a una de las moléculas de mayor importancia para los organismos vivos: los fosfolípidos (Figura 13). Esta asociación de compuestos sirve de base para la construcción de una barrera que protege y controla la estabilidad de cualquier tipo de célula e inclusive de algunos organelos que la componen.

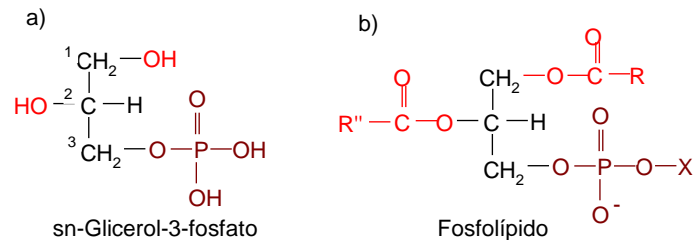


Figura 13. Estructura de un fosfolípido. a) Estructura base, b) estructura completa

La pared celular cuenta con millones de estos “*tabiques moleculares*” que preservan la integridad de la célula gracias a sus propiedades especiales. La diferencia de polaridades en sus estructuras permite que cuenten con “*colas*” anfifílicas apolares y “*cabezas*” fosforilo-polares que pueden en su conjunto, favorecer la formación de una bicapa lipídica característica (Fig. 14). Esta bicapa lipídica es impermeable para la mayoría de los compuestos que circundan a la célula, sin embargo regula la entrada de muchas otras que son imprescindibles para el buen funcionamiento de esta. La bicapa es fluida por, entre otras cosas, las interacciones entre cada fosfolípido debido a sus estructuras.

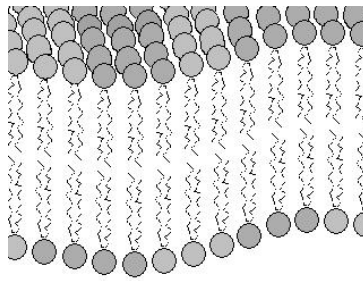


Figura 14. Bicapa lipídica.

Un fosfolípido se compone de un ácido carboxílico saturado en el C^1 , que principalmente corresponde a un C_{16} ó C_{18} y en el C^2 generalmente sostiene uno insaturado con una estructura C_{16} a C_{20} . El C^3 porta la cabeza polar que proviene de alcoholes polares ^{2,3,11}.

2.2.3.2.3 Esfingolípidos

Estos compuestos se presentan también en la membrana lipídica de las células, aunque en menor cantidad. Tienen la función de formar paredes celulares, sin embargo, muchos de sus derivados tienen tareas más específicas como la de recepción de hormonas o toxinas. Sus estructuras se derivan de los aminoalcoholes C_{18} (esfingosina y dihidroesfingosina), C_{16} , C_{17} , C_{19} y C_{20} . Cuando tienen un grupo N-acilo de un ácido graso forman ceramidas ^{13,14}.

Figura 15. Estructura de una ceramida

2.2.3.3 Lípidos Simples

Los compuestos que entran en este grupo se caracterizan por no contar en sus estructuras con moléculas de ácidos grasos. Estos se encuentran presentes en organismos vivos, en cantidades pequeñas pero cuantificables. Sus funciones específicas permiten encontrar relaciones estrechas con otros compuestos ya estudiados.

2.2.3.3.1 Terpenoides

Esta familia de compuestos se deriva de los terpenos, conservando la mayoría de sus propiedades físicas como su estructura, pues también están constituidos por unidades isoprénicas; la única diferencia sustancial radica en que los terpenos sólo están compuestos de carbono e hidrógeno, mientras que los terpenoides lo están además de heteroátomos como oxígeno (grupos oxidrilo, cetonas, aldehídos o ácidos) o nitrógeno (amidas, aminas). Los terpenoides se clasifican de forma semejante a los terpenos, por el número de isoprenos que lo conforman: monoterpénidos (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), triterpenoides (C_{30}), tetraterpenoides (C_{40}), etc. También pueden ser cíclicos o acíclicos³.

Los terpenoides son biosintetizados por plantas superiores y algunos animales. En el medio marino, se encuentran principalmente en algas y esponjas. Los diterpenoides son el principal componente de las resinas en las coníferas. Estas resinas se encuentran a menudo en estado fósil, que se conoce como ámbar. Además forman parte de los tejidos de soporte de plantas superiores. El ácido dehidroabiético (Fig. 16) es el diterpenoide tricíclico principal que puede separarse del sedimento marino^{13,15}.

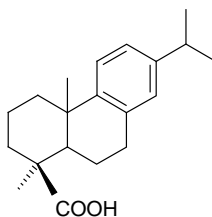


Figura 16. Ácido dehidroabiético

Los triterpenoides se encuentran en plantas como estructuras pentacíclicas con grupos funcionales unidos a las cadenas laterales. Estos son sintetizados biosintéticamente por la ciclación de la cadena del escualeno^{3,11,13}.

Los tetraterpenoides son pigmentos solubles en grasas. Conocidos como carotenoides, estos compuestos están constituidos típicamente de ocho unidades isoprénicas y son los agentes responsables de dar colores característicos a plantas y microorganismos. Su brillante color se debe al sistema conjugado de dobles ligaduras. Su función química se asocia con la fotosíntesis en plantas mayores y en microorganismos fotosintéticos. Estos son algunos de los compuestos llamados “*pigmentos accesorio*” que son útiles para rellenar los espectros de absorción de los complejos encargados de la fotosíntesis en diversos organismos vivos; por ejemplo, en los organismos fotosintéticos acuáticos, como las algas, responsables de la mitad de la fotosíntesis en el planeta, contienen ciertas clases de estos *pigmentos accesorio* para poder mejorar el proceso fotosintético pues, a través de la profundidad oceánica, el agua así como la materia suspendida, van absorbiendo las diferentes longitudes de onda de la luz solar provocando así, que los microorganismos autótrofos que utilizan la *clorofila a* pierdan eficiencia al captar la energía luminosa^{2,3,13}.

Los carotenoides se subdividen en dos clases: los carotenos y los xantófilos. Los carotenos son pigmentos hidrocarbonados mientras que los xantófilos son estructuras

cercanas que contienen además oxígeno. Esta clasificación se estableció por diferencia de solubilidades de los diferentes grupos^{2,3}.

El β -caroteno (Figura 17) tiene un color naranja el cual puede observarse en el tomate y la zanahoria, además de ser uno de los carotenos de mayor concentración en cloroplastos de plantas mayores y el principal de algas marinas. También pueden encontrarse carotenoides en bacterias no fotosintética, hongos y muchos otros organismos como esponjas de mar^{2,3,15}.

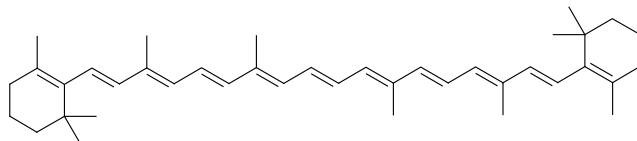


Figura 17. β -Caroteno

La fucoxantina (Figura 18 a) y la astaxantina (18 b) son ejemplos de xantófilos, las cuales pueden encontrarse en medios marinos. Los xantófilos son los terpenoides principales del zooplancton marino².

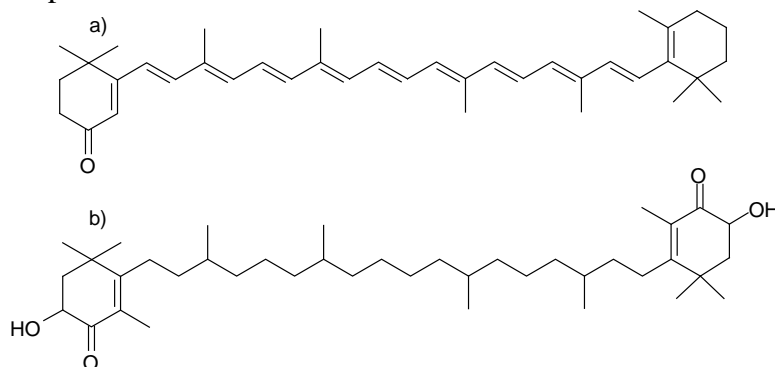


Figura 18. a) Equinenona, b) Astaxantina. Ambos compuestos xantófilos.

Además de estos compuestos, también existen otros pigmentos complejos orgánicos que pueden considerarse como lípidos simples, aunque realmente no lo son. Las clorofilas (Figura 19), compuestos tetrapirrólicos cíclicos, son los principales fotorreceptores de la fotosíntesis en plantas terrestres y algas acuáticas. La Figura 19 muestra la estructura de la *clorofila a* (*Chl a*) que básicamente cuenta con cuatro anillos (A-D) del macrociclo pirrolico, un anillo ciclopentanona conjugado al anillo C y una cadena lateral, ácido propiónico, en el C17 esterificado al fitol. El átomo de magnesio central está unido a los átomos de nitrógeno de los pirroles^{2,3}.

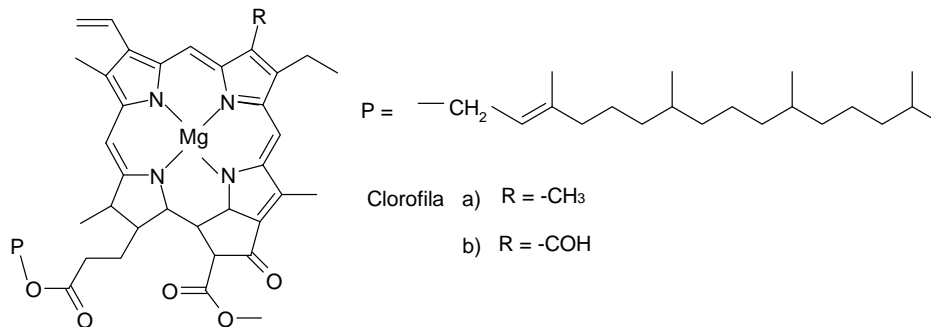


Figura 19. Clorofila. Los sustituyentes en R denotan a la clorofila A y B.

Estos complejos de característico color verde se derivan de la protoporfirina IX por medio de procesos bioquímicos.

Otras clorofilas difieren de acuerdo al estado de oxidación del macrociclo, el tipo de cadenas laterales y el tipo de alcohol esterificado, si presenta. Por ejemplo, el macrociclo puede ser una porfirina, con todos los anillos A-D insaturados (familia de *clorofilas c*), pueden tener diferentes insaturaciones (17,18-dihidroporfirina o 7,8,17,18-tetrahidroporfirina) con anillo D reducido (*clorofilas a, b y d*) con el anillo B y D reducidos (*bacterioclorofilas a, b y g*) o pueden presentar diferentes grupos funcionales (como las *clorofilas a y b*). Todas estas diferencias estructurales permiten establecer a las clorofilas como *biomarcadores* ¹⁶.

2.2.3.3.2 Esteroides

Esta clase de lípidos simples se caracteriza por contar con una estructura general de tres anillos alifáticos de seis carbonos y uno de cinco. Son de origen eucariótico principalmente, derivándose del ciclopentaperhidrofenantreno (Figura 20 a). Todos los esteroides cuentan con un arreglo policíclico con ramificaciones metílicas en los carbonos de posiciones 10 y 13, además de poseer una cadena carbonada variada en la posición 17 (Figura 20 b). Pueden contar con un total de carbonos entre 27 y 29 átomos. Todos estos compuestos se caracterizan por ser altamente solubles en agua y por tener estructuras rígidas planas ^{3,11,13}.

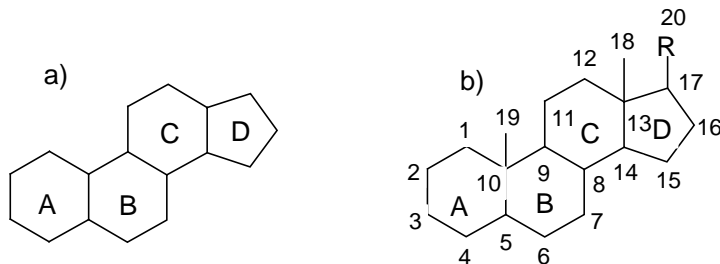


Figura 20. Esteroides a) ciclopentaperhidrofenantreno b) Estructura general de un esteroide.

Los esteroides se clasifican según el tipo de sustituyentes que poseen: esteroides, tienen un grupo alcohólico (OH); *estanoles*, que son esteroides saturados (alifáticos); *estenoles*, contienen grupos insaturados; *diestenoles*, contienen esteroides di-insaturados. Los *esteranos* (esteroides alifáticos saturados cíclicos) y las *estanonas* (que son esteroides que contienen grupos cetónicos) también son subclases de esteroides³.

De todos los esteroides el más abundante es el colesterol (Figura 21 a), que se encuentra como uno de los componentes de la membrana plasmática de animales.

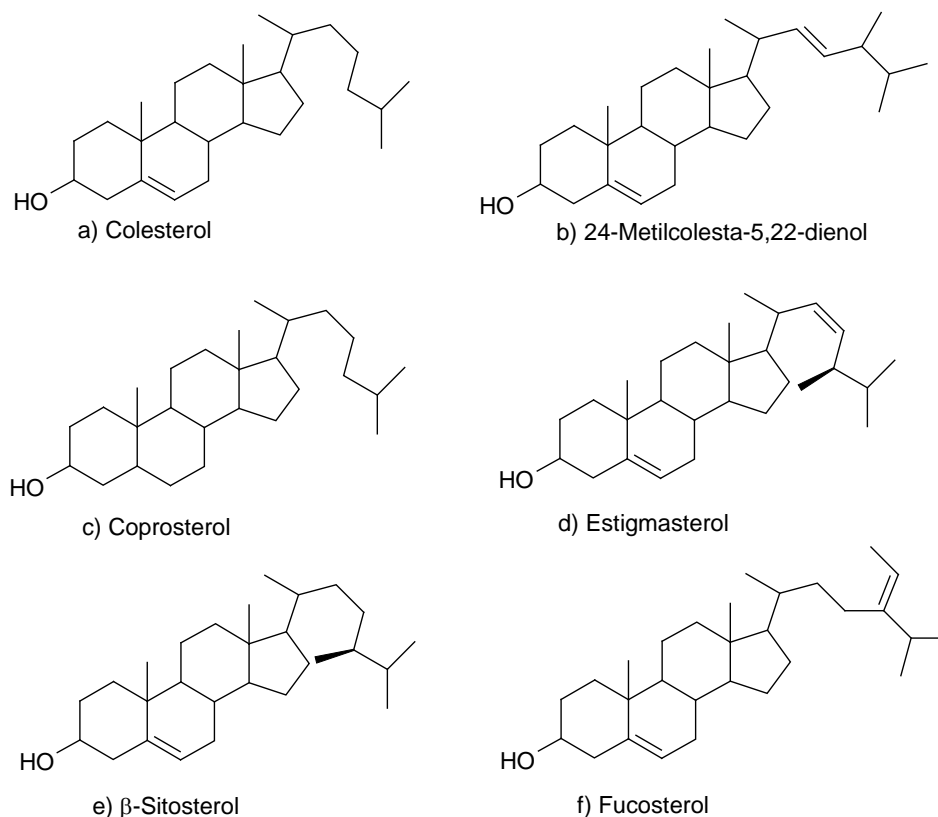


Figura 21. Diferentes tipos de esteroides.

Debido a sus propiedades estereoquímicas, tiene una gran influencia en las propiedades de la membrana celular. El grupo OH le confiere a la molécula una capacidad débilmente anfifílica, mientras que los anillos policíclicos le dan rigidez. Una de las principales funciones del colesterol en la membrana es la de otorgarle rigidez provocando así, que sea semi-permeable a agentes externos. Otra función del colesterol de gran importancia para los seres vivos es la de ser precursor de las hormonas esteroideas, que tienen el papel de “*reguladores metabólicos*” en un gran número de funciones fisiológicas^{2,11}.

Debido a la gran variedad y especificidad de los esteroides en diversos procesos bioquímicos, estos pueden emplearse como *biomarcadores* para un gran número de especies de microorganismos acuáticos. El *colesterol* es el *esterol* dominante en el

zooplancton, mientras que las diatomeas sintetizan el *24-Metilesterol* (Figura 21 b). El β -*Sitosterol* (Figura 21 e), es sintetizado por plantas de orden superior terrestres al igual que el *Estigmasterol* (Figura 21 d), ambos son constituyentes de las membranas vegetales. El *coprosterol*, que se encuentra en heces fecales y aguas de desecho, se utiliza como *biomarcador* en la determinación del impacto antropogénico en ríos, mares y sedimentos^{2,3}.

2.2.4 Carbohidratos

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos de mayor concentración en la naturaleza. Estos compuestos están constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, con una fórmula general $(C-OH)_n$ en la que $n \geq 3$. Las unidades básicas de los carbohidratos (monosacáridos o azúcares sencillos) pueden clasificarse dependiendo del número de carbonos que contiene en su estructura, pudiendo ser una triosa, tetrosa, pentosa o hexosa. También se clasifican por su naturaleza química, dependiendo del grupo carbonilo que contiene en su cadena: si es una cetona se les llama cetosa, si es un aldehído, aldosa. Las asociaciones de monosacáridos pueden recibir el nombre de oligosacáridos, si tienen de dos a seis unidades básicas, o bien, pueden llamarse polisacáridos si superan los seis monosacáridos^{11,13}.

Se sintetizan bioquímicamente a través del proceso de la fotosíntesis, siendo los productos finales (Figura 22).

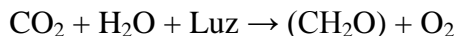
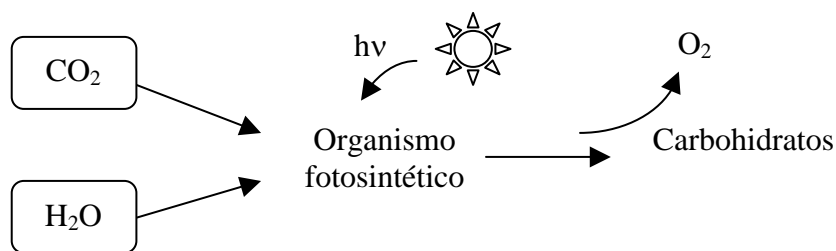


Figura 22. Proceso general de la fotosíntesis. Los productos finales son carbohidratos

Debido a que la energía luminosa utilizada para la síntesis de los carbohidratos es “almacenada” como energía química en los enlaces formados, estos compuestos se les consideran como la fuente central de energía para los organismos vivos. Todos los seres vivientes necesitan carbohidratos para realizar trabajos físicos o realizar funciones internas. La D-glucosa (Figura 23) es la única aldosa que aparece como monosacárido en la naturaleza, además de ser uno de los carbohidratos más abundantes también forma asociaciones con lípidos (glucolípidos) y proteínas (glucoproteínas). Los polisacáridos (también nombrados glucanos) pueden constituir de igual forma compuestos con proteínas llamados peptidoglucanos, complejos muy importantes que constituyen las paredes celulares bacterianas³.

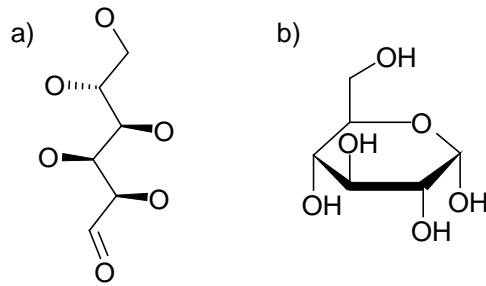


Figura 23. D-Glucosa a) cadena abierta b) estructura cerrada

Los carbohidratos no sólo tienen por función la de almacenar, brindar o controlar la energía en diversos procesos metabólicos. También son empleados como elementos importantes en el almacenamiento de información en el ADN o como elementos estructurales de soporte. Por ejemplo, la celulosa es uno de varios polisacáridos que cumplen con esta función. Es un polímero insoluble e inerte de carbohidratos D-glucosa (más de 15 000) unidos en secuencia lineal de acuerdo a la Figura 24, cohesionados de tal forma que le proporciona rigidez a la pared celular de plantas, dándole una dureza característica a tallos y maderas que le permite a estos organismos mantener formas y estructuras muy pesadas. En algunas plantas, la celulosa puede llegar a constituir casi el 80% de su peso seco. La celulosa se asocia con otros polímeros para otorgar mayor dureza a la estructura, ejemplo de esto es o la *lignina*, un polímero fenólico muy parecido al plástico que cuando se combina con la celulosa forma una matriz extremadamente dura. Estos compuestos, al ser producidos sólo por plantas terrestres superiores, son arrastrados por ríos hasta llegar al mar donde son introducidos al ecosistema. Tanto la celulosa como la lignina, debido a su escasa reactividad química, se utilizan como *biomarcadores* para la determinación del aporte de materia orgánica terrestre al sedimento marino^{2,3,13}.

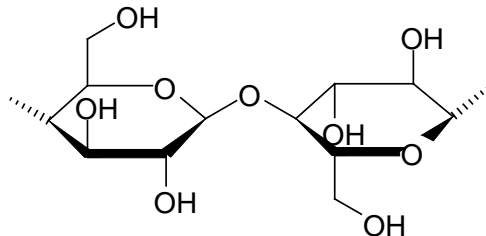


Figura 24. Unidad estructural de la celulosa

En animales superiores la estructura de soporte se debe a las proteínas, sin embargo muchas de ellas se asocian con carbohidratos (glucoproteínas) como es el caso del glucógeno, el cual es su principal reservorio de energía. Otros polisacáridos en plantas tienen la misma función, por ejemplo el almidón, que sirve como fuente de energía¹³.

En el medio marino los carbohidratos son un importante constituyente de la materia orgánica particulada en el océano. Se encuentran disueltos en el agua de mar e inclusive en sedimentos. Pueden encontrarse como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos dependiendo de la fuente de producción. Para los primeros dos, uno de los principales orígenes corresponde al fitoplancton, mientras que para los polisacáridos puede atribuirse

su origen a organismos superiores. La glucosa y fructosa son los monosacáridos más abundantes en las aguas y sedimentos marinos. La glucosa proviene directamente del fitoplancton. Por otro lado, la fructosa se origina por la transformación abiótica de la glucosa debido al pH del medio y a otras condiciones como la temperatura¹³.

Existen varios polisacáridos que pueden encontrarse en el mar, todos ellos provienen de organismos vivos. Ejemplos de ellos son la *celulosa*, que es de origen terrestre, el *ácido algínico*, que es producido por algas (Figura 25 a) y la *quitina*, la cual se produce en las paredes celulares de los exoesqueletos de invertebrados como crustáceos y en las estructuras de soporte de algunas algas^{3,13} (Figura 25 b).

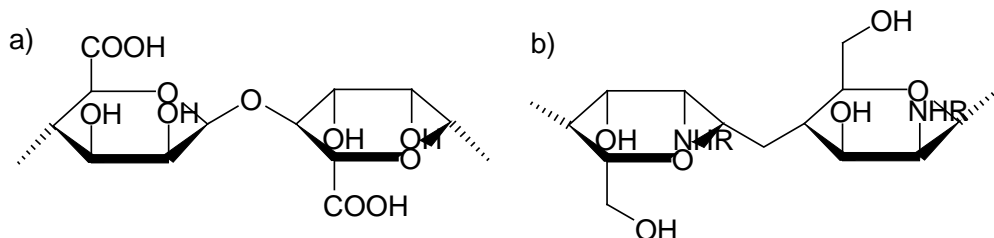
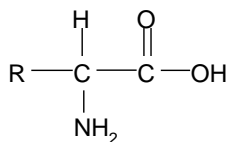


Figura 25. Polisacáridos a) Ácido algínico b) Quitina

2.2.5 Aminoácidos y proteínas

Las proteínas son los componentes principales de las estructuras musculares (soporte) en todos los animales. Se encuentran en la mayoría de los tejidos animales. Tienen tantas funciones que no se consideran compuestos específicos de una sola especie. Muchas de ellas son *reguladores metabólicos*, pues al formar parte (casi total) de las *enzimas*, tienen funciones específicas en puntos clave de todos los procesos bioquímicos; algunos ejemplos son la producción de otras proteínas, la regulación del crecimiento, la digestión, etc¹³.

Las proteínas se componen de unidades básicas llamadas aminoácidos. Los aminoácidos son compuestos orgánicos ácidos que contienen por lo menos un grupo amino. Existen en la naturaleza veinte aminoácidos esenciales con que se forman todas las proteínas (Figura 26). Los aminoácidos que la naturaleza utiliza son en su mayoría de configuración levógira. Las proteínas pueden llegar a tener pesos moleculares de 6 000 (insulina, con algunos cientos de aminoácidos) hasta más de 20 millones (como la keratina)^{3,13}.



Nombre	Estructura lateral -R
Glicina	-H

Alanina	-CH ₃
Serina	-CH ₂ OH
Cistina	CH ₂ SSCH ₂ -
Valina	-CH(CH ₃) ₂
Ácido aspártico	-CH ₂ COOH
Ácido glutámico	-CH ₂ CH ₂ COOH

Figura 26. Estructura general de un aminoácido y algunas de sus diferentes cadenas laterales del sustituyentes R.

Para poder formar a las proteínas, los aminoácidos reaccionan entre sí a través de una reacción ácido-base, la cual forma un enlace llamado *peptídico*, formando como productos un condensado nombrado *péptido* (o proteína, dependiendo del número de unidades de aminoácidos) y una molécula de agua (Figura 27).

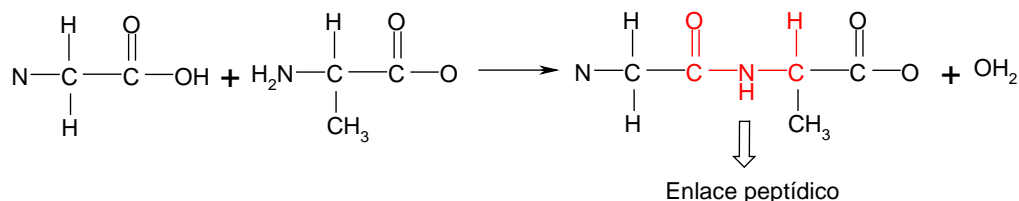


Figura 27. Formación de un enlace peptídico, el cual en serie da origen a las proteínas

En el medioambiente marino los aminoácidos se pueden encontrar como péptidos, proteínas y enzimas así como material celular, estos pueden estar disueltos, en coloides y precipitados como sedimentos y sustancias húmicas.

Debido a la cantidad increíble de proteínas y enzimas, la distribución de estos complejos es variada y diferente en las aguas oceánicas. Sin embargo, si se consideran a los aminoácidos, los más abundantes en aguas y sedimentos marinos son: el ácido glutámico, el ácido aspártico, glicina, serina, histidina y alanina.

Parte de los aminoácidos presentes en el medio marino se atribuyen a la presencia de fitoplancton, pues la concentración es mayor en sus colonias. Además, la distribución de estos compuestos en el agua es similar a la del fitoplancton, decrece al aumentar la profundidad^{2,3,13}.

2.2.6 Otros compuestos

2.2.6.1 Aldehídos y cetonas

Los aldehídos y cetonas son compuestos muy semejantes pues ambos contienen un grupo carbonilo. Sin embargo sus diferencias en reactividad química obedecen a sus diferencias estructurales, los aldehídos (con fórmula general RCHO) contienen un grupo carbonilo y un átomo de hidrógeno unido a él, mientras que las cetonas (fórmula general RCOR') tienen un grupo carbonilo unido a dos cadenas alifáticas o aromáticas (Figura 28).



Figura 28. Estructuras de compuestos carbonílicos: a) aldehído, b) cetona. R y R' representan grupos alifáticos y/o aromáticos.

Los aldehídos pueden encontrarse en sedimentos y aguas marinas. Su principal origen es de tipo biogénico, sin embargo también pueden producirse por reacciones fotoquímicas de oxidación sobre compuestos húmicos³. Los aldehídos producidos en el medio marino se caracterizan por tener pesos moleculares bajos, como el formaldehído, el acetaldehído y otros con cadenas principales de C₆ a C₁₀. A los aldehídos de cadenas largas entre C₂₄ y C₃₆ se les atribuye principalmente un origen terrestre (ceras de vegetación de tierra), mientras que los aldehídos fenólicos han sido aislados de derivados de lignina terrestre^{2,3,5}.

Las cetonas (principalmente *alquenonas*) se encuentran en sedimentos y se derivan de la oxidación de productos del fitol, así como de la biosíntesis en cantidades traza de algunas especies de fitoplancton haptophyte¹⁷, incluyendo a la cocolitofora *Emiliana huxleyi* y a la subtropical *Gephyrocapsae oceanica* en el océano abierto⁵. Las alquenonas son verdaderos *biomarcadores* para definir bien la porción de la productividad superficial en el océano. Las alquenonas pueden tener 2, 3 ó 4 dobles ligaduras (insaturaciones). El grado de insaturación de la alquenona C₃₇ (Figura 29) ha demostrado un incremento con el decremento en la temperatura del agua en la que crecen las microalgas y la insaturación en una muestra correlaciona bien con el crecimiento de la temperatura. Se piensa que la alquenona C₃₇ tiene como función dar fluidez a la membrana celular de la *Ehuxleyi*^{18,19}.

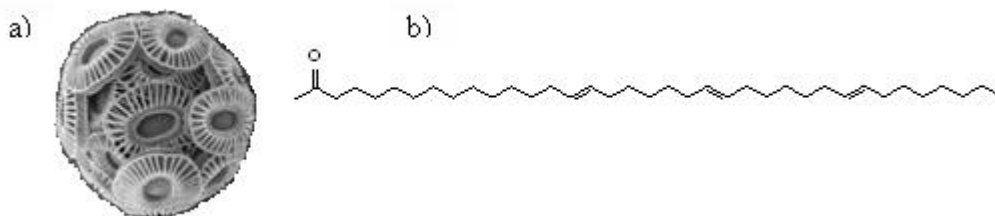


Figura 29. a) *Emiliana huxleyi*, productora de las alquenonas C₃₇ (b) y C₃₉.

Para la estimación de la temperatura, esta insaturación generalmente es expresada por el índice de insaturación cetónico (KUI por sus siglas en inglés) como la razón $U^{K'}_{37}$, la cual corresponde a la proporción de la cantidad de las alquenonas C₃₇ di-insaturado entre el total de C₃₇ di más tri-insaturados en la muestra según la relación:

$$U^{K'}_{37} = \frac{[(37:2)]}{[(37:2) + (37:3)]}$$

Los registros de $U^{K'}_{37}$ en sedimentos correlacionan bien para la temperatura superficial marina (SST) y ha sido probada su confianza y robustez en la reconstrucción de

la SST del pasado, por lo cual, las alquenonas funcionan como *biomarcadores* paleoclimáticos^{17,19,20}.

2.2.6.2 Alcoholes

Estos compuestos se caracterizan por contar con un grupo –OH (hidroxilo) unido a una cadena alifática. Los alcoholes son compuestos importantes en algunas vías metabólicas y productos de descomposición de otras sustancias como lo es el *fitol*^{3,13}.

El *fitol* (Figura 30 b) es un resto alcohólico de la descomposición de la *clorofila a*, específicamente de una cadena lateral. En ambientes reductores el *fitol* da lugar al *pristano* (Figura 30 a) el cual es un hidrocarburo alifático que puede encontrarse en pequeñas cantidades en fitoplancton, zooplancton, agua y depósitos marinos. Por otro lado, el *fitol* en condiciones oxidantes puede formar al *fitano* (Figura 30 c). *Puede por lo tanto emplearse al fitol como un biomarcador de oxididad*^{3,20,21}.

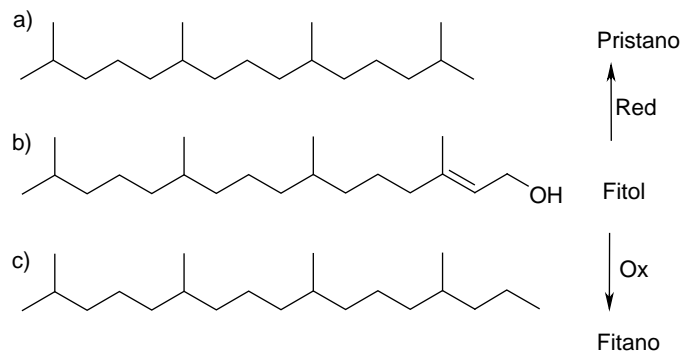


Figura 30. a) Pristano, b) Fitol, c) Fitano. Las reacciones del fitol dependen del medioambiente marino.

2.3 Producción del petróleo en el medio marino

2.3.1 El petróleo

Uno de tantos fenómenos que ocurren en el sedimento marino es el de la formación de petróleo. Este producto es, en la actualidad, de importancia fundamental para la vida del hombre y por consiguiente para la economía mundial. Su principal uso es como combustible, debido al tipo de sustancias que lo constituyen. Sin duda alguna su formación, un magnífico evento, involucra a tantos otros procesos biogeoquímicos que resulta difícil el poder citarlos a todos, sin embargo se presenta un breve resumen sólo de la composición química así como de las tres etapas básicas de su formación.

2.3.2 Una mezcla compleja

El petróleo es una mezcla con una gran variedad de compuestos orgánicos que pueden clasificarse, de forma general, por su separación mediante una destilación fraccionada ¹¹ (Tabla 4).

Tabla 4. Composición química del petróleo

Fracción	Temperatura de destilación (°C)	Número de carbonos
Gas	< 20	C ₁ -C ₄
Éter de petróleo	20-60	C ₅ -C ₆
Nafta ligera (Ligroína)	60-100	C ₆ -C ₇
Gasolina natural	40-205	C ₅ -C ₁₀ y cicloalcanos
Queroseno	175-325	C ₁₂ -C ₁₈ y aromáticos
Gasóleo	>275	C ₁₂ y superiores
Aceite lubricante	Líquidos no volátiles	Probablemente cadenas largas unidas a estructuras cíclicas
Asfalto o coque	Sólidos no volátiles	Estructuras policíclicas

Por gases se comprende al metano, etano, propano y butano, mientras que en el éter de petróleo se consideran a las parafinas líquidas. Los naftenos son cicloparafinas como el ciclohexeno. Por otro lado, la gasolina natural es una mezcla de hidrocarburos saturados de cadena larga, ramificada o cíclica entre 5 y 10 carbonos al igual que el queroseno, salvo que el último también presenta compuestos aromáticos. En la última fracción se encuentran los asfaltenos, que son moléculas de altos pesos moleculares de altos puntos de ebullición y de propiedades químicas inertes ^{3,11}.

Muchos hidrocarburos se producen por procesos bioquímicos en organismos unicelulares, sin embargo, estos contribuyen con sólo un pequeño porcentaje a la formación total del petróleo. Esta mezcla de hidrocarburos es, principalmente, el resultado de varios procesos físicos, químicos y biológicos que se desarrollan en el fondo marino ^{2,3,22}. En estos procesos se involucran esencialmente a tres etapas: diagénesis, catagénesis y metagénesis las cuales se diferencian por características propias que pueden observarse en la Figura 31.

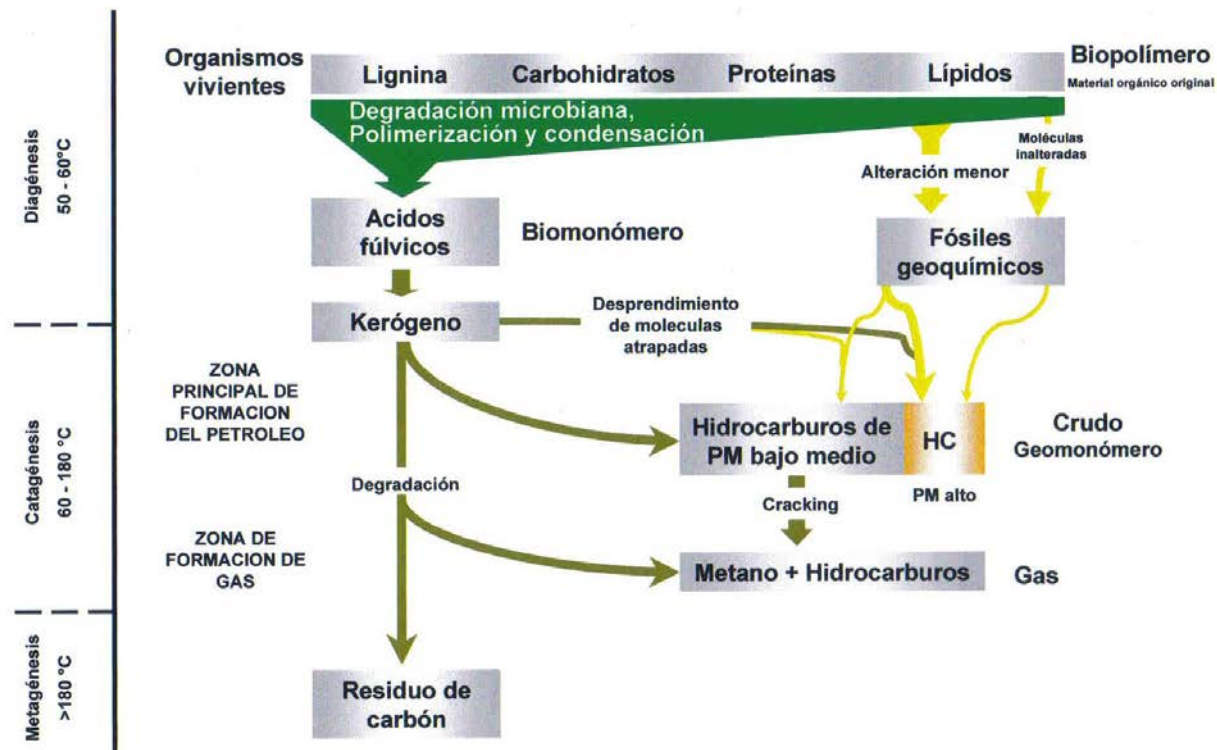


Figura 31. Etapas de la formación del petróleo

2.3.3 Diagénesis

El origen del petróleo inicia con la acumulación de materia orgánica en el fondo oceánico. Esta materia orgánica está compuesta por una gran diversidad de cuerpos y sustancias orgánicas como organismos muertos, secreciones animales y otros. Su acopio en el piso del mar, su deposición y compactación es, en suma, el proceso llamado diagénesis. Este evento se desarrolla a temperaturas menores de 60°C en sedimentos nuevos que han sido sepultados por partículas inorgánicas. Se llevan a cabo importantes acontecimientos como la degradación microbiana de la materia orgánica, la polimerización y finalmente la condensación de estos biopolímeros. Todo esto da origen a una sustancia sin estructura definida (compuesta por polímeros muy grandes) llamada *kerógeno*. El *kerógeno* es una materia orgánica insoluble en disolventes orgánicos e inorgánicos, intermediaria para la formación del petróleo^{2,22}.

Por lo tanto, en esta etapa se transforma a la materia orgánica inicial en kerógeno, siendo uno de los resultados la pérdida de átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre de los compuestos iniciales²².

2.3.4 Catagénesis

El siguiente paso es la catagénesis, proceso en el cual, los biopolímeros producidos en la diagénesis se descomponen por acción de la temperatura (entre 60 y 190°C) y la presión para formar hidrocarburos de medianos y bajos pesos moleculares. Esta mezcla de hidrocarburos ya es llamada petróleo.

La producción de los hidrocarburos se lleva a cabo a grandes profundidades en donde se provoca el craqueo del kerogeno por la temperatura (debida al calor del interior de la tierra) y la presión (por la columna de agua soportada de varios kilómetros de profundidad). La formación del petróleo se realiza al inicio de la catagénesis, sin embargo, al final de esta etapa, por la inestabilidad de los productos del kerogeno a estas temperaturas y presiones, pueden los hidrocarburos descomponerse en estructuras simples de pesos moleculares muy bajos e inclusive llegar a producir metano^{2,22}.

2.3.5 Metagénesis

Esta última etapa consiste en el craqueo total del petróleo producido en la catagénesis para dar origen a hidrocarburos de pesos moleculares bajos como propano, etano y principalmente metano. Debido a las altas temperaturas (mayores a 190°C) y presiones presentes a estas grandes profundidades, la producción del metano y la formación de residuos de carbón se llevan a cabo en estas condiciones²².

2.4 Análisis de *biomarcadores*

El método de análisis para la cuantificación de *biomarcadores* es todo un reto. Debido principalmente a la composición compleja del agua o sedimento, el análisis de la muestra normalmente es difícil y tardado. Es por ello que siempre se busca una técnica que permita manejar una muestra de la forma más fácil, rápida y sencilla posible. A la vez, se requiere que esta técnica experimental sea sensible, exacta y precisa a concentraciones muy pequeñas.

2.4.1 CG-EM: una técnica apropiada

La técnica más utilizada para el análisis de *biomarcadores* reportada en la literatura ha sido la cromatografía de gases (CG). Este método, ampliamente conocido y aplicado, resulta ser la mejor opción para un estudio cualitativo y cuantitativo sobre la composición de aguas y sedimentos marinos. Entre las ventajas que ofrece se encuentran, la sensibilidad

(pueden detectarse hasta nanogramos de componentes de la mezcla) y la precisión y exactitud con la que pueden determinarse las concentraciones de los analitos. La CG acoplada a un equipo de espectrometría de masas (EM) resulta un método muy eficiente que facilita el análisis químico de muestras complejas. Esta técnica permite manejar abundantes datos sobre cada muestra analizada permitiendo así una mejor comprensión de la muestra. El sistema CG-EM (Figura 32) acorta considerablemente el tiempo de análisis de una muestra debido a múltiples herramientas, entre las que se encuentran: el monitoreo selectivo de iones, extractos iónicos de corridas en barrido total de espectro y a la utilización de una biblioteca de espectros de masas para la identificación de los picos.

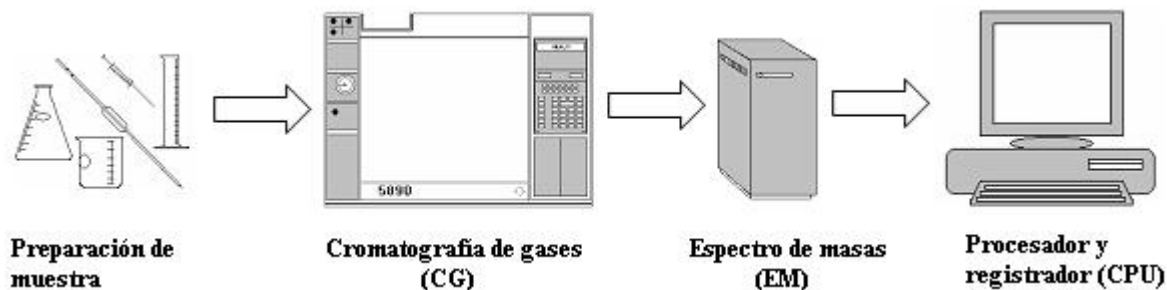


Figura 32. Diagrama del sistema CG-EM

La preparación de la muestra de los sedimentos marinos previa al análisis cromatográfico puede ser laboriosa y lenta debido a las características de la matriz y la gran cantidad de componentes presentes.

2.4.1.1 Técnicas de preparación de muestra para CG

En el desarrollo de un método analítico existen numerosos pasos antes de llegar a resultados útiles. Sin embargo, el proceso más lento y lleno de imprecisiones es el de la preparación de muestra. El principal objetivo del tratamiento previo de muestra para CG es el de conseguir preparaciones con analitos concentrados y libres de interferencias. A continuación se mencionan dos de estas técnicas con aplicaciones a CG^{23,24}.

2.4.1.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

La extracción con disolventes o líquido-líquido es un método habitual para purificar moléculas orgánicas; puede emplearse al separar cuantitativamente sistemas orgánicos e inorgánicos. Mantiene aún su popularidad como método de separación quizá por que se lleva a cabo fácilmente, su proceso es sencillo, reproducible y versátil, además, puede aplicarse a trazas o a grandes cantidades y suele dar separaciones limpias y completas^{22,25}.

Consiste en la distribución de los analitos entre dos fases inmiscibles. Este proceso puede explicarse por la ley de distribución, la cual establece que un soluto puede

distribuirse entre dos fases líquidas inmiscibles, de manera que en el equilibrio, sea constante la relación entre las concentraciones de soluto en las dos fases, a temperatura ambiente fija. La ecuación de distribución de un soluto S entre dos disolventes 1 y 2 es:

$$K = \frac{[S_2]}{[S_1]}$$

Donde K es el coeficiente de distribución a una temperatura determinada, independientemente de la concentración y expresado en función de las concentraciones de equilibrio en ambas fases²⁵.

De forma práctica, la extracción consiste en añadir a una muestra que contenga los analitos de interés, un volumen de un disolvente inmiscible, agitar o tratar con ultrasonido y centrifugar, con el fin de separar las dos fases y después separar las fases, los analitos de interés se encontrarán en mayor proporción en la fase por la que tengan mayor afinidad²⁶.

Se pueden aprovechar otros equilibrios para adecuar la selectividad de la extracción. Por ejemplo, con analitos que tengan propiedades ácido/base, si una de las formas es iónica y la otra neutra, al cambiar el pH se logra ionizar a los analitos deseados para que estos permanezcan en la solución acuosa y al añadir un disolvente orgánico se consiga separar los compuestos no ionizables o neutros a ese valor de pH. Por ejemplo, en medio suficientemente alcalino, algunos compuestos forman sus sales correspondientes que en medio acuoso se encuentran ionizadas (**saponificación**) **incluso se puede lograr la desesterificación en el caso de los ésteres. Esto permite la separación de ácidos orgánicos de compuestos básicos o neutros.** En otro caso, la utilización de una solución ácida nos permite que algunos compuestos nitrogenados, como las aminas, formen compuestos del tipo RH^+ y permanezcan en la fase acuosa durante una extracción con medio orgánico apolar.²⁶

2.4.1.1.2 Extracción de fase sólida (EFS)

Introducida a finales de los años 70's la extracción de fase sólida (EFS) es un método de preparación rápido de muestras, mediante el cual se concentra y purifica los analitos deseados antes de proceder a su análisis²³.

La EFS es, en esencia, una cromatografía en columna a microescala y por lo tanto el principio de separación se basa en las interacciones débiles (tipo Van der Waals, electrostáticas, iónicas, hidrófobas, etc.) entre los constituyentes de una fase líquida, donde se encuentra disuelta la muestra y una fase estacionaria, que determinan la repartición de los solutos.²³

Comercialmente la fase estacionaria para la EFS se encuentra en cartuchos de uso único de polipropileno u otro polímero inerte aunque también se encuentran en vidrio. La estructura básica de un cartucho se muestra en la Figura 33.

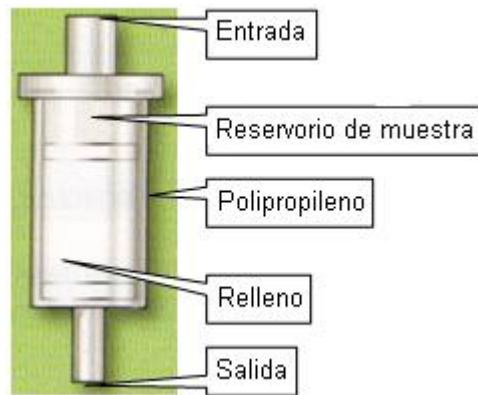


Figura 33. Estructura base de un cartucho de EFS

Los rellenos de los cartuchos de EFS son polímeros tridimensionales que generalmente están constituidos por dos tipos de materiales: sílice o resinas orgánicas. Las interacciones que se produzcan entre el analito y el relleno del cartucho están condicionadas por el tipo de material que contenga el relleno y por los grupos funcionales presentes ²⁶.

Los sorbentes (relleno) más populares son los basados en sílice debido principalmente a que son rígidos, no excesivamente caros, reproducibles, estables y son inmunes tanto a encogerse como a hincharse con solventes acuosos u orgánicos. Los rellenos de sílice modificado químicamente contienen grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie formando grupos silano. El objetivo de modificar la superficie de la sílica es modificar la selectividad ²⁶.

Los sorbentes de tipo polimérico están constituidos por resinas habitualmente de poliestirendivinilbenceno (PSDVB o SDB). Sus características dependen de la naturaleza del monómero que las conforma aunque generalmente son hidrófobas y no polares. Puede modificarse su polaridad por adición de grupos funcionales.

El empleo de la EFS en la preparación de muestras requiere de los siguientes pasos ^{23,26}:

- *Pretratamiento de muestra*, donde se libera de la matriz original a los analitos que se desean analizar, ejemplo del proceso es la extracción con Soxhlet.
- *Activación del cartucho*. El cartucho se coloca e un *distribuidor de vacío* (Figura 34) y se le hace pasar por su interior los disolventes que se emplearán en el fraccionamiento de la muestra en orden de polaridad.



Figura 34. Distribuidor de vacío para cartuchos de EFS. En el se aplica un vacío que permite la rápida filtración de los disolventes y por ende un rápido fraccionamiento.

- *Aplicación de la muestra.* Se introduce la muestra y es retenida por el sorbente.
- *Remoción de interferencias.* En esta etapa se realiza un proceso de limpieza al ir desorbiendo los compuestos interferentes con disolventes adecuados.
- *Etapa de elución.* Se efectúa la desorción o elución de el o los analitos deseados con los disolventes adecuados
- *Etapas de post-elución.* Aquí se realizan los procesos de evaporación y reconstitución de las muestras para su posterior derivatización y análisis cromatográfico.

Después de la activación del cartucho, el fraccionamiento puede realizarse de varias maneras. En el caso de que se desee recuperar y concentrar analitos en bajas concentraciones, se hace pasar la muestra por la columna y los analitos de interés son retenidos fuertemente en la fase estacionaria, los componentes de la muestra no deseados pasan a través del sorbente del cartucho y son lavados utilizando un disolvente débil. Posteriormente los analitos de interés se eluyen con la ayuda de un disolvente de mayor fuerza. Esta muestra concentrada y limpia puede ya ser empleada para el análisis por CG (Figura 35 a). Este procedimiento se emplea cuando los analitos están en muy bajas concentraciones (nivel traza) y se desea enriquecerlos²⁷.

En un segundo enfoque, los analitos no se retienen en el sorbente y se colectan inmediatamente mientras que los componentes la matriz de la muestra se adsorben en la fase estacionaria y se desechan con el cartucho. (Figura 35 b). Este procedimiento se emplea cuando los analitos se encuentran en concentraciones elevadas²⁷.

En otra estrategia, la muestra se aplica sin saturar la columna y se fracciona en dos más porciones eluyendo con una serie de disolventes de fuerza creciente. De esta manera una muestra muy compleja se puede subdividir en distintas fracciones donde en cada uno se encuentran diferentes analitos agrupados por similitud en las interacciones con las fases.

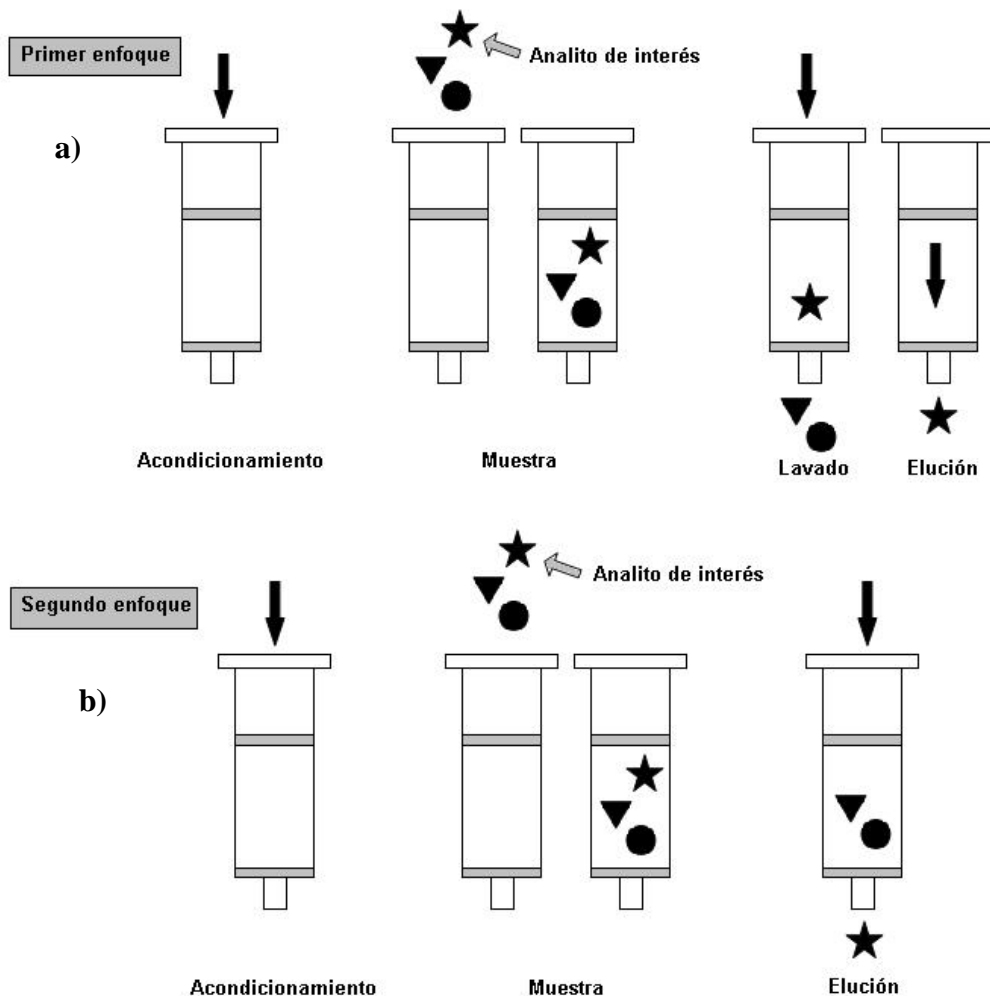


Figura 35. Estrategias de fraccionamiento de muestras por EFS.

Los mecanismos de retención de compuestos en sorbentes de EFS son los mismos que en cromatografía líquida^{26,27,28}:

- **Fase reversa.** Se usa generalmente para extractos hidrofóbicos o analitos orgánicos polares contenidos en una matriz o muestra acuosa. La fase reversa común contiene cadenas hidrocarbonadas y las uniones son de tipo Van der Waals, por lo que son rellenos apolares.
- **Fase normal.** Se emplean normalmente para extractos de analitos polares con disolventes orgánicos no polares. Los mecanismos de retención están basados en puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo entre los analitos polares y las fases estacionarias polares tales como la sílice o alúmina.
- **Intercambio de iones.** Se usa para extractos ionizados en muestras de baja fuerza iónica (orgánica o acuosa). Los adsorbentes con carga positiva o negativa son usados para retener analitos de carga contraria por atracciones electrostáticas. Sólo los compuestos cargados son retenidos en el cartucho, el resto de la matriz y los contaminantes se eliminan durante la carga de muestra y los lavados.

- **Fase mixta.** Presenta diferentes mecanismos de acción sobre los analitos, pudiendo esta forma extraer compuestos que tengan características químicas diferentes, tanto polares como no polares. Se llevan a cabo interacciones de compuestos con sorbentes modificados. Suelen combinarse mecanismos de interacción hidrófobos con mecanismos de intercambio iónico.

La elección del mecanismo de extracción apropiado para una muestra depende principalmente de tres factores a considerar:

- El tipo de analito. Se debe tener en cuenta los grupos funcionales de los analitos a analizar.
- Tipo de matriz. La matriz en la que se encuentran los analitos que se desean separar condiciona y determina el tipo de extracción que se debe emplear.
- Objetivo de análisis. El solvente que se utilice en la elución de los cartuchos deberá ser compatible con la técnica de detección que se vaya a usar.

2.4.1.1.3 Ventajas de la EFS frente a la ELL

Existen varias ventajas de la EFS en la separación y concentración de analitos frente a la ELL, entre ellas se encuentran ²⁷:

- Mejora la selectividad y especificidad
- Aumenta las recuperaciones
- Intensifica la eliminación de interferencias
- Aumenta la reproducibilidad (No en todos los casos)
- Reduce el trabajo, su uso es fácil, existe la posibilidad de automatización y esto nos permite analizar múltiples muestras a la vez
- Aumenta la flexibilidad en términos de miscibilidad de solventes
- Elimina las emulsiones
- Disminuye el consumo de solventes tóxicos
- Reduce la exposición del personal del laboratorio a solventes tóxicos e inflamables

Además de lo anterior, también logra concentrar a los analitos deseados y como consecuencia aumenta la sensibilidad y disminuye el límite de detección y el límite de cuantificación y en el caso de utilizar alguna técnica cromatográfica como método último del análisis se alarga la vida útil de las columnas al eliminar componentes de difícil elución.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la extracción en fase sólida (EFS) para el fraccionamiento del extracto lipídico de sedimentos de zonas costeras.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ♣ Desarrollar una técnica experimental para el fraccionamiento por EFS del extracto lipídico de sedimentos de zonas costeras.
- ♣ Implementar las técnicas experimentales más utilizadas en el análisis del extracto lipídico de sedimentos costeros: derivación y análisis directo de extracto lipídico total (ELT) y por fraccionamiento por saponificación (FSN).
- ♣ Analizar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) los diferentes extractos obtenidos e identificar los compuestos principales (señales cromatográficas con mayor área).
- ♣ Identificar los compuestos que puedan ser empleados como biomarcadores del origen de la materia orgánica e interpretar su presencia en dos muestras del área del puerto de abrigo de Sisal, Yucatán, correspondientes a la dársena y a la arena de playa.

4 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 Toma y almacenamiento de muestra

Las muestras que se emplearon corresponden a sedimentos costeros del puerto de abrigo de Sisal Yucatán, que se localiza en la región costera noroccidental del estado, a una distancia de 53 km de Mérida. Sus coordenadas geográficas son 21° 9'55.22"N 90° 1'54.93"W.



Figura 36. Localización geográfica del Sisal Yucatán.

Se colectaron aproximadamente 500 mg de dos tipos de sedimentos:

- Muestra de dársena (MD). Mantiene una apariencia arcillosa de color amarillo pálido. Formó al momento de secarse un sedimento sumamente duro y muy difícil de pulverizar lo que significa un alto contenido de arcillas. Se tomó de la dársena del *puerto de abrigo* del Sisal (Fig. 37)
- Muestra de arena (MA). Compuesto por partículas de 125 μm a 1mm de diámetro aproximadamente. Se tomó de *la playa* en el Sisal (Fig. 37).

El muestreo se realizó tomando el sedimento superficial (profundidad de 0 a 5 cm. aprox.) con una pala manual, depositándose en bolsas de sellado hermético y congelando el contenido a 0°C. Posteriormente, los sedimentos se secaron en frío con el uso de un liofilizador (Heto-Holten Allerød Denmark 2001) y se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno a 4°C hasta su análisis.

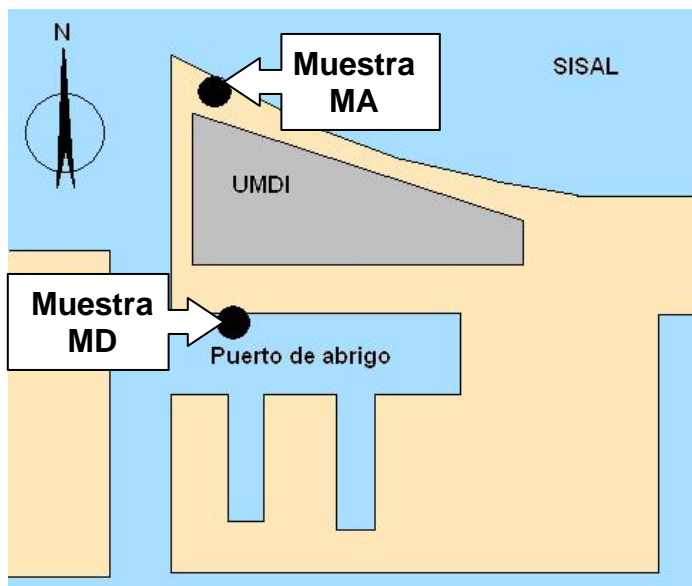


Figura 37. Lugar de la toma de muestra junto al UMDI (Unidad multidisciplinaria en docencia e investigación de Sisal)

4.2 Equipo, material y reactivos

Equipos

- Cromatógrafo HP 5890 series II con sistema de inyección on-column y un detector de ionización de flama (Hewlett-Packard Company, Avondale, USA) con columna capilar de alta temperatura UAC-65 (65% fenilmetilsiloxano) 15 m * 0.25 mm * 15 µm (Quadrex Corp. Woodbridge CT, USA)
- Cromatógrafo HP 5890 series II con sistema de inyección split/splitless y acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5971 series (Hewlett-Packard Company, Avondale, USA) con columna capilar Crossbond (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano) 30 m * 0.32 mm * 1 µm (Resteck Corporation, Bellefonte PA, USA)

Material

- Cartuchos con fase de sílice *Bond Elut Jr* fase LC-Si capacidad de 0.5 mL (Chrompack 1216-2037B; Varian Inc. Harbor City, USA)
- Viales de vidrio con capacidad de 4, 10 y 20 mL (Supelco, USA)
- Pipetas pasteur
- Jeringas Hamilton con capacidad de 10, 250 y 500 µL
- Material común de laboratorio

Reactivos

- BSTFA (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, USA)
- KOH al 5 % en metanol
- HCl al 5 % en metanol

- NaHCO_3 (J.T. Baker, S.A. de C.V., Edo. De México, México)
- Na_2SO_4 (J.T. Baker, S.A. de C.V., Edo. De México, México)

Disolventes

- Hexano G.C.(J.T. Baker, México)
- Tolueno G.C. (J.T. Baker, México)
- Acetato de etilo G.C. (J.T. Baker, México)
- Metanol G.C. (J.T. Baker, México)

Estándares

- Nonanol G.C. (PolyScience Corp., USA)
- Pentadecano G.C. (PolyScience Corp., USA)
- Heptadecano G.C. (PolyScience Corp., USA)
- Nonadecano G.C. (PolyScience Corp., USA)
- Ácido hexadecanoico G.C. (Sigma, USA)
- Ácido Octadecaóico G.C. (Sigma, USA)
- Colesterol G.C. (Sigma, USA)
- 100 g de cada de sedimento

Otros

- N_2 (extraseco: INFRA, S.A. de C.V., Edo. de México, México)
- He (G.C.; INFRA, S.A. de C.V., Edo. de México, México)
- Aire (G.C.; INFRA, S.A. de C.V., Edo. de México, México)
- H_2 (G.C.; INFRA, S.A. de C.V., Edo. de México, México)

4.3 Procedimientos para la preparación de muestra

4.3.1 Extracto lipídico

La preparación de muestra consistió en un primer paso de la extracción de las fracciones lipídicas de la matriz de cada sedimento (Extracto lipídico) de las cuales se partió para los diferentes métodos de análisis (Figura 38).

Este procedimiento se realizó mediante una extracción Soxhlet utilizando 100 g de sedimento (MA y MD por separado) y 400 mL de una mezcla de tolueno/metanol (6:1) y 100 mL de una disolución alcohólica de KOH al 5% durante 8 horas. El extracto se acidificó con una disolución de HCl al 5% en MeOH hasta un pH aproximado de 0 y se

añadieron 100 mL de agua. Se separó cada una de las fases y se concentró la fase orgánica (tolueno) que contiene al extracto lipídico hasta un volumen de 10 mL.

4.3.2 Análisis del Extracto lipídico total (ELT)

Se tomó 1 mL del extracto lipídico y se llevó a sequedad. Se aciduló con HCl al 5% en MeOH hasta pH aproximado de 0 y se calentó a 80°C por una hora, se agregó 1 mL de agua y después se extrajo con 2 mL de tolueno. Esta disolución se neutralizó con NaHCO₃, se lavó con 2 mL de agua y se secó con Na₂SO₄, la fracción orgánica se lleva a sequedad con flujo de N₂ seco. Se añadieron 250 µL de tolueno y se formaron los derivados trimetilsililados de la muestra adicionando 250 µL de BSTFA y calentando a 80°C por una hora.

4.3.3 Análisis de la Fracción Saponificable y No saponificable (FSN)

Se saponifica 1 mL del extracto lipídico con 2 mL de una disolución de KOH al 5% en etanol calentando a 80°C durante una hora. Se agregó 1 mL de agua y se extrajo de esta disolución la fracción orgánica con 3 mL de tolueno y se separaron las fases:

- **Fase orgánica** (*compuestos básicos y neutros*). Se lavó con 2 mL de agua, se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad con flujo de N₂. Se adicionaron 250 µL de tolueno y se formaron los derivados trimetilsililados con 250 µL de BSTFA calentando a 80°C por una hora.
- **Fase acuosa** (*compuestos ácidos*). Se aciduló con HCl al 10% en etanol hasta pH cero, se extrajo con 3 mL de una mezcla hexano/tolueno (4:1) y se prosiguió con la fase orgánica. Se lavó con agua para separar sales inorgánicas y se eliminaron los restos de agua de la fracción orgánica con Na₂SO₄ para posteriormente llevarlo a sequedad. Se adicionaron 250 µL de tolueno y se derivatizó con 250 µL de BSTFA calentando a 80°C durante una hora.

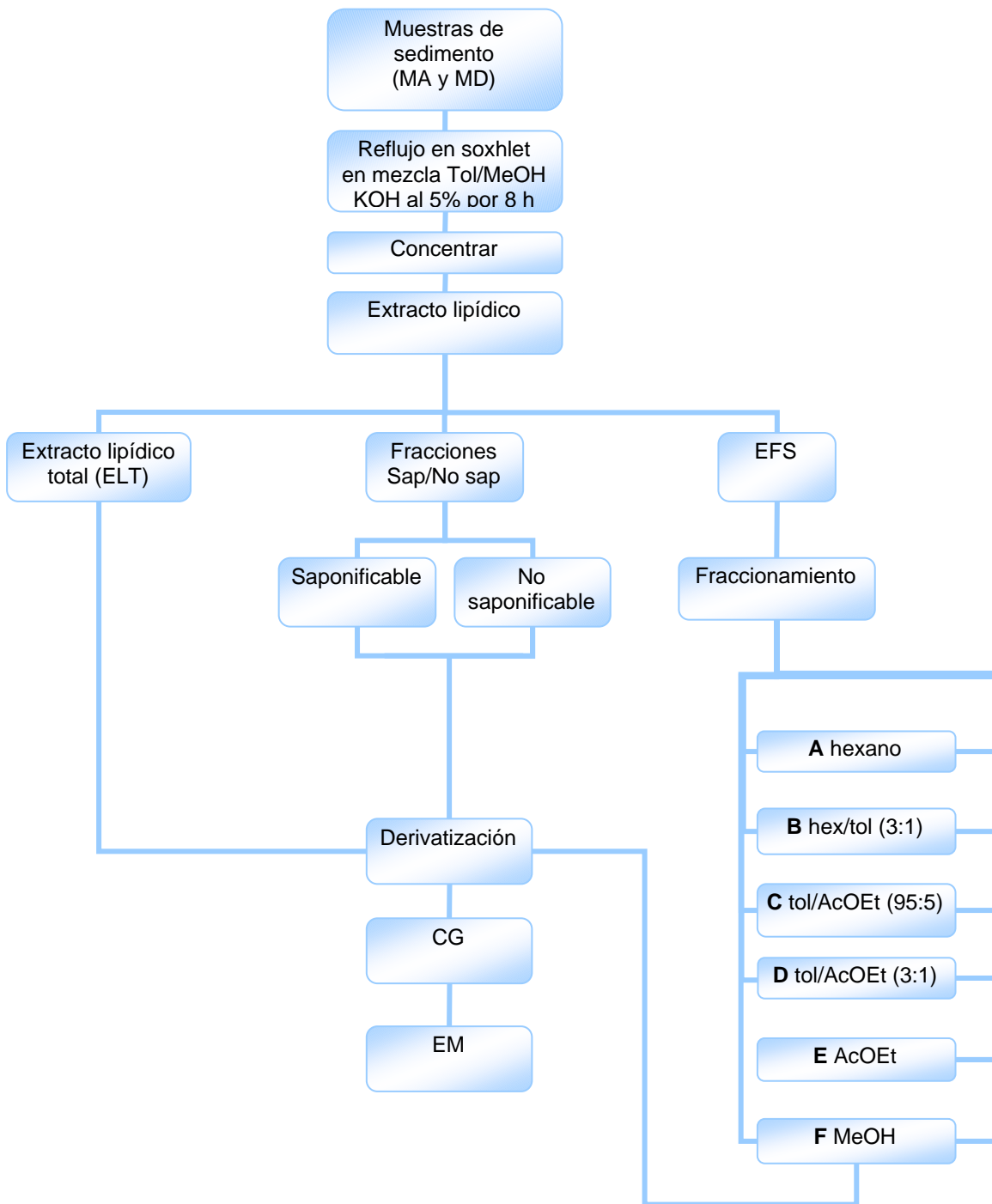


Figura 38. Diagrama de flujo para el procedimiento de preparación y análisis realizado a las muestras de arena (MA) y dársena (MD).

4.3.4 Extracción en fase sólida (EFS)

Hay pocos trabajos publicados que reporten el uso de EFS en el análisis de sedimentos marinos²⁴, en general el fraccionamiento se realiza por cromatografía en columna clásica (CL)^{3,5}. Para implementar el procedimiento por EFS se utilizaron cartuchos con fase de sílice (*Bond Elut Jr* fase LC-Si capacidad de 0.5 mL) y las mezclas eluyentes se definieron a partir de las utilizadas para la CL, ajustando la composición y los volúmenes con los resultados obtenidos para una mezcla de estándares de 0.4 mg/mL. La mezcla se conformó con compuestos representativos de algunos de los grupos de interés en el análisis de sedimentos: alcanos, alcoholes, ácidos carboxílicos y esteroides (Tabla 5).

Tabla 5. Compuestos empleados como estándares para la evaluación de la fase de sílice

Compuesto	Fórmula condensada	Peso molecular	P. F. (°C)	P.E. (°C)	Familia
Nonanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{OH}$	144.26	-8	215	Alcohol
Pentadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$	212.42	10	266	Alcano
Heptadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	240.48	15	292	Alcano
Nonadecano	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	268.53	32	320	Alcano
Ácido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	256.43	63	269	Ácido carboxílico
Ácido Octadecaico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	284.48	70	287	Ácido carboxílico
Colesterol	$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}$	386.66	148	-	Esterol

4.3.4.1 Procedimiento para el uso del cartucho con fase de sílice

Se colocó un cartucho con fase de sílice en un *distribuidor de vacío* y se acondicionó haciéndole pasar 2 mL de cada uno de los siguientes disolventes en orden estricto: metanol, acetato de etilo, tolueno y hexano. Inmediatamente se agregaron 500 μL de la mezcla de estándares y se eluyeron en cinco fracciones con 2 mL de cada uno de los siguientes eluyentes, en orden creciente de polaridad: hexano (fracción A), hexano/tolueno (3:1) (fracción B), tolueno/acetato de etilo (95:5) (fracción C), tolueno/acetato de etilo (3:1) (fracción D) y acetato de etilo (fracción E). Posteriormente, cada fracción se llevó a sequedad, se añadieron 250 μL de tolueno y se derivatizó con 250 μL de BSTFA calentando a 80°C por una hora. Las fracciones se analizaron por CG con detector de ionización de flama (DIF) para determinar el % Recobro de cada compuesto.

4.3.4.2 Fraccionamiento de los extractos lipídicos por EFS

El tratamiento y análisis de los extractos lipídicos (Concentrados FL) fue el mismo que el de los estándares: se eluyeron 500 μL de muestra por el cartucho, previo acondicionamiento, con el mismo sistema de eluyentes, salvo por el aumento de una fracción final de metanol (F) y el mismo tratamiento para la derivatización y el análisis cromatográfico.

4.4 Procedimiento para el análisis cromatográfico

4.4.1 Estándares

La muestra de estándares se analizó inyectando 1 μL en un equipo cromatográfico HP 5890 series II con sistema de inyección on-column y un detector de ionización de flama (Hewlett-Packard Company, Avondale, USA). El sistema CG se equipó con una columna capilar UAC-65 (65% fenilmetilsiloxano) 15 m * 0.25 mm * 15 μm (Quadrex Corp. Woodbridge CT, USA). El programa de calentamiento fue: temperatura inicial de 40°C por 3 minutos, se calienta a 40°C min^{-1} hasta 370°C por 4.75 minutos. Temperatura del detector 380°C.

4.4.2 Muestras de sedimentos

Se inyecta 1 μL de cada muestra de sedimento en un equipo cromatográfico HP 5890 con sistema de inyección split/splitless acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5971 series. El sistema CG-EM se equipó con una columna capilar Crossbond (5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano) 30 m * 0.32 mm * 1 μm (Resteck Corporation, Bellefonte PA, USA). El programa de calentamiento: temperatura inicial de 65°C por 1 minuto, la rampa de calentamiento 5°C min^{-1} hasta 300°C por 20 minutos. Temperatura del inyector de 280°C. Se utilizó helio como gas acarreador con un flujo constante de 1 mL min^{-1} . Se inyectó en modo splitless de 30 segundos. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C y la temperatura del analizador (cuadrupolar) de 150°C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV; se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN, por su nombre en inglés) de 50 a 550 m/z para la identificación de iones para la caracterización.

4.5 Identificación

El análisis para los estándares se realizó por medio de sus tiempos de retención (tr) mientras que para las muestras la identificación de sus componentes se efectuó mediante la comparación de sus espectros de masas obtenidos del barrido con los almacenados en la biblioteca del software NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library version 2.0, 18 sep 2001).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Eficacia en la separación de estándares por EFS con fase de sílice

La aplicación de la EFS a la mezcla de estándares permitió ajustar las condiciones experimentales para un adecuado fraccionamiento de los compuestos agrupados por similitud de polaridades. Como se aprecia de la Figura 39, en la fracción A (hexano) eluyen prácticamente la totalidad de los hidrocarburos con una recuperación mayor al 99%. Conforme aumenta la polaridad del eluyente se obtienen fracciones de compuestos más polares. Así, en la fracción D (Tol/AcOEt 3:1) eluyen los compuestos con grupos hidroxilo, tanto al C_9^{OH} como el colesterol con una recuperación del 90 y 76% respectivamente. En la última fracción, E, (AcOEt) eluyen los ácidos C_{16}^{COOH} y C_{18}^{COOH} con una recuperación superior al 97%. Estos ácidos eluyen en cantidades mínimas en las fracciones B y C y es de esperar que se encuentren compuestos de polaridad intermedia como aldehídos y cetonas en caso de estar presentes.

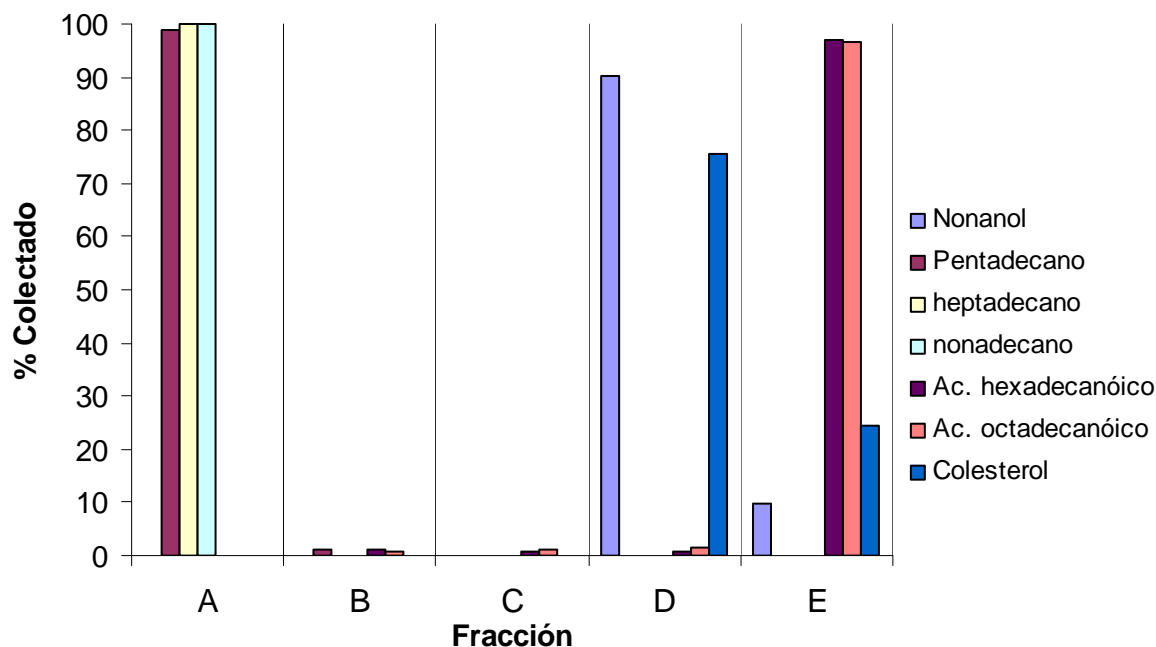


Figura 39. Extracción en fase sólida de la mezcla estándar con concentración 0.4 mg/mL

Por lo anterior se concluye que el fraccionamiento por EFS bajo las condiciones descritas es efectivo para obtener fracciones con sustancias afines en polaridad (por familia o por grupos funcionales) y que pueden recuperarse selectivamente en porcentajes cercanos al 100% de la cantidad que se introdujo para la elución.

Resultados y discusión

5.2 Caracterización de las muestras de sedimentos

La caracterización de las muestras obtenidas por las tres metodologías empleadas en el tratamiento de muestra permitió identificar la presencia de más de 100 compuestos en las muestras. La distribución de la composición de los sedimentos se representa en las Tablas 6 y 7, donde se señalan los compuestos de mayor representatividad, con el área obtenida del cromatograma, agrupados por familias químicas y por cada uno de los procedimientos de preparación de muestra. La primera columna contiene al *Número de compuesto*, clave con que se identifican individualmente los compuestos presentes en los cromatogramas de las muestras en las Figuras 40-53.

5.3 Resultados de las técnicas de preparación de muestra

5.3.1 Extracto lipídico total (ELT)

Los compuestos determinados por este procedimiento se presentan en los cromatogramas de las Figuras 40 y 41. El número de picos presentes en los cromatogramas es mayor para la muestra MD (Figura 41) que para MA (Figura 40), *esto puede explicarse por una mayor productividad acuática, resultado de que en el canal del puerto de abrigo las corrientes son no turbulentas, hay un mayor aporte de materia orgánica proveniente de los humedales cercanos y una mayor tasa de sedimentación, que incluso genera problemas de azolve.*

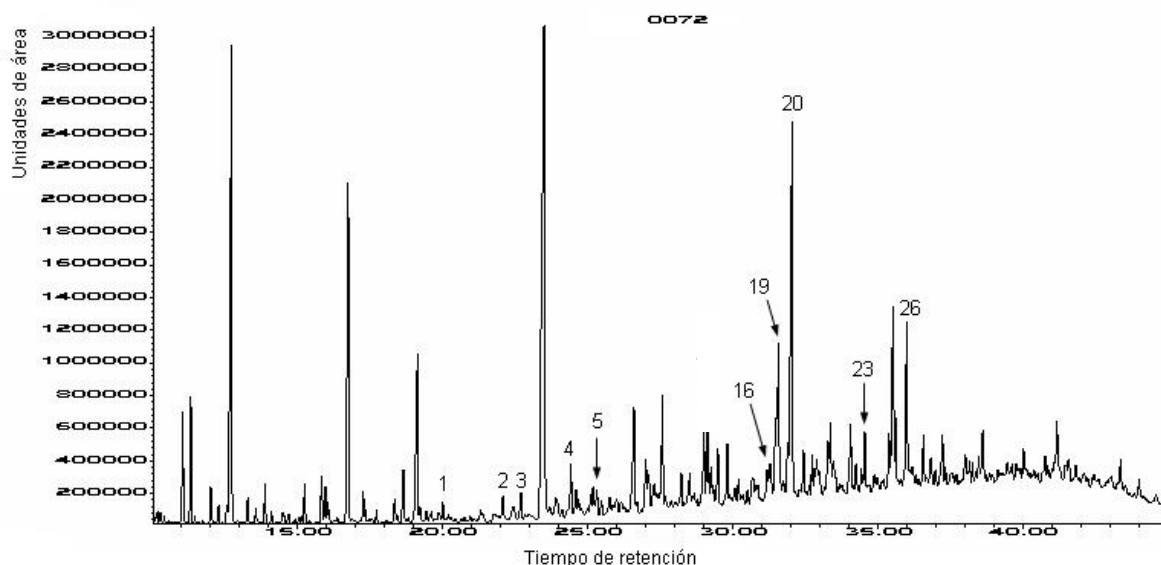


Figura 40. Cromatograma del análisis de sedimento del Extracto lipídico total (ELT) para la muestra de arena (MA), en él se presentan los compuestos (1) ácido n-decanóico, (2) pentadecano, (3) 1-hexadeceno, (4) hexadecano, (5) ácido n-dodecanóico, (16) 1-nonadeceno, (19) eicosano, (20) ácido hexadecanóico, (23) ácido 9,12-octadecadienóico y (26) octadecanóico.

Resultados y discusión

No.	Compuestos	tr	Muestra total		Fracción Sap/No Sap				EFS						Dársena					
			Arena	Dársena	Sap	Arena No Sap	Dársena Sap	Dársena No Sap	A	B	C	Arena D	E	F	A	B	C	D	E	F
1	Ácido n- Decanoico	21.05	3723610	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2158596	-	-	-	-	5066336	-	-
5	Ácido n- Dodecanoico	25.95	9713033	-	5959496	-	-	-	-	-	-	1252297	-	-	-	-	-	14387741	-	-
6	Ácido 3- Hidroxicáprico	26.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7236002	-
9	Ácido n- Tridecanoico	28.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8401163	-	-
14	Ácido 3- Hidroxilaurico	30.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22796902	-
18	Ácido n- Pentadecanoico	32.46	-	-	11849494	-	-	-	-	-	-	2445609	1756063	-	-	-	-	-	4115411	-
20	Ácido n- Hexadecanoico	34.61	121195996	455870779	30214321	40602302	18115485	40398660	-	-	3114308	25649465	11112556	5206578	-	-	2017650	180753997	16314394	4579911
22	Ácido n- Heptadecanoico	36.33	-	49430825	9611591	-	6222924	-	-	-	-	1446846	-	-	-	-	-	26007185	-	-
23	Ácido 9,12- Octadecadienoico	37.61	29633043	-	12786723	-	9930590	-	-	-	-	1614688	-	-	-	-	-	19839703	-	-
24	Ácido trans-9- Octadecenico	37.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8852655	-	-	-	-	-	58249722	-	-
25	Ácido Oleico	37.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3445579	-	-	-	-	-	112064827	-	-
26	Ácido n- Octadecanoico	38.25	66489994	131149569	8708126	28214735	7912813	14933232	-	-	4014860	11873833	6539996	5634789	-	-	2647904	68500359	10879332	4678757
28	Ácido n- Nonadecanoico	39.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7120549	-	-
31	Ácido 11- Eicosenoico	41.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6010216	-	-
32	Ácido n- Eicosanoico	41.58	-	55223403	6170478	-	5913138	-	-	-	-	1500809	-	-	-	-	-	15463571	-	-
34	Ácido n- Docosanoico	44.77	-	24334997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11927785	-	-
36	Ácido n- Tetracosanoico	47.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24093534	-	-

Tabla 6. Caracterización de ácidos grasos para las muestras de sedimentos MA y MD

Resultados y discusión

No.	Compuestos	tr	Muestra total		Fracción Sap/No Sap				EFS						Dársena								
			Arena	Dársena	Arena		Dársena		Arena			A	B	C	D	E	F	A	B	C	D	E	F
					Sap	No Sap	Sap	No Sap	A	B	C												
Aldehídos y Cetonas																							
10	15-Heptadecenal	29.12	-	-	-	-	-	-	5951434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	30.24	-	33868442	-	-	-	29204550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8643736	-	-	-	
27	2-Nonadecanona	39.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	798673	-	-	-	
29	4,8,12,16-tetrametil Heptadecan-4-olido	40.17	-	14069258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6393080	-	-	
Alcoholes																							
15	n-Pentadecanol	30.68	-	-	-	-	-	23017641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7707258	-	-	
37	n-Octacosanol	52.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6770196	-	-	
Hidrocarburos																							
2	Pentadecano	22.13	9661733	-	-	2022406	-	-	2110313	-	-	-	-	-	-	2069532	-	-	-	-	-	-	
3	1- Hexadeceno	24.43	16378184	-	-	19950463	-	-	3955052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	Hexadecano	24.65	10206912	-	-	10476847	-	13975841	2163966	-	-	-	-	-	-	2433030	-	-	-	-	-	-	
7	8-Heptadeceno	26.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1903555	-	-	-	-	-	-	
8	Heptadecano	27.00	-	-	-	12377476	-	-	2098040	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	Octadecano	29.26	11408467	-	-	-	-	21666213	2279027	-	-	-	-	-	-	4202482	-	-	-	-	-	-	
12	2,6,10,14-Tetrametilhexadecano	29.54	-	19749423	-	-	-	22199278	2546020	-	-	-	-	-	-	8415200	-	-	-	-	-	-	
16	1-Nonadeceno	31.30	22053476	-	-	-	-	-	3972047	-	-	-	-	-	-	2852386	-	-	-	-	-	-	
17	Nonadecano	31.45	-	-	-	18228402	-	-	1898789	-	-	-	-	-	-	1833134	-	-	-	-	-	-	
19	Eicosano	33.47	18329750	-	-	13194813	-	-	2071340	-	-	-	-	-	-	1163729	-	-	-	-	-	-	
21	Heneicosano	35.43	-	-	-	-	-	-	1987701	-	-	-	-	-	-	963944	-	-	-	-	-	-	
30	Tetracosano	40.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1668574	-	-	-	-	-	-	
35	Escualeno	47.68	-	-	-	-	-	-	2981040	-	-	-	-	-	-	5723964	-	-	-	-	-	-	
Esteroles																							
33	Colest-2-eno	41.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2700344	-	-	-	-	-	-	
38	Colesterol	53.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1804867	-	-	-	-	-	-	-	4559708	-	-	

Tabla 7. Caracterización de aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y esteroles en las muestras de sedimentos MA y MD

La gran cantidad de picos registrados dificulta enormemente la separación e identificación de los compuestos presentes en las muestras debido a los límites en la capacidad de separación (resolución) que impone la columna. Los cromatogramas obtenidos de las muestras tienen una gran complejidad y presentan múltiples traslapes así como la coelución de compuestos con tiempos de retención similares. Por otra parte, esta técnica presenta una gran ventaja con respecto al corto tiempo de análisis (3 h aprox.) y puede ser de mucha utilidad para conocer la composición general de sedimentos. En combinación con el monitoreo selectivo de iones (SIM) como técnica de detección en el espectrómetro de masas permitiría la evaluación cuantitativa de los compuestos de mayor interés.

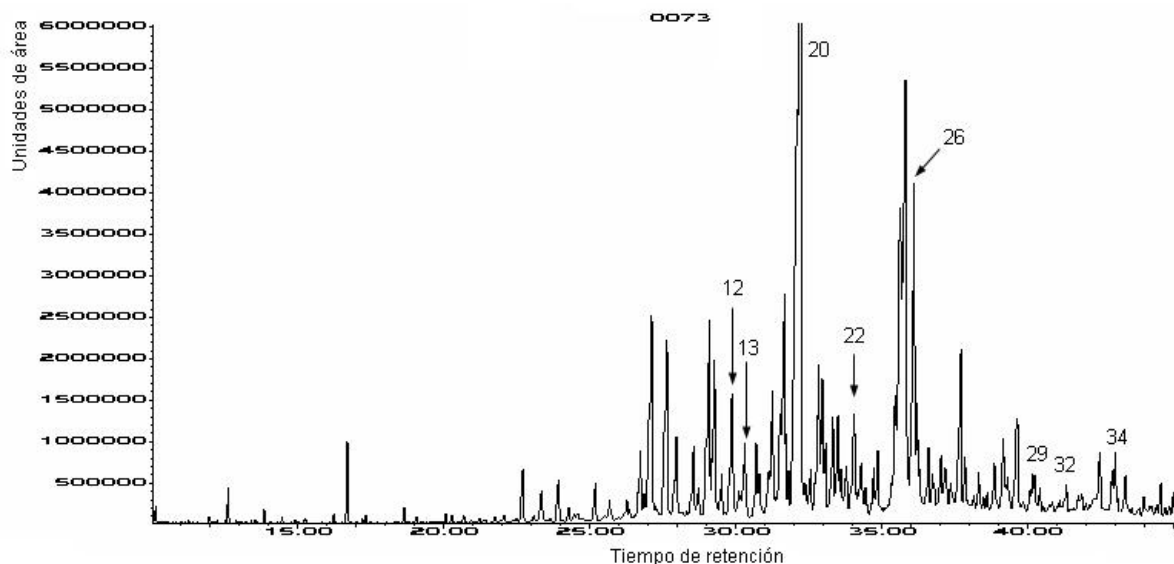


Figura 41. Cromatograma del análisis de sedimento del Extracto lipídico total (ELT) para la muestra de dársena (MD), en él se presentan los compuestos (12) 2,6,10,14-tetrametilhexadecano (fitano), (13) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, (20) ác. hexadecanóico, (22) ác. heptadecanóico, (26) ác. octadecanóico, (29) 4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olido, (32) ác. eicosanóico y (34) ác. docosanóico.

5.3.2 Fracciones Saponificable y No saponificable del extracto lipídico

En las Figuras 42 y 43 se presentan los cromatogramas de la muestra MA en sus fracciones saponificable y no saponificable mientras que para la muestra MD lo están en las Figuras 44 y 45. Puede notarse que los ácidos grasos quedan retenidos principalmente en la fracción saponificable y que existe una limpieza notoria de los cromatogramas de las muestras, con lo que se obtiene una mejor resolución en comparación con los obtenidos por el procedimiento de Extracto lipídico total (ELT).

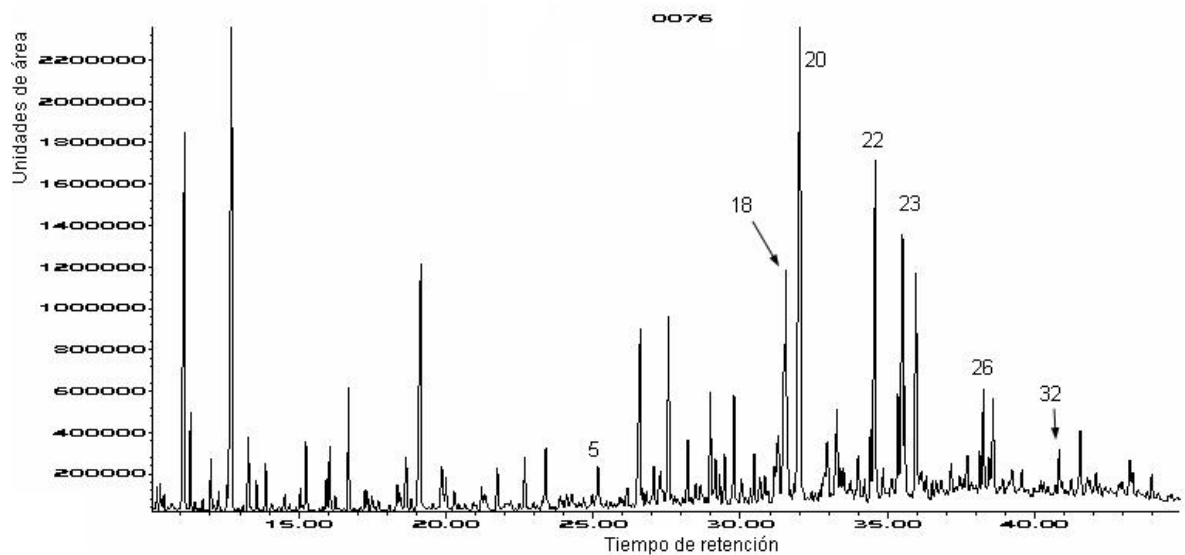


Figura 42. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arena (MA) Fracción saponificable, en él se presentan los compuestos (5) ácido dodecanóico, (18) ácido pentadecanóico, (20) ácido hexadecanóico, (22) ácido heptadecanóico, (23) ácido 9,12-octadecadienóico, (26) ácido octadecanóico y (32) ácido eicosanóico.

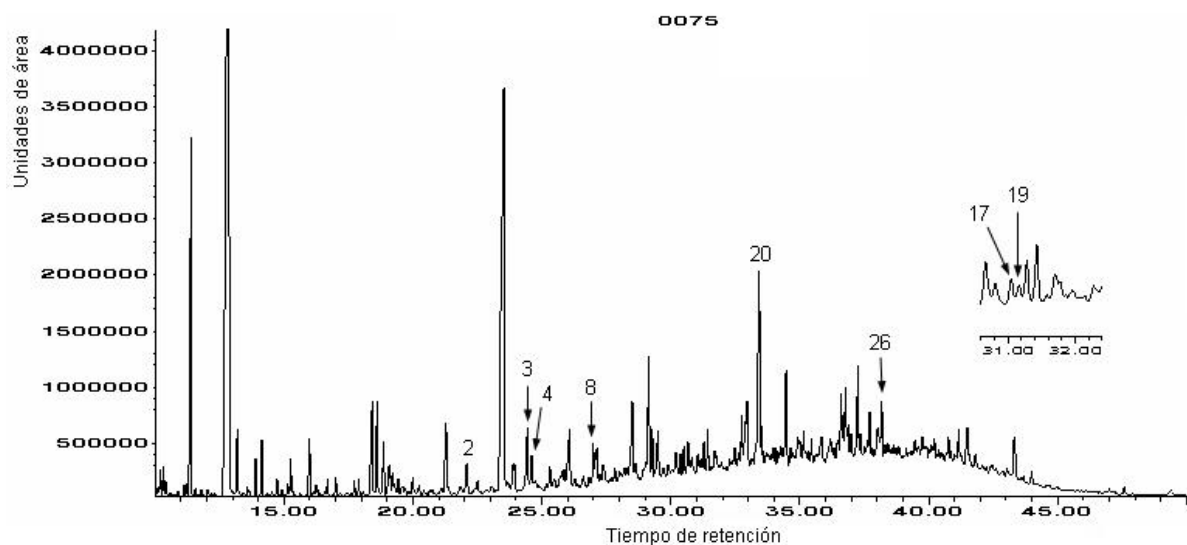


Figura 43. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arena (MA) Fracción No saponificable, en él se presentan los compuestos (2) pentadecano, (3) 1-hexadeceno, (4) hexadecano, (8) heptadecano, (17) nonadecano, (19) eicosano, (20) ácido hexadecanóico y (26) ácido octadecanóico.

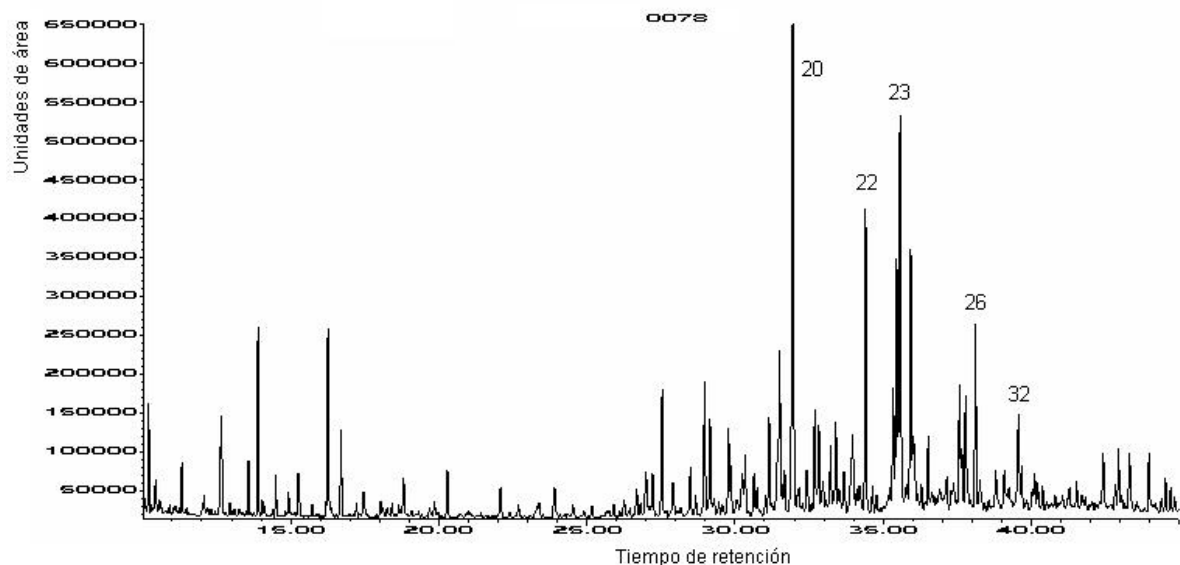


Figura 44. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arsena (MD) Fracción saponificable, en él se presentan los compuestos (20) ác. hexadecanóico, (22) ác. heptadecanóico, (23) ác. 9,12-octadecadienóico, (26) ác. octadecanóico y (32) ác. eicosanóico.

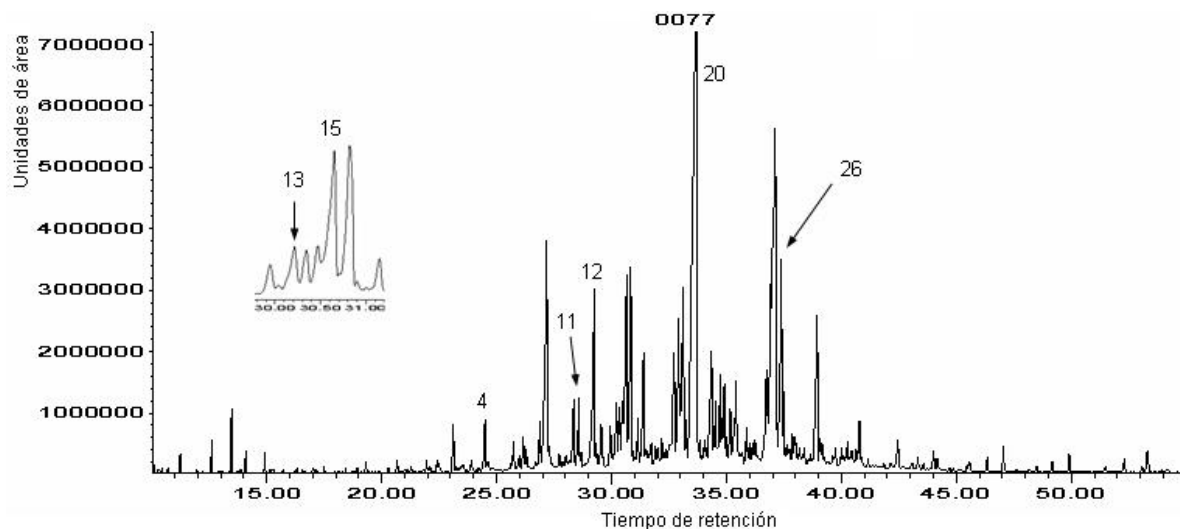


Figura 45. Cromatograma del análisis de sedimento de las Fracciones Saponificable/No saponificable (FSN) para la muestra de arsena (MD) Fracción No saponificable, en él se presentan los compuestos (4) hexadecano, (11) octadecano, (12) 2,6,10,14-tetrametilhexadecano (fitano), (13) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, (15) pentadecanol, (20) ác. hexadecanóico y (26) ác. octadecanóico.

La mayor manipulación de la muestra con este procedimiento introduce numerosas fuentes de error, resultado de diversos factores, entre los que se encuentran los rendimientos de reacción y extracción, y las pérdidas en la separación de las fases y durante

la evaporación de los disolventes. Lo anterior repercute en la recuperación de los analitos y la repetibilidad de los análisis además del aumento en un factor de dos del tiempo en la preparación de la muestra.

5.3.3 Extracción en Fase Sólida (EFS)

El análisis por EFS de las muestras de sedimentos MA y MD se realizó en seis fracciones, cuatro de las cuales lograron aislar compuestos por familias químicas:

Fracción	Principal grupo funcional aislado
A	Hidrocarburos
C	Cetonas
D	Ácidos grasos, alcoholes y esteroides
E	Ácidos grasos

La elución de los componentes de las muestras mantiene un orden en polaridad que permite un análisis apropiado, esto se debe principalmente a que se obtienen cromatogramas más sencillos y con una excelente resolución (Figura 46-53). Es importante mencionar que esta técnica presenta un pequeño problema de coelución con los ácidos grasos en la fracción E (Figuras 52 y 53).

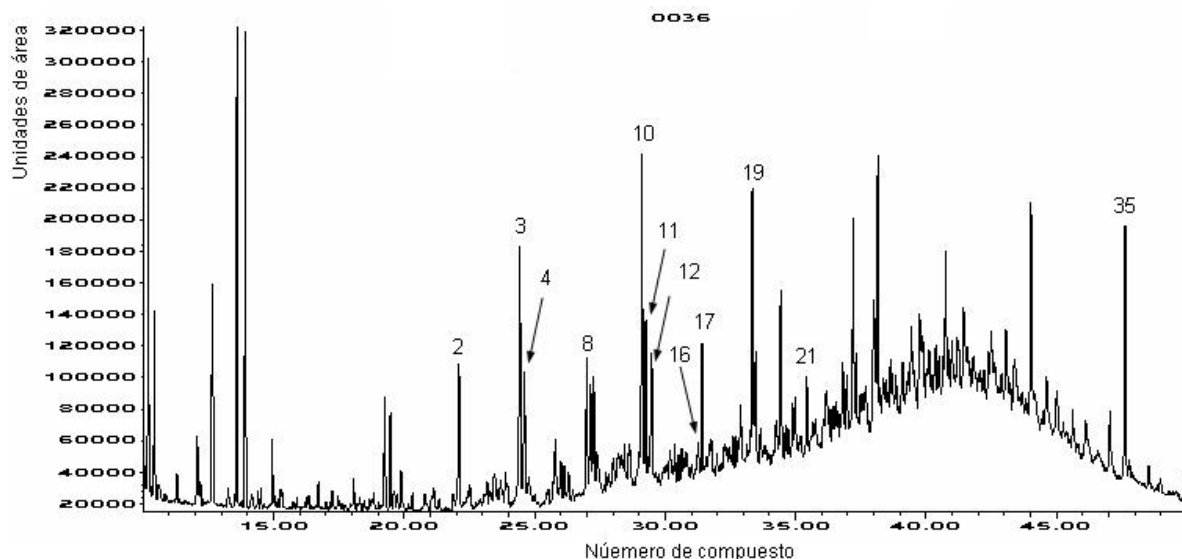


Figura 46. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción A eluida con hexano, se presentan los hidrocarburos (2) pentadecano, (3) 1-hexadeceno, (4) hexadecano, (8) heptadecano, (10) 15-heptadecenal, (11) octadecano, (12) 2,6,10,14-tetrametilhexadecano (fitano), (16) 1-nonadeceno, (17) nonadecano, (19) eicosano, (21) heneicosano y (35) escualeno.

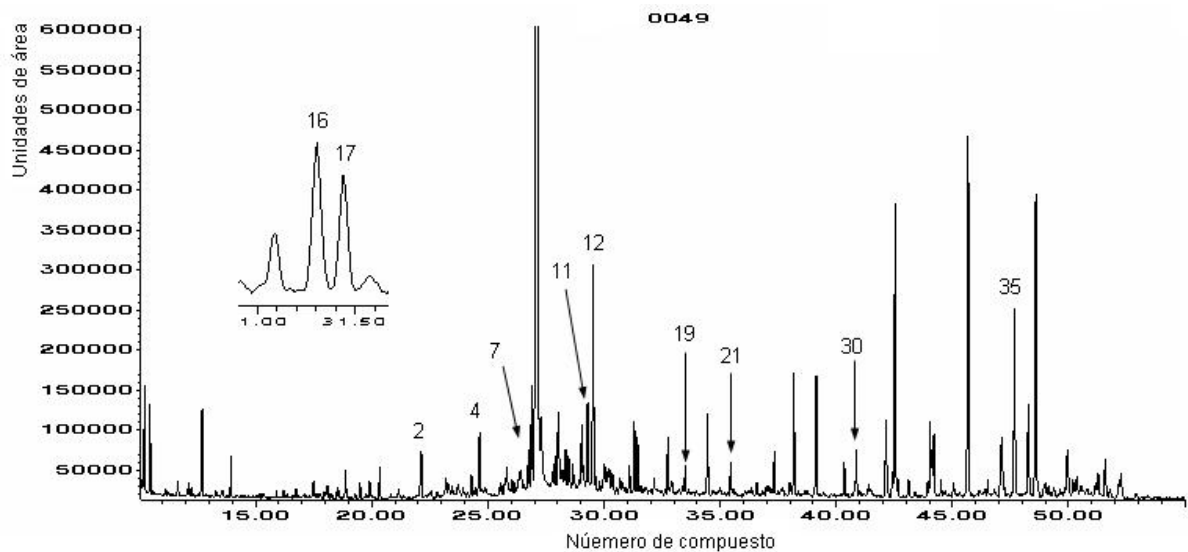


Figura 47. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de dársena (MD) Fracción A eluida con hexano, se presentan los hidrocarburos (2) pentadecano, (4) hexadecano, (7) 8-heptadeceno, (11) octadecano, (12) 2,6,10,14-tetrametilhexadecano (fitano), (16) 1-nonadeceno, (17) nonadecano, (19) eicosano, (21) heneicosano, (30) tetracosano y (35) escualeno.

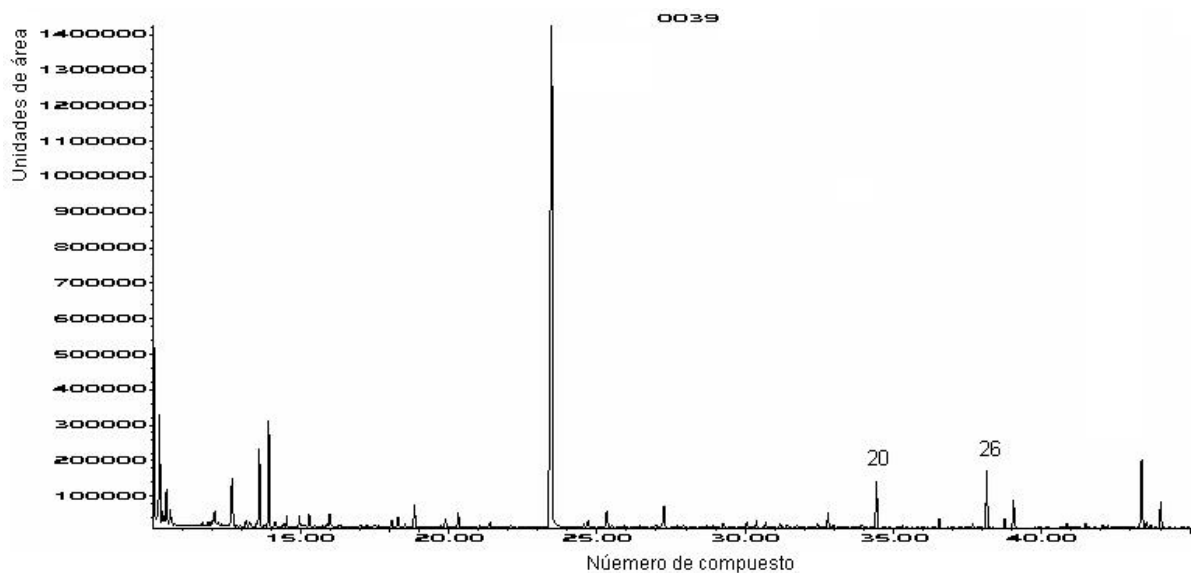


Figura 48. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción C eluida con tolueno/acetato de etilo (95:5), se presentan los compuestos (20) ác. hexadecanóico y (26) ác. octadecanóico.

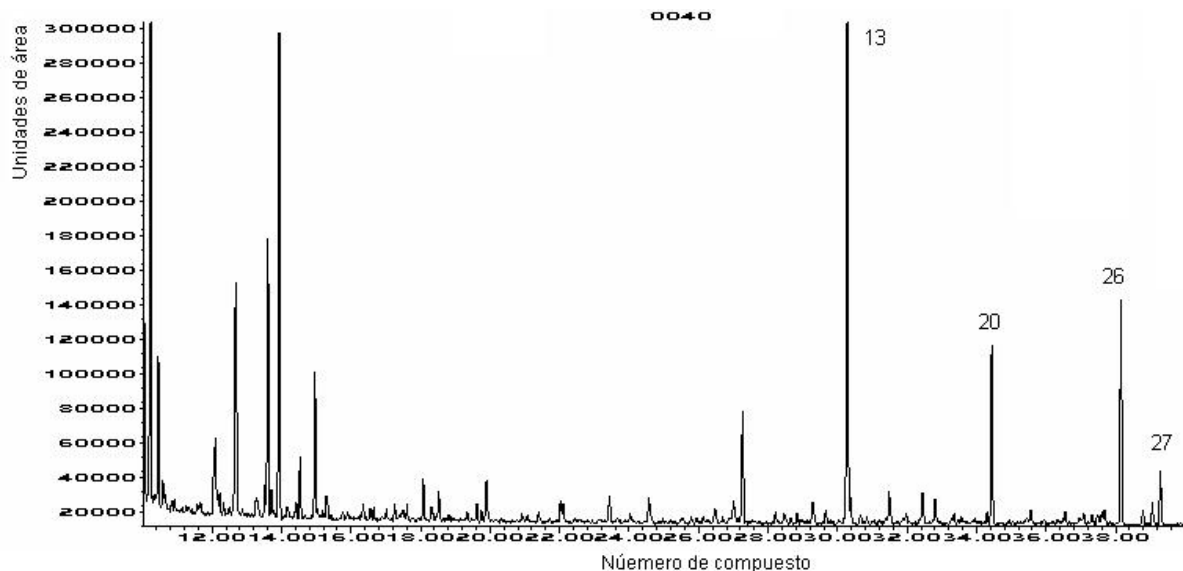


Figura 49. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de dársena (MD) Fracción C eluida con tolueno/acetato de etilo (95:5), se presentan los compuestos (13) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, (20) ác. hexadecanóico, (26) ác. octadecanóico y (27) 2-nonadecanona. (Cetonas).

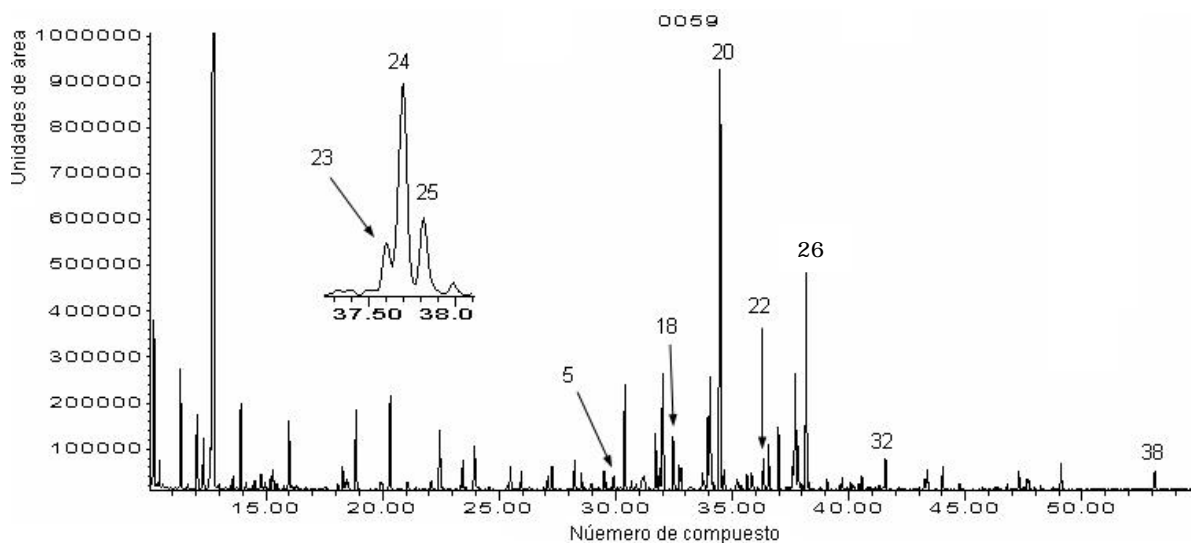


Figura 50. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción D eluida con tolueno/acetato de etilo (3:1), se presentan los compuestos (5) ác. dodecanóico, (18) ác. pentadecanóico, (20) ác. hexadecanóico, (22) ác. heptadecanóico, (23) ác. 9,12-octadecadienóico, (24) ác. 9-octadecenoico, (25) ác. oleico, (26) ác. octadecanóico, (32) ác. eicosanóico y (38) colesterol. (Alcoholes, esteroides y ácido carboxílicos)

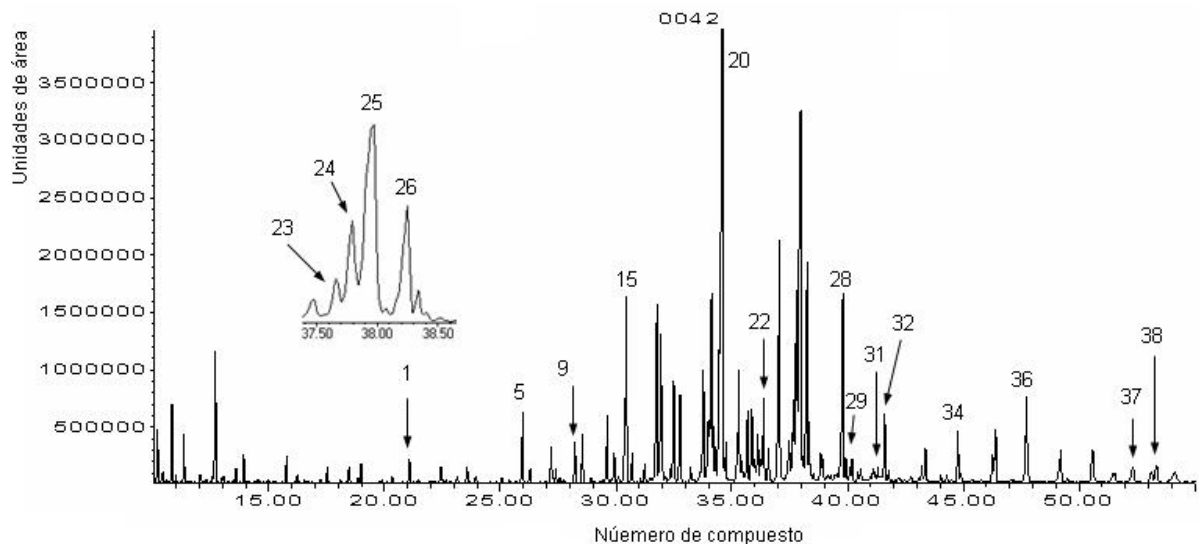


Figura 51. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de dársena (MD) Fracción D eluida con tolueno/acetato de etilo (3:1), se presentan los compuestos (1) ác. decanóico, (5) ác. dodecanóico, (9) ác. tridecanóico, (15) pentadecanol, (20) ác. hexadecanóico, (22) ác. heptadecanóico, (23) ác. 9,12-octadecadienóico, (24) ác. 9-octadecenóico, (25) ác. oleico, (26) ác. octadecanóico, (28) ác. nonadecanóico, (29) 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido, (31) ác. 11-eicosenóico, (32), ác. eicosanóico, (34) ác. docosanóico, (36) ác. tetracosanóico, (37) octacosanol y (38) colesterol. (Alcoholes, esterole y ácido carboxílicos)

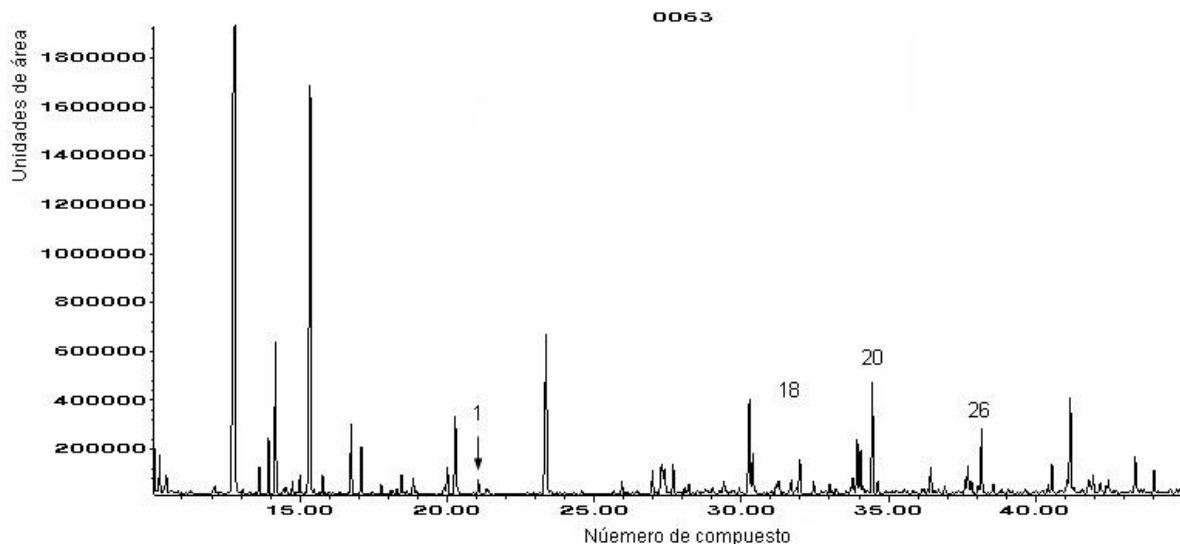


Figura 52. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arena (MA) Fracción E eluida con acetato de etilo (AcOEt), se presentan los compuestos (1) ác. decanóico, (18) ác. pentadecanóico (20) ác. hexadecanóico y (26) ác. octadecanóico. (Ácidos carboxílicos)

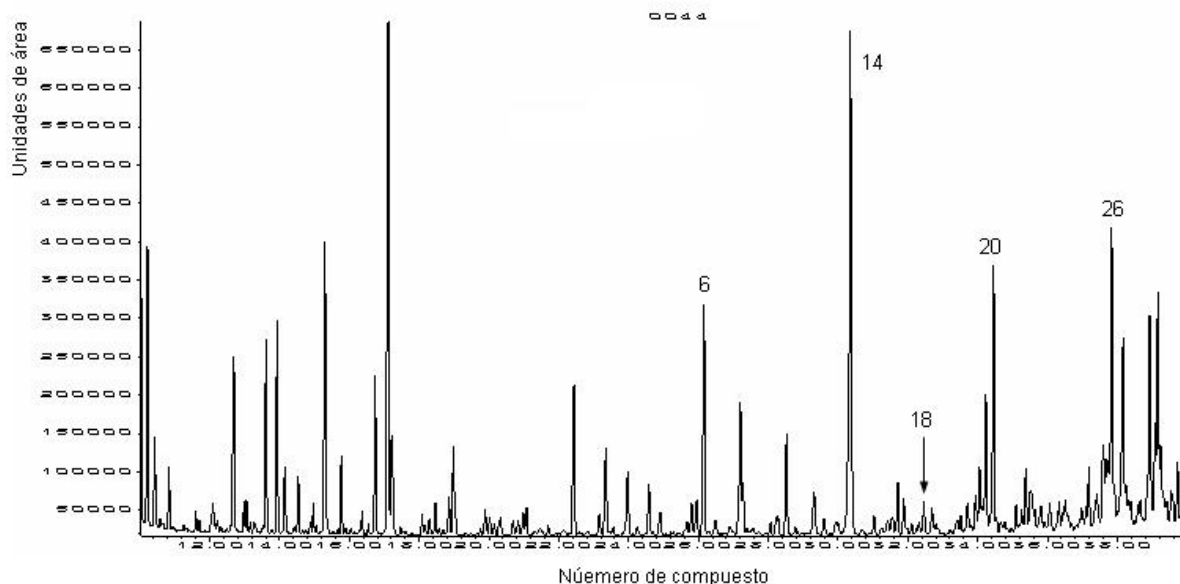


Figura 53. Cromatograma del análisis de sedimento por Extracción en fase sólida (EFS) para la muestra de arsénica (MD) Fracción E eluida con acetato de etilo (AcOEt), se presentan los compuestos (6) ác. 3-hidroxipríico, (14) ác. 3-hidroxiáurico, (18) ác. pentadecanóico, (20) ác. hexadecanóico y (26) ác. octadecanóico. (Ácidos carboxílicos)

La EFS representa una excelente opción para el tratamiento de muestras previo a CG-EM. Razones de esto son: la práctica manipulación de la técnica, las pequeñas cantidades utilizadas de disolventes y de muestra, además de la simplicidad de los cromatogramas obtenidos. La principal objeción para su uso es el tiempo del tratamiento completo de la muestra, pues a pesar de que el fraccionamiento, concentración y derivatización requieren un tiempo similar al procedimiento de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) de 8 horas aproximadamente, debe considerarse que cada muestra se divide en varias fracciones que necesitan de este tratamiento por lo que se eleva el costo de análisis.

5.4 Análisis de resultados por familias químicas para los procedimientos de preparación de muestra

Al utilizar estas metodologías de preparación de muestra se trabajó con volúmenes y alícuotas semejantes para comparar los resultados, sin embargo en EFS las cantidades fueron menores debido a las pequeñas cantidades de muestra que se requieren para esta técnica.

5.4.1 Ácidos grasos

Al graficar los resultados de la Tabla 6, Área Vs. Compuesto se obtienen los diagramas de la Figura 54, los cuales representan el perfil de los ácidos carboxílicos extraídos de las muestras. Se identificaron en total 17 ácidos grasos con longitudes de

cadena de 10 a 24 átomos de carbono no ramificadas de los cuales 13 contienen cadenas saturadas y 4 insaturadas además de detectar 2 β -hidroxiácidos. La muestra de arena (MA) contiene sólo diez de estos ácidos mientras que la muestra de dársena (MD) contiene los diecisiete ácidos identificados.

La distribución de estos compuestos por análisis de Extracto lipídico total (ELT) es similar en ambas muestras: los ácidos mayoritarios corresponden al ácido hexadecanóico (20) seguido del octadecanóico (26). Sin embargo, se observan variaciones en esta distribución en el procedimiento de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) donde el ácido mayoritario corresponde al hexadecanóico (20) seguido del ác. 9,12-Octadecadienóico (23).

5.4.1.1 Muestra de arena (MA)

El tratamiento del Extracto lipídico total (ELT) logra la identificación de cinco ácidos (1, 5, 20, 23 y 26) con áreas que respetan la predominancia del C_{16}^{COOH} sobre los demás componentes. En el tratamiento de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) el número de ácidos identificados aumentó a 7 (5, 18, 20, 22, 23, 26, y 32) la distribución original cambia: los compuestos mayoritarios corresponden a los ácidos hexadecanóico (20) seguido del ác. 9,12-Octadecadienóico (23) y sus áreas registradas son de aproximadamente la mitad que las del C_{18}^{COOH} en el análisis anterior (Figuras 40 y 42). La pérdida del ácido decanóico (1) se debe posiblemente a que por ser el compuesto más corto de la serie ácida identificada, es el compuesto con mayor polaridad y por tanto, mayor afinidad con el agua de lavado que se empleó para limpiar las muestras por este procedimiento.

El análisis por EFS muestra un mayor número de picos al aumentar a 10 los ácidos identificados (1, 5, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, y 32). A pesar de tener áreas muy pequeñas, se logra obtener un cromatograma muy limpio que conserva la distribución del análisis del Extracto lipídico total (ELT), donde los ácidos mayoritarios corresponden, de forma decreciente, a los ácidos hexadecanóico (20) y octadecanóico (26) (Figura 54).

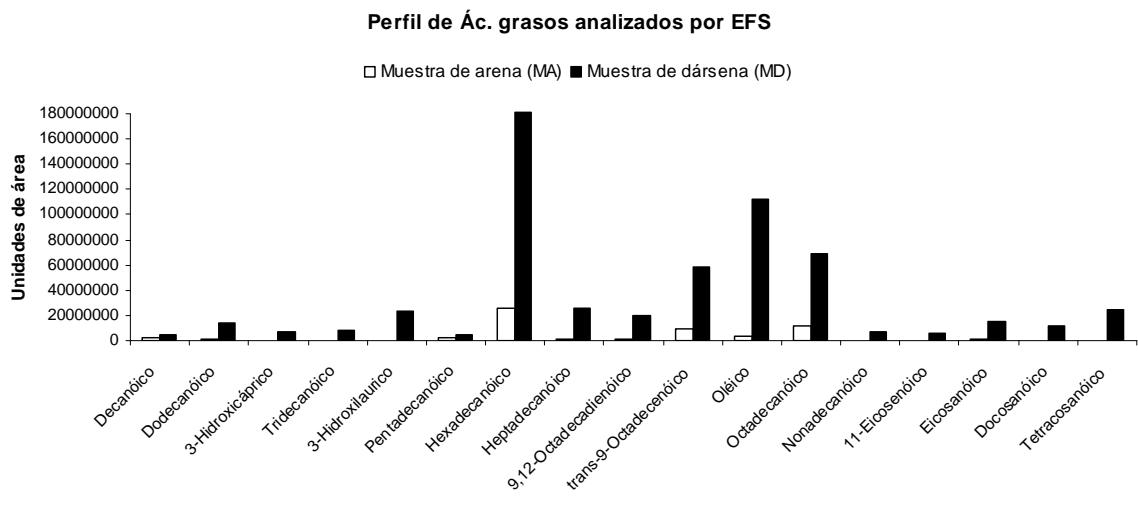
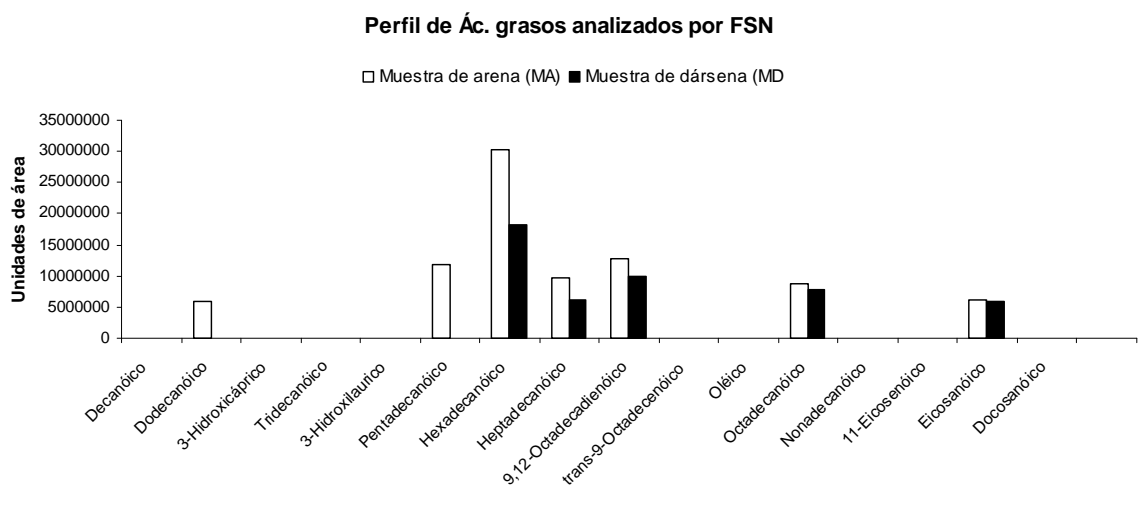
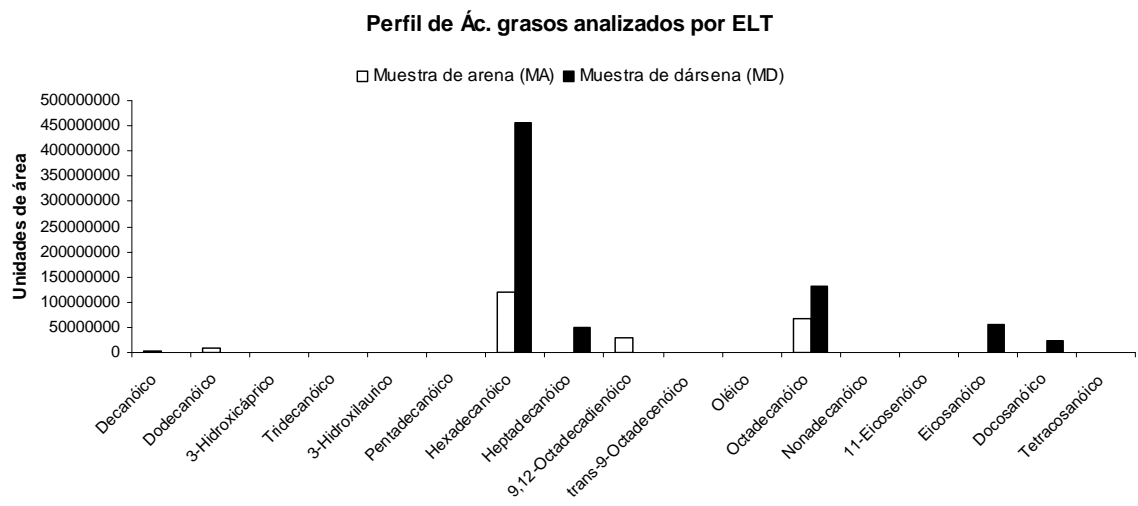


Figura 54. Perfil de ácidos grasos para las muestras MA y MD por cada uno de los procedimientos

5.4.1.2 Muestra de dársena (MD)

Se consiguió identificar por el procedimiento de Extracto lipídico total (ELT) a cinco ácidos (20, 22, 26, 32 y 34) con la misma distribución, siendo el más abundante el C_{16}^{COOH} (20) seguido del C_{18}^{COOH} (26).

En el estudio de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) se mantiene el mismo número de compuestos ácidos identificados sólo que se pierde el ác. n-docosanóico (posiblemente por tener una área muy pequeña) y se detecta al ác. 9,12-octadecadienóico (23). No obstante, ocurre algo muy similar que en la muestra de arena (MA) pues cambia el perfil de los ácidos carboxílicos. Los compuestos principales corresponden al C_{16}^{COOH} y al ác. 9,12-octadecadienóico.

La muestra de dársena (MD) presenta por EFS diecisiete ácidos carboxílicos, lo cual indica que la aplicación de esta técnica es necesaria para el análisis de este sedimento. La distribución de los compuestos es similar a las anteriores con un ligero pero importante cambio: el ácido principal corresponde al C_{16}^{COOH} (20) seguido del ác. oleico (25).

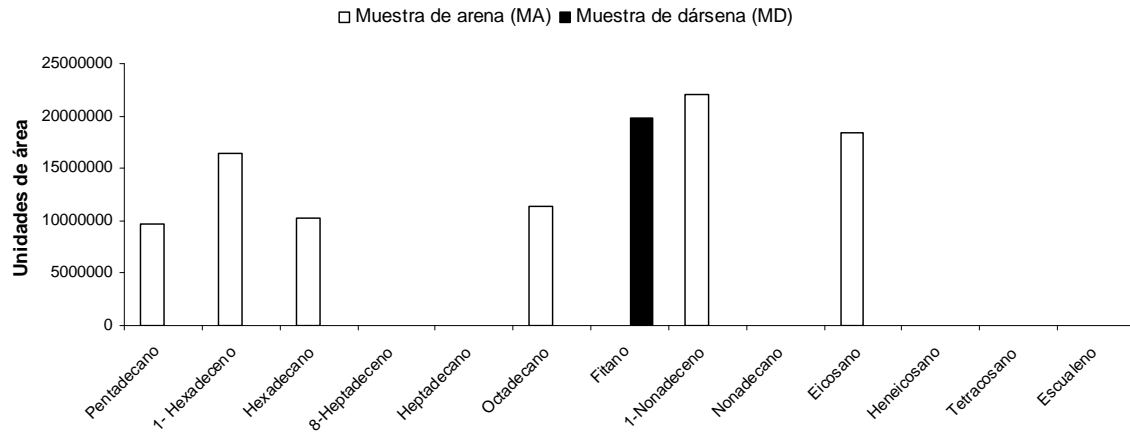
Es de notarse que en el análisis de la muestra de arena (MA) por EFS se logró identificar el doble de compuestos que por el tratamiento de Extracto lipídico total (ELT), esto se debe a que disminuyó considerablemente la complejidad de los cromatogramas al eliminar componentes en las mezclas que interfieren con la caracterización de los ácidos. Lo mismo sucede para la muestra de dársena (MD) pues el análisis de su Extracto lipídico total (ELT) detecta tal cantidad de picos, que es imposible identificar a la mayoría de los ácidos que se presentan con menor área como los componentes 1 y 5.

5.4.2 Hidrocarburos

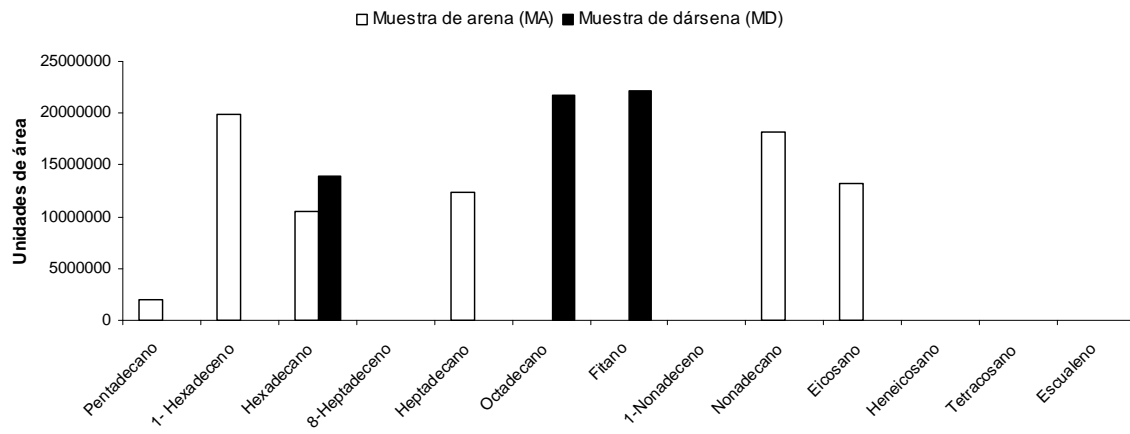
Los hidrocarburos extraídos y analizados en las muestras se representan en los gráficos de la Figura 55. Puede observarse que la distribución de esta familia química es similar.

Dentro de los compuestos caracterizados, se encuentran trece hidrocarburos, con cadenas de longitudes de 15 a 24 carbonos, de los cuales, ocho poseen cadenas saturadas y cinco insaturadas. Los compuestos mayoritarios varían de acuerdo al tipo de muestra, para la muestra de arena (MA) son el 1- hexadeceno (3) y el 1- nonadeceno (16) mientras que para la muestra de dársena (MD) son el 2, 6, 10, 14-tetrametilhexadecano (12) y el escualeno (35). La ausencia de los hidrocarburos en algunas técnicas se debe principalmente a que, como son compuestos que se presentan en muy pequeñas cantidades en sedimentos, frecuentemente sus picos se traslapan completamente con compuestos con tiempos de retención cercanos presentes en cantidades mayores.

Perfil de Hidrocarburos analizados por ELT



Perfil de Hidrocarburos analizados por FSN



Perfil de Hidrocarburos analizados por EFS

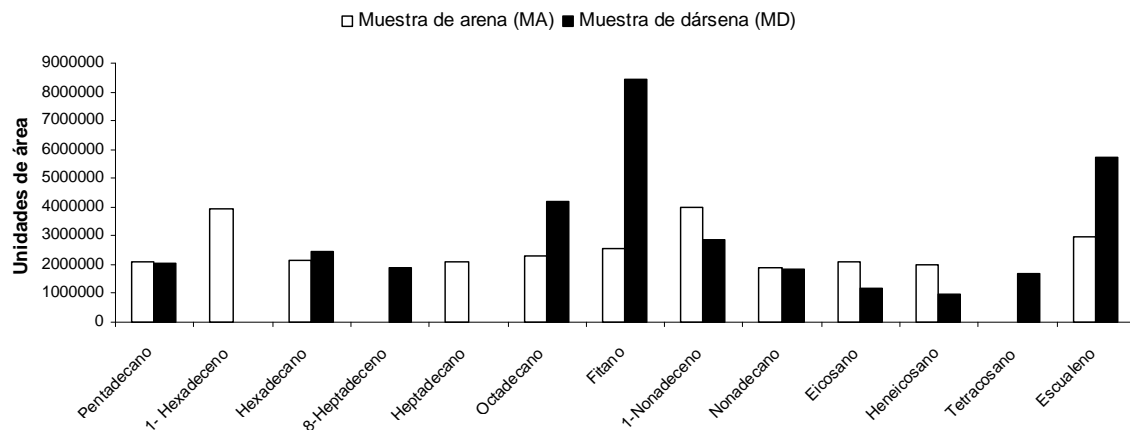


Figura 55. Perfil de hidrocarburos para las muestras MA y MD por cada uno de los procedimientos

5.4.2.1 Muestra de arena (MA)

En el tratamiento del Extracto lipídico total (ELT) se identifican seis hidrocarburos (2, 3, 4, 11, 16 y 19) con cadenas lineales entre 15 y 20 átomos de carbono. Los compuestos mayoritarios corresponden al 1-nonadeceno (16), eicosano (20) y 1-hexadeceno (3).

Se identifican de las Fracción Saponificable y No saponificable (FSN) seis componentes de esta familia (2, 3, 4, 8, 17 y 19) que cambian con la distribución de hidrocarburos obtenida del Extracto lipídico total (ELT); pese a esto, la mayoría de los compuestos presentan áreas muy parecidas. Los compuestos mayoritarios son el 1-hexadeceno (3) y el nonadecano (17). La pérdida del compuesto 16 y la identificación del 17 se debe posiblemente al solapamiento de sus picos (cromatograma Figura 43) causada por la cercanía de sus tiempos de retención. Por esta técnica se pudo identificar al heptadecano (8) pero se pierde al octadecano (11) debido posiblemente a la poca resolución de los picos causada por la interferencia de compuestos con tiempos de retención similares.

Puede demostrarse la utilidad de la EFS en el análisis de hidrocarburos para esta muestra ya que el número de compuestos identificados asciende a once (2, 3, 4, 8, 11, 12, 16, 17, 19, 21 y 35) (Figura 46). Existe una tendencia hacia los hidrocarburos saturados, sin embargo los compuestos de mayor proporción son de cadena insaturada: el 1-hexadeceno (3) y el 1-nonadeceno (16). De entre los hidrocarburos que no se detectaron con los procedimientos anteriores se encuentra el escualeno (35) que ocupa el tercer sitio en proporción.

5.4.2.2 Muestra de darsena (MD)

A partir del cromatograma del Extracto lipídico total (ELT) sólo se logra identificar un hidrocarburo de cadena saturada y muy ramificada: el 2, 6, 10, 14-tetrametilhexadecano (12). La aplicación del procedimiento de Fracción Saponificable y No saponificable (FSN) permite la detección de sólo dos compuestos más: el hexadecano (4) y el octadecano (11) (Figura 54). Con el uso de EFS se consigue la identificación de once hidrocarburos (2, 7, 16, 17, 19, 21, 30 y 35) que sostienen una distribución bimodal donde los compuestos mayoritarios son el 12 y el 35.

Con la caracterización de hidrocarburos se permite comparar la utilidad de los tratamientos de muestra previos al análisis cromatográficos. El fraccionamiento por EFS permite alcanzar una excelente resolución de picos así como una gran sencillez en los cromatogramas.

5.4.3 Aldehídos, cetonas, alcoholes y esteroides

El análisis de compuestos con otros grupos funcionales se dificultó principalmente por la baja proporción en la que se encuentran. Sus pequeñas áreas fueron difícilmente

separadas de compuestos interferentes, por lo que se necesitó de una técnica como la de EFS para concentrar y purificar los analitos de tal modo que pudieran detectarse en cantidades apreciables.

Se logró la identificación de un aldehído de cadena insaturada sin ramificaciones [E-15-Heptadecenal (10)], dos cetonas con cadenas saturadas con números de carbono impar [la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (13) y la 2-nonadecanona (27)], una lactona [el 4,8,12,16-tetrametil heptadecan-4-olido (29)], dos alcoholes lineales saturados sin ramificaciones [n-pentadecanol (15) y n-octacosanol (37)] y dos esteroides [colest-2-eno (33) y colesterol (38)].

5.4.3.1 Muestra de arena (MA)

A través de los análisis del Extracto lipídico total (ELT) y de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) (Figura 56) no logra identificarse alguno de estos compuestos, pese a ello, con el uso de EFS se alcanzan a caracterizar el 15-heptadecenal (10) como compuesto mayoritario y al colesterol (38).

5.4.3.2 Muestra de dársena (MD)

Empleando el análisis del Extracto lipídico total (ELT, Figura 56) sólo se logra identificar la 6, 10,14-trimetil-2-pentadecanona (13) como compuesto mayoritario de las cetonas y el ácido homofitánico γ -lactona [4, 8, 12,16-tetrametil heptadecan-4-olido (29)]. Mediante el estudio de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) la distribución se modifica al sólo poder identificar al compuesto 13 (como mayoritario) y al n-pentadecanol (15).

La utilidad de la EFS permite la identificación de siete de estos compuestos en la muestra (13, 15, 27, 29, 33, 37 y 38) manteniendo al compuesto 13 como principal elemento de la mezcla seguido del n-pentadecanol (15) en abundancia.

5.5 Interpretación de la composición química

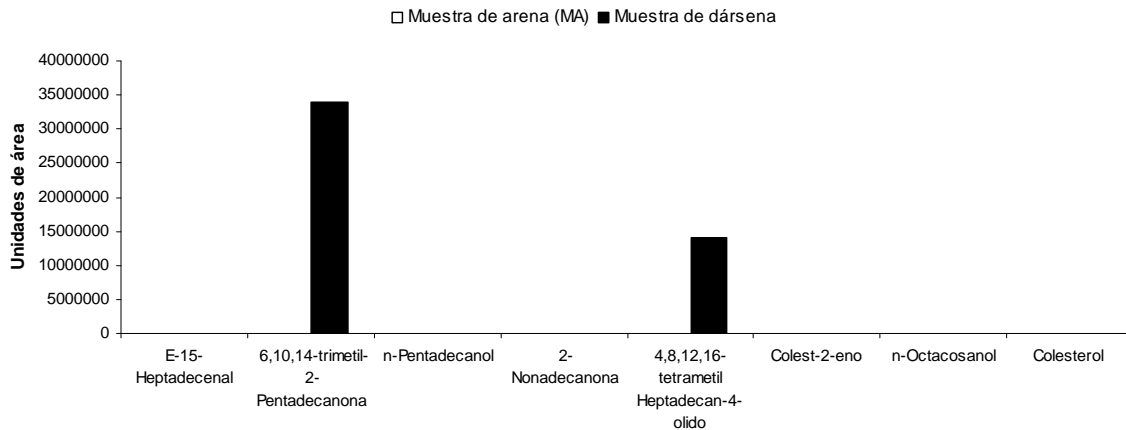
A continuación se analiza el significado de la distribución de los compuestos y se presentan aquellos que tienen un origen propio, principalmente bioquímico, que nos describe algunas características de gran importancia sobre su medioambiente.

5.5.1 Ácidos grasos

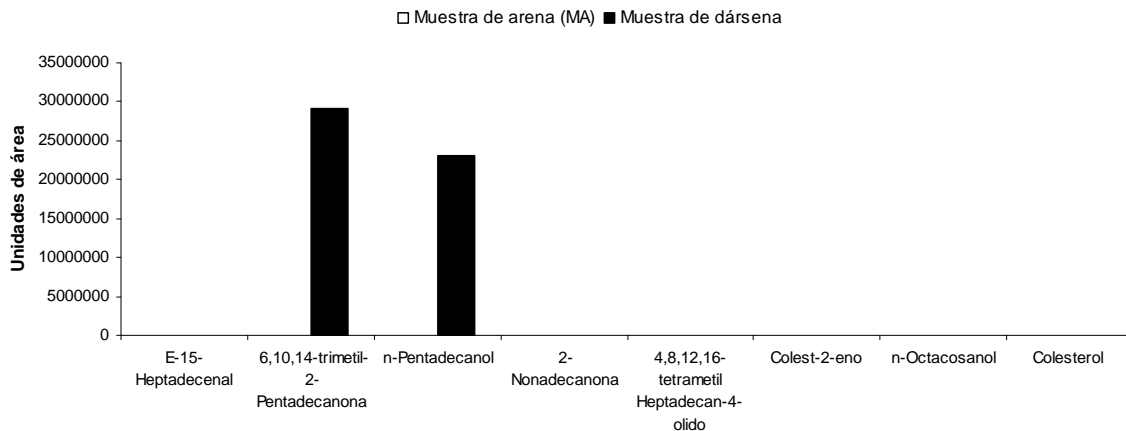
5.5.1.1 Muestra de arena (MA)

Los ácidos mayoritarios corresponden a C_{18}^{COOH} y C_{16}^{COOH} en orden creciente. Esta repartición se debe a que son componentes muy abundantes en las membranas lipídicas y tejidos adiposos de todos los animales, es por ello que la distribución de los ácidos con un $C_{max}= 16$ con predominancia en carbonos pares así como la presencia de ácidos en un intervalo de C_{10} a C_{22} con estructuras lineales poco ramificadas, con una o más insaturaciones, puede atribuírseles un origen acuático, principalmente de plancton.

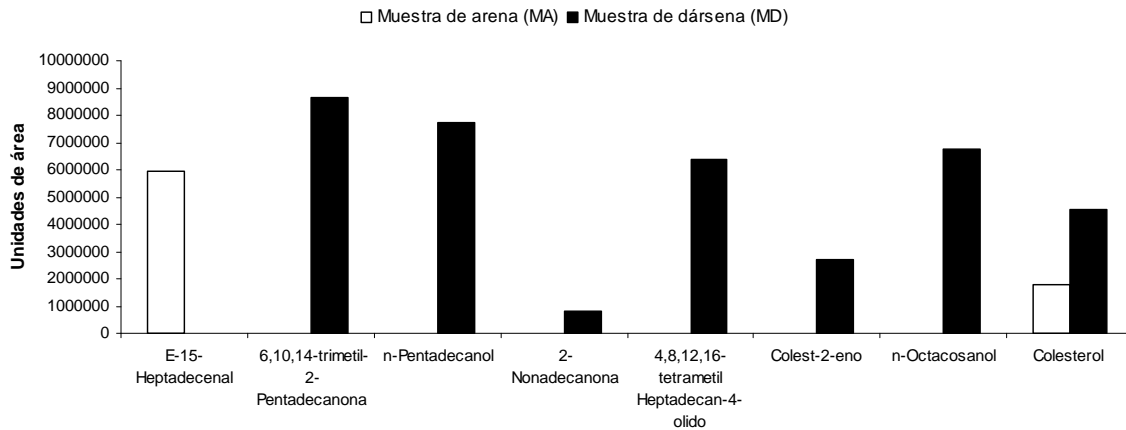
Perfil de aldehidos, cetonas, alcoholes y esteroides analizados por ELT



Perfil de aldehidos, cetonas, alcoholes y esteroides analizados por FSN



Perfil de aldehidos, cetonas, alcoholes y esteroides analizados por EFS



5.5.1.2 Muestra de dársena (MD)

En esta muestra la distribución de los ácidos es también común, pues mantiene un $C_{\max}=16$, que es algo que se reporta en la mayoría de las referencias, sin embargo, mantiene una fuerte preferencia de carbonos pares en el mismo intervalo de C_{10} a C_{22} con estructuras poco ramificadas y con pocas insaturaciones lo cual indica un origen acuático principalmente. Debe notarse que se presenta un ácido de cadena larga de C_{24}^{COOH} que puede indicar un aporte terrestre.

5.5.2 Hidrocarburos

5.5.2.1 Muestra de arena (MA)

Se detecta la presencia de fitano (2, 6, 10,14-tetrametilhexadecano) el cual debe su origen del fitol en condiciones oxidantes, por lo cual podría indicarnos que en la arena se mantiene un ambiente oxidante, favoreciéndose la oxidación por acción de la luz solar. La distribución de los hidrocarburos saturados mantiene una $C_{\max}=18$ con compuestos en el intervalo de C_{15} a C_{21} y una relación de carbono par/impar muy similar, lo que puede deberse a un origen de plantas de bajo nivel organizacional como las algas acuáticas. Sin embargo se presentan hidrocarburos con una insaturación en el intervalo de C_{13} a C_{31} con una $C_{\max}=16$, los cuáles se presentan en mayor proporción que los hidrocarburos saturados, lo que podría sugerir un aporte terrestre.

5.5.2.2 Muestra de dársena (MD)

Se encuentra el fitano como compuesto mayoritario pues se presenta con una concentración de casi el doble que en la muestra de arena, hecho que puede indicar una fuerte condición oxidante en este sedimento. A diferencia de la MA, se presentan el C_{15} y del C_{17} de forma decreciente lo que podemos atribuir a la presencia de fitoplancton. La distribución de los demás hidrocarburos, con una relación par/impar también similar, en un intervalo de C_{17} a C_{21} podría indicarnos que el aporte de estos compuestos es debido a algas acuáticas.

5.5.3 Alcoholes

5.5.3.1 Muestra de arena (MA)

No se presenta ningún alcohol en cantidad detectable

5.5.3.2 Muestra de dársena (MD)

Se detectan de alcoholes, el n-pentadecanol y el n-octacosanol, ambos en concentraciones muy parecidas. Estos podría deber su origen a plantas superiores terrestres.

5.5.4 Aldehídos y cetonas

5.5.4.1 Muestra de arena (MA)

Puede detectarse el 15-heptadecenal en una pequeña concentración. Su origen es incierto.

5.5.4.2 Muestra de dársena (MD)

Se detectan tres compuestos interesantes: la 2-nonadecanona, la fitona (6,10,14-trimetil pentadeca-2-ona) y el ácido homofitánico γ -lactona (4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido). El origen de las cetonas en sedimentos se debe principalmente a la degradación oxidativa del fitol. De la 2-nonadecanona se podría inferir su origen, al igual que el de la fitona, por la oxidación del fitol. En el caso de ácido homofitánico γ -lactona, su origen se debe a la oxidación del α -tocoferol (vitamina E). Estos tres compuestos son por tanto, indicadores de la diagénesis óxica.

5.6 Compuestos resueltos por los procedimientos de preparación de muestra

La utilidad de las técnicas de preparación de muestra en la separación e identificación de compuestos presentes en los sedimento se puede comparar de forma cualitativa por el número de analitos aislados por cada metodología. (Figura 57)

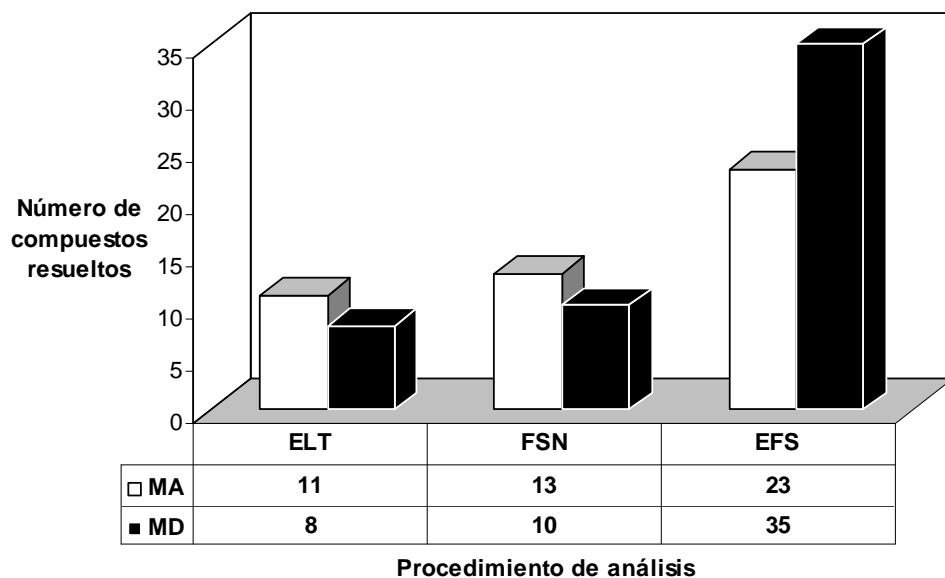


Figura 57. Comparación del número de compuestos resueltos por los diferentes procedimientos de análisis.

El número de compuestos que se resuelven e identifican con una certidumbre mayor al 90% aumenta del procedimiento de Extracto lipídico total (ELT) a la EFS en ambas muestras. Es de esperarse que, por el número de picos registrados en la muestra de darsena (MD), al aumentar la eficiencia de la separación de analitos también aumente el número de compuestos analizados. Puede entonces observarse que la EFS como técnica de preparación aporta mayores beneficios al análisis cromatográfico debido principalmente a la limpieza y concentración de las muestras (ya que aumenta la resolución de los cromatogramas) en comparación con los procedimientos de Extracto lipídico total (ELT) y de Fracción Saponificable y No saponificable (FSN).

6 CONCLUSIONES

1. El análisis y caracterización de la materia orgánica en sedimentos de la dársena del puerto de abrigo y de la arena de playa, reveló la existencia de un gran número de compuestos presentes en las muestras. Muchos de estos compuestos nos ayudaron a interpretar el posible origen y significado de su presencia en el sedimento.
2. El uso del análisis del Extracto lipídico total (ELT) permite un adecuado y rápido análisis para obtener información general del contenido de las muestras, sin embargo se presentan una gran cantidad de picos pobremente resueltos lo que dificulta mucho su cuantificación, principalmente por la obtención de espectros de masas de más de un compuesto.
3. El procedimiento de las Fracciones Saponificable y No saponificable (FSN) presenta ventajas en la resolución de los picos cromatográficos y una mayor claridad en el análisis, sin embargo la complicada manipulación técnica dificulta la recuperación de algunos analitos provocando inclusive su pérdida.
4. La EFS representa una técnica con mejoras sustanciales sobre las metodologías anteriores, en manipulación, en recuperación de analitos y principalmente en la limpieza y concentración de las muestras que permite una mayor claridad y resolución de los cromatogramas obtenidos de las muestras. Es por tal motivo que su uso en la determinación de biomarcadores en sedimentos proporciona mayores beneficios que los procedimientos anteriores, sin embargo el largo tiempo de análisis es un factor que limita su uso debido principalmente al incremento del costo por análisis.
5. Más de 100 compuestos detectados y cerca de 40 posibles compuestos con utilidad de biomarcadores (clasificados en 7 grupos funcionales, de las cuales los ácidos grasos y los hidrocarburos son los más abundantes) representan un extenso análisis que nos ayudó a obtener más información de los sedimentos. El uso de ácidos grasos (C_{16} y C_{18}) en ambas muestras, permitió estimar que el principal origen de la materia orgánica es esencialmente acuático, específicamente de plancton.
6. La relación de las áreas de los hidrocarburos presentes en ambas muestras, permitió establecer una distribución de saturados con un $C_{max}=16$ en el intervalo de C_{15} a C_{21} y una relación de carbono par/impar muy similar, lo que podría indicar que su origen es debido a plantas de bajo nivel organizacional como las algas acuáticas. El fitano, también presente en las muestras, podría indicar un ambiente oxidante. La presencia de alcoholes sólo en la muestra de dársena (MD) podrían deber su origen a plantas superiores terrestres

8 BIBLIOGRAFÍA

1. *Temas de química oceanográfica*, Servicio de publicaciones, Universidad de Cádiz, UNED, (2000).
2. Libes S.M. (1992) *An introduction to marine biogeochemistry*, John Wiley & Sons, Inc, New York, 734 p.
3. Millero F.J. (1996) *Chemical Oceanography*, CRC press, Inc. 531 p.
4. Harris E., *Análisis químico cuantitativo*, 2ª edición, Reverté, Barcelona 2001, 969 p.
5. Horne R.A. (1969) *Marine Chemistry*, Wiley-Interscience, New York, 568 p
6. Parrish C.C. et al. (2000) *The handbook of environmental chemistry*, Vol. 5 Part D. *Marine Chemistry* 193:223
7. García J.A. et al. *Rev. Soc. Quím. Méx.* Vol. 43, Núm. 1 (1999)
8. Guerrero H.M. *Biomarcadores en sedimentos de superficie de la sonda de Campeche*, Tesis UNAM, 2005.
9. Hudson E.D. et al. *Marine Chemistry* 76 (2001) 253-270.
10. Marlow J.R. (2001) *Ocean Drilling Program*, Scientific Results, Vol. 175, 1-26
11. Morrison R.T. y R.N. Boyd, *Química orgánica*, 5ª edición, Addison Wesley Longman de México, 1998, 1447 p.
12. Stuart G. et al. *Deep-Sea research II* 44 (1997) 2131-2162
13. Voet D, *Bioquímica*, Omega, Barcelona, 1992, 1315 p.
14. Prahl F.G. et al. *Deep-Sea research I* 48 (2001) 515-528
15. Belicka L.L. et al. *Deep-Sea Research I* 49 (2002) 1463-1483
16. Simon W. y S. Jeffrey. *Handbook of Environment Chemistry* Vol. 2 Part. N (2006) 71-104
17. Sikes E.L et al. *Deep-Sea research I* 52 (2005) 721-748
18. Ternois Y. et al. *Deep-Sea research I* 44 (1997) 271-286
19. Harada N. et al. *Deep-Sea research I* 48 (2001) 891-907
20. Jaffé R. et al. *I Chemosphere* 64 (2006) 1870-1884
21. Conte M.H. et al. *Deep-Sea research I* 40 (1993) 1935-1961
22. Téllez M.J, *Separación de familias de compuestos del aceite crudo utilizando extracción en fase sólida*, Tesis UNAM, 2002.
23. Berrueta L. et al. *Chromatographia* Vol. 40, No. 7/8 (1995) 474-483
24. Hühnerfuss H. y R. Kallenborn. *Journal of Chromatography*, 580 (1992) 191-214
25. Pietrzyk D. y C. Frank, *Química Analítica*, 1ª edición, Ed. Interamericana, México, 1982, 671 pág.
26. Huetos O, *Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas*, Tesis Universidad Complutense de Madrid, 2004.
27. Catálogo de productos para cromatografía, SUPELCO, 1999
28. Peña A. et al. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 19 1 (2003) 13-23
29. Belicka L. et al, *Marine Chemistry* 86 (2004) 65-68
30. Bendle J. et al, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70 (2006) 13-26
31. Biesen G. y C. Parrish, *Marine Environmental Research* 60 (2005) 375-388

Bibliografía

32. Birgel D. et al, *Marine Chemistry* 88 (2004) 127-160
33. Carsten J. y S. Ruediger, *Marine Geology* 138 (1997) 11-25
34. Gogou A. y E. Stephanou, *Marine Chemistry* 85 (2004) 1-25
35. Hudson E. et al, *Marine Chemistry* 76 (2001) 253-270
36. Mudge S. y C. Duce, *Environmental Pollution* 136 (2005) 209-220
37. Naraoka H. y R. Ishiwatari, *Marine Geology* 165 (2000) 23-36
38. Nash D. et al, *Water Research* 39 (2005) 2964-2978
39. Russell M. y A. Melé, *Global and Planetary Change* 46 (2005) 45-56
40. Ternois. Y. et al, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65 (2001) Núm. 5, 791-802
41. Tolosa I. et al, *Journal of Sea Research* 54 (2005) 125-142
42. Uchida M. et al, *Chemical Geology* 218 (2005) 73-89
43. Wakeham S. et al, *Chemical Geology* 205 (2004) 427-442
44. Yunker M. et al, *Deep-Sea Research II* 52 (2005) 3478-3508
45. Zhang Z. et al, *Quaternary Science Reviews* 25 (2006) 575-594