

METODOLOGIA ANALITICA PARA EL ANALISIS DE BIOMARCADORES TERPANOS Y ESTERANOS EN MUESTRAS DE CRUDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Analytical methodology for the analysis of terpan and steran biomarkers in crude samples by means of gaseous chromatography coupled to mass spectrometry.

Roberto Oropesa Rodríguez^a, Alicia Romero Hernández^a, Zulema Domínguez^a, Ana Núñez Clemente^a, Octavio del Sol Ortega^a

^a Centro de Investigación del Petróleo, Calle Churruca No.481 e/Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba, oropesa@ceinpet.cupet.cu

Recibido: 26 de febrero de 2020.

Aceptado: 19 de mayo de 2020.

RESUMEN

Los biomarcadores se derivan de precursores moleculares que formaban parte de diferentes organismos vivos que habitaban el planeta hace millones de años como bacterias, hongos, algas, plancton, líquenes, musgos, helechos y otras plantas superiores. La cantidad de biomarcadores presentes en este mineral es pequeña y debido a la alta estabilidad de sus estructuras químicas, constituyen testigos arqueológicos del proceso de formación y transformación del mismo. En base a la composición tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas-testigo es posible conocer el grado de alteración, el ambiente de deposición (terrestre, lacustre, marino o mezcla) y consecuentemente sobre la materia orgánica involucrada en el proceso. Además, es posible realizar estudios ambientales, forenses y del comportamiento de los reservorios de hidrocarburos. El objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar una metodología analítica para obtener la distribución de los biomarcadores saturados terpanos y esteranos mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. A partir de los cromatogramas iónicos extraídos se identificaron e integraron los picos de 37 compuestos del grupo de los terpanos y 19 compuestos del de los esteranos. La distribución de ellos se adquirió a través de los iones diagnósticos m/z 191, m/z 217 y m/z 218. La repetibilidad, precisión intermedia y las desviaciones estándares relativas fueron inferiores al 5 % lo que demuestra que los resultados están en concordancia con los criterios de calidad establecidos para métodos cromatográficos análogos.

Palabras clave: biomarcadores; cromatografía gaseosa; terpanos; esteranos; fracción de crudo.

ABSTRACT

Biomarkers are complex molecules derived from formerly living organisms such as bacteria, fungi, algae, plankton, lichens, mosses, ferns and other higher plants. Biomarker concentrations are relatively low in oil and due to the high stability of its chemical structures, they are archaeological witnesses to its formation and transformation process. Based on the qualitative and quantitative composition of the molecules, it is possible to know the degree of oil biodegradation, determination of depositional environmental conditions (such as marine, terrestrial, deltaic, or hypersaline environments) and the type of precursor organic matter in the source rock. In addition, it is possible to carry out environmental, forensic and behavioral studies of hydrocarbon reservoirs. The objective of the present work is to develop an analytical methodology to obtain the distribution of saturated terpanes and steranes biomarkers using combined gas chromatography-mass spectrometry. From the extracted ion chromatograms, the peaks of 37 compounds from the group of terpanes and 19 compounds from that of the steranes were identified and integrated. The distribution was determined with their characteristic fragment ions of m/z 191, m/z 217 and m/z 218. Repeatability, intermediate precision and relative standard deviations were lower than 5%, which shows that the results are in agreement with the quality criteria established for analogous chromatographic methods

Keywords: atmospheric corrosion; carbon steel; sulphate; chloride; aggressivity corrosion.

INTRODUCCIÓN

El petróleo consta de decenas de miles de moléculas orgánicas, desde estructuras tan simples como el metano hasta macromoléculas complejas como los asfaltenos. Entre ellas figuran los llamados biomarcadores, los cuales, en su mayoría se derivan de precursores moleculares que formaban parte de diferentes organismos vivos que habitaban el planeta hace millones de años como bacterias, hongos, algas, plancton, líquenes, musgos, helechos y otras plantas superiores (Peters, K.E., Moldowan, J.W. 1993, 2005).

La cantidad de biomarcadores presentes en este mineral es pequeña y debido a la alta estabilidad de sus estructuras químicas, constituyen testigos arqueológicos del proceso de formación y transformación del mismo. (Peters, K.E., Moldowan, J.W. 1993, 2005, Seifert W.K., Moldowan J.M. 1978). En base a la composición tanto cualitativa como cuantitativa de las moléculas-testigo es posible inferir sobre geo-cronología, el grado de alteración, el ambiente de deposición (terrestre, lacustre, marino ó mezcla) y consecuentemente sobre la materia orgánica involucrada en el proceso. Además, es viable realizar estudios ambientales (contaminación), forenses (derrames) (Wang Z. et al., 2006, 2003, 1994, El-Sabagh, S.M. et al., 2018, Fang, R. et al., 2019) y del comportamiento de los reservorios de hidrocarburos. Según su naturaleza química, dentro de los biomarcadores reportados en la literatura científica, se distinguen alcanos lineales y ramificados, isoprenoides, sesquiterpenos, diterpenoides, terpanos tricíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos, esteranos, esteroides, hidrocarburos aromáticos policíclicos y porfirinas, entre otros (Lorenzo, E. et al., 2018, Tao, S. Z. et al., 2015, Walters, C.C. et al., 2018).

La herramienta analítica básica para el análisis de los biomarcadores es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). Consiste en una técnica combinada donde una vez los componentes de una muestra son eluidos en el cromatógrafo, las moléculas volatilizadas del analito son fragmentadas en la cámara de ionización al hacerles incidir un haz de electrones. Los iones así generados son acelerados hacia el analizador másico donde son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z), y finalmente detectados para generar un espectro de masas característico para cada compuesto. Su empleo permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas.

En la exploración petrolera, dentro de la fracción de compuestos alifáticos los terpanos y esteranos figuran entre los biomarcadores más utilizados. Las muestras objeto de estudio que no han sido severamente afectadas por procesos de alteración poseen fragmentos iónicos característicos de m/z 191, m/z 217 y 218 (Mei, M. et al., 2018). El objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar un procedimiento analítico para obtener la distribución de los biomarcadores saturados terpanos y esteranos mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Perfluorotributilamina Mass Spec Std (PFTBA), Alfa Aesar
- n-hexano para cromatografía, Merck

- n-heptano para cromatografía, Merck
- Diclorometano para cromatografía, Merck
- Sílica gel 100–200 mesh, Sigma–Aldrich (activado a 200°C por 4 h)
- Alúmina, Sigma–Aldrich (activado a 200°C por 4 h)
- Sulfato de sodio anhidro, Merck (>99.0 % de pureza)
- Papel de filtro para análisis cuantitativo Whatman No.2

Muestras

Para el desarrollo de la metodología analítica se seleccionaron 3 muestras de crudos ligeros pertenecientes a la familia II debido a que no presentan alteración y poseen cierto nivel de evolución térmica que posibilita la identificación de todos los picos de interés geoquímico (Domínguez, Z. et al., 2006, 2007, 2008). En la Tabla 1 se muestra la identificación de cada una de ellas.

Preparación de las muestras

Para la precipitación de los asfaltenos se pesó 1 g de crudo en un beaker de 250 mL de capacidad, donde posteriormente se añadió 40 mL de n-heptano. La mezcla se dejó reposar por 24 horas apartado de la luz para promover la precipitación efectiva de la fracción de asfaltenos. Posterior a ello se separó la fracción soluble (maltenos) mediante el proceso filtración con de papel filtro Whatman No. 2. Finalmente, los maltenos disueltos en el disolvente se evaporaron a sequedad.

Una vez obtenidos los maltenos se procedió a la separación de las fracciones de hidrocarburos saturados 1-F1, 3-F1 y 4-F1 a través de la técnica de cromatografía de adsorción en columna. Las pipetas Pasteur que se emplearon fueron de 10 cm de largo por 0,5 cm de ancho y se empacaron con sílice/alúmina en una proporción 1:1. Previo a la siembra de las muestras en el tope de la columna fue necesario disolver 30 mg de las mismas en n-hexano. Las fracciones de saturados 1-F1, 3-F1 y 4-F1 se eluyeron con 2 ml de n-hexano y se transfirieron a viales para su análisis por CG-EM.

Instrumento

Con la finalidad de obtener los biomarcadores, los extractos de hidrocarburos saturados se analizaron por CG/EM. El equipo consiste en un cromatógrafo de gases modelo 7890A acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5975C, ambos de la marca Agilent Technologies. El cromatógrafo de gases está equipado con inyector automático modelo G-4513A. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron con la ayuda del software MSD Productivity ChemStation, versión E.02.02. Para la calibración del espectrómetro de masas se utilizó Perfluorotributilamina (PFTBA). Los iones utilizados fueron m/z 69, 219 y 502 en las zonas de masas pequeña, media y elevada, respectivamente. Los parámetros relativos a la calibración de masas se ajustaron automáticamente (extracción, enfoque, aceleración y detección de los iones) mediante el procedimiento de "autotune" para obtener mayor sensibilidad y una adecuada resolución.

Condiciones experimentales

Las condiciones operacionales fueron las siguientes: columna capilar HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película de fase estacionaria. El gas portador utilizado fue Helio y se mantuvo a flujo constante a 1 mL/min. La temperatura del horno se programó desde 60 hasta 300 °C con rampa de calentamiento de 6 °C/min, un tiempo isotérmico inicial de 2 min y final de 15 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 300 °C y el volumen de inyección fue de 1 μL en modo "splitless".

El espectrómetro de masas se operó en el modo SCAN (barrido completo de radiofrecuencia en el rango de masas de m/z 50-700) con energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas de la fuente de iones y la interface se mantuvieron en 250 °C y 280 °C, respectivamente.

La identificación de los biomarcadores se realizó comparando sus tiempos de retención (tR) y sus espectros de masas con los de la librería NIST soportada en el software y con datos de la literatura especializada (López-Quintero, J. O. et al., 1997, Walters, C.C. et al., 2017). La abundancia relativa de los compuestos terpanos y esteranos en las fracciones F1 se calcularon a partir de la integración de los picos generados en los fragmentogramas de los iones diagnósticos m/z 191, m/z 217 y m/z 218.

Evaluación de los resultados

La precisión del método se evaluó a través de las medidas de dispersión repetibilidad y precisión intermedia. La primera se estimó inyectando la muestra 1-F1 por triplicado en iguales condiciones experimentales, y la segunda de igual manera en días diferentes y por distintos analistas. Los resultados obtenidos se expresaron como desviación estándar relativa (% DER).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fracciones F1 de las muestras 1-F1, 3-F1 y 4-F1 fueron analizadas mediante CG/EM.

En la figura 1 se presentan los cromatogramas de iones totales (TIC, por sus siglas en inglés) adquiridos en modo SCAN. En ellos se observan los picos cromatográficos correspondientes a la elución de las n-parafinas en el rango de nC11 a nC35, además de los isoprenoides pristano y fitano. Estos cromatogramas de masas le son útiles a los geoquímicos debido a que mediante el predominio par/impar y las relaciones alceno normal/isoprenoide es posible conocer el estado de alteración además del origen de la roca madre (Wang, Z., et al., 2016, Domínguez, Z. et al., 2006, 2007, 2008).

Se identificaron 37 compuestos terpanos y 19 compuestos esteranos que corresponden con los reportados en la literatura especializada (tablas 2 y 3).

En la figura 2 se presentan los cromatogramas iónicos extraídos a m/z 191 donde se aprecia la distribución de los compuestos terpanos referidos en la tabla 2. Además, se distingue la excelente separación de isómeros de terpanos tricíclicos C26-C30, así como la alta proporción de hopanos extendidos relativo a los terpanos tricíclicos.

En las figuras 3 y 4 se exhiben los cromatogramas iónicos extraídos a m/z 217 y m/z 218, respectivamente. En ellas se aprecia la distribución de los compuestos entre 29 y 40 min, así

como su adecuada separación y predominio de los esteranos regulares C27, C28 y C29 referidos en la tabla 3.

En la tabla 4 se presentan algunos parámetros utilizados frecuentemente en geoquímica orgánica y sus aplicaciones. El cálculo de ellos se efectúa a partir de relaciones de compuestos terpanos y esteranos según sus abundancias relativas (en este caso, medidas de las áreas).

La repetibilidad y precisión intermedia se reportan en la tabla 5. Las desviaciones estándares relativas fueron inferiores al 5% lo que demuestra que los resultados están en concordancia con los criterios de calidad establecidos para métodos cromatográficos análogos en los que se considera hasta un 5 % de variabilidad (Medeiros P.M. et al., 2007, Fernández R. et al., 2010, Cheng, X. et al. 2016).

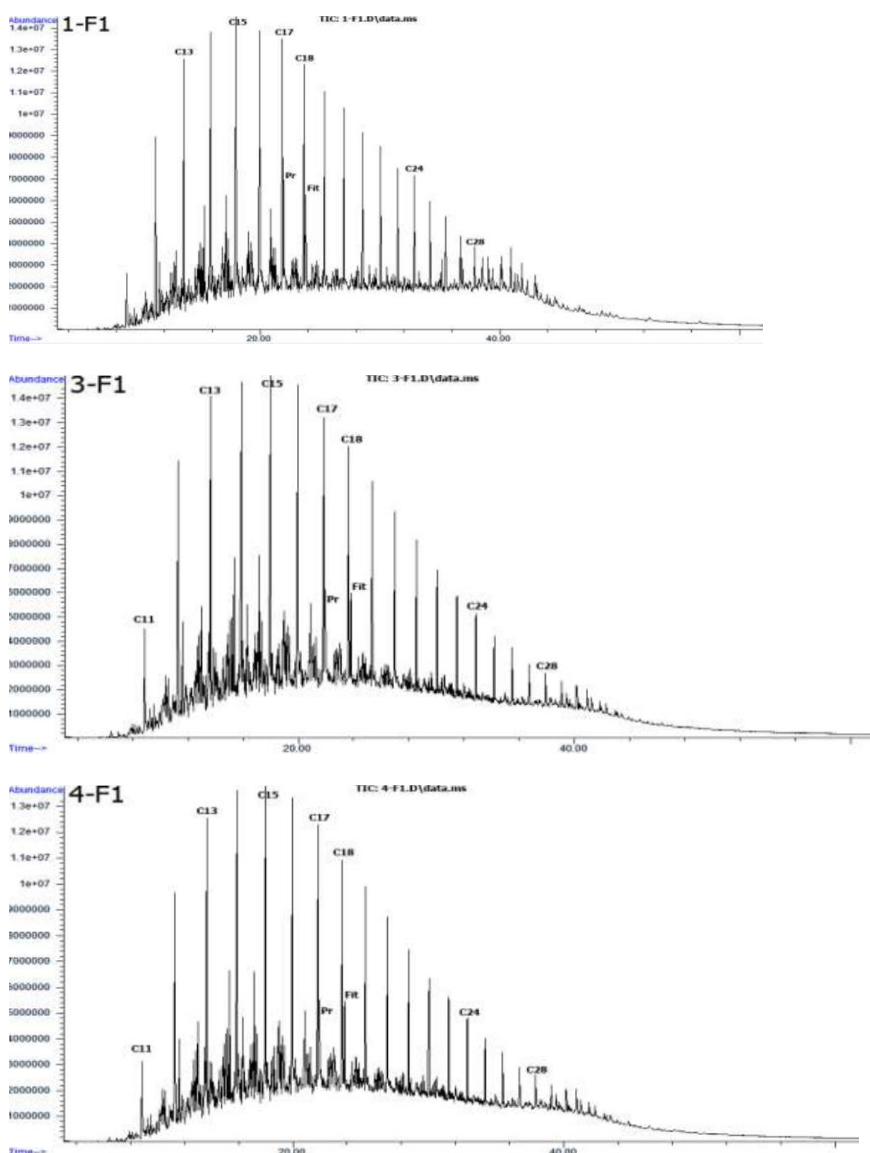


Fig. 1. Cromatograma iónico total (TIC) de las muestras analizadas.

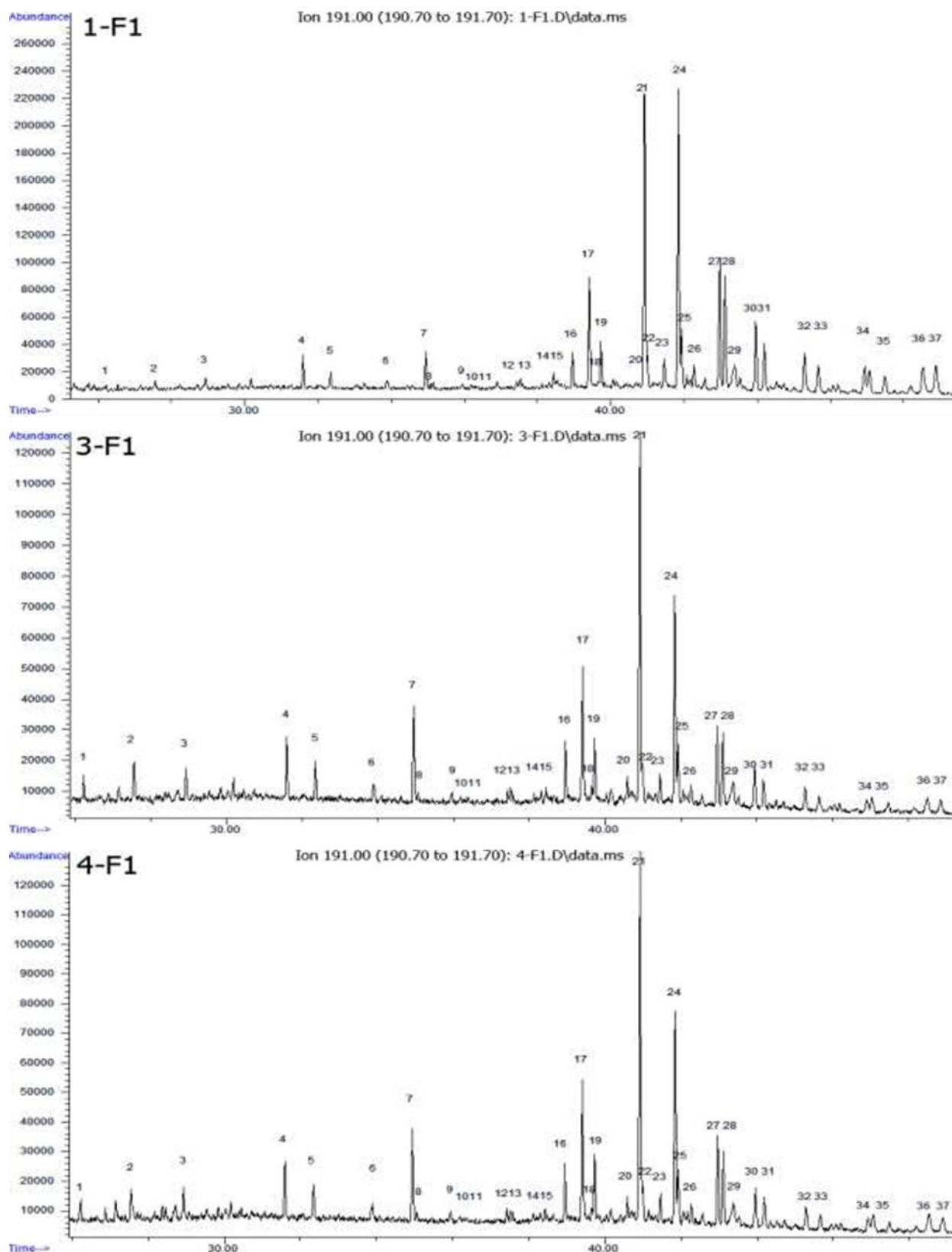


Fig.2. Cromatogramas iónicos extraídos a m/z 191 de las muestras analizadas.

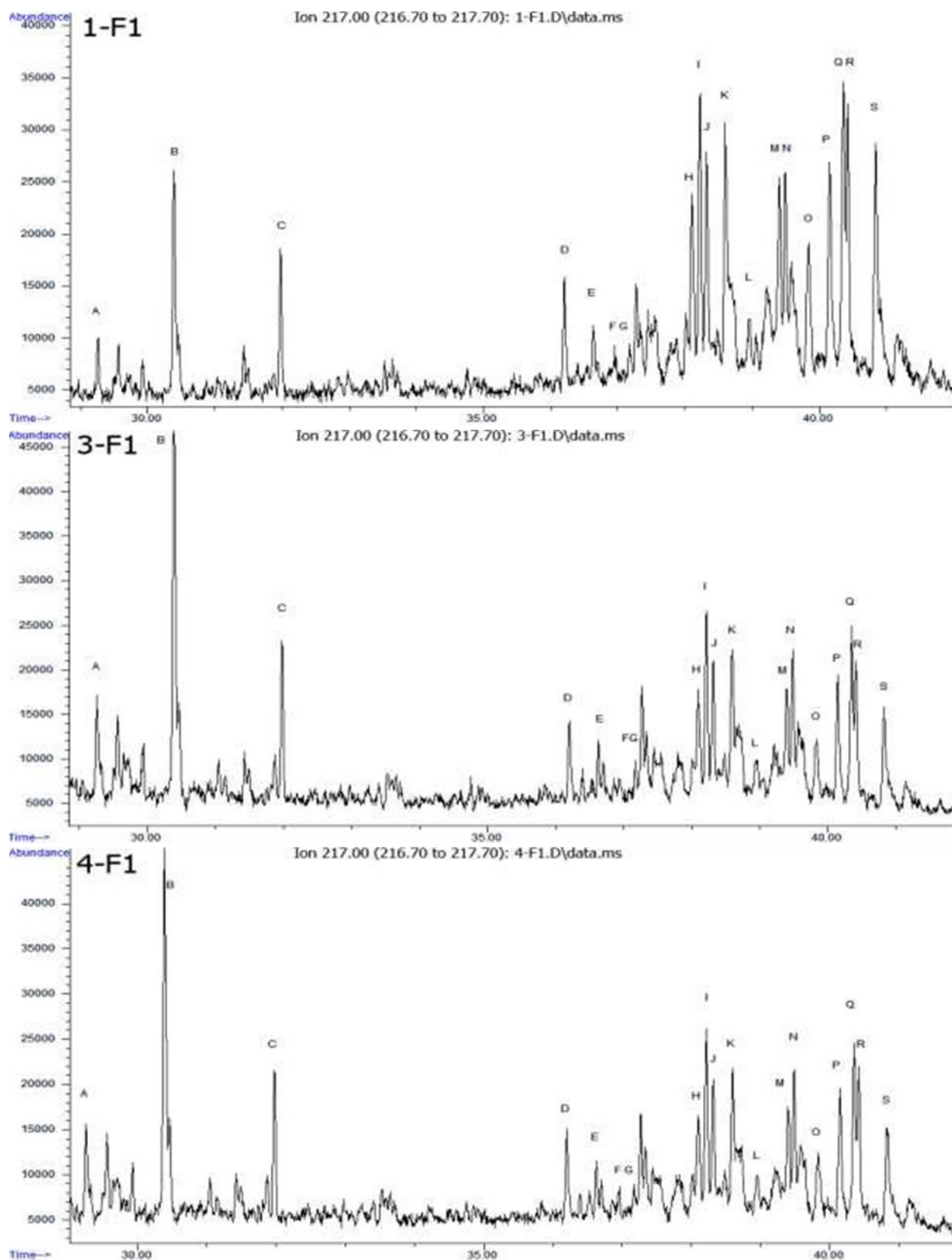


Fig.3. Cromatogramas iónicos extraídos a m/z 217 de las muestras analizadas.

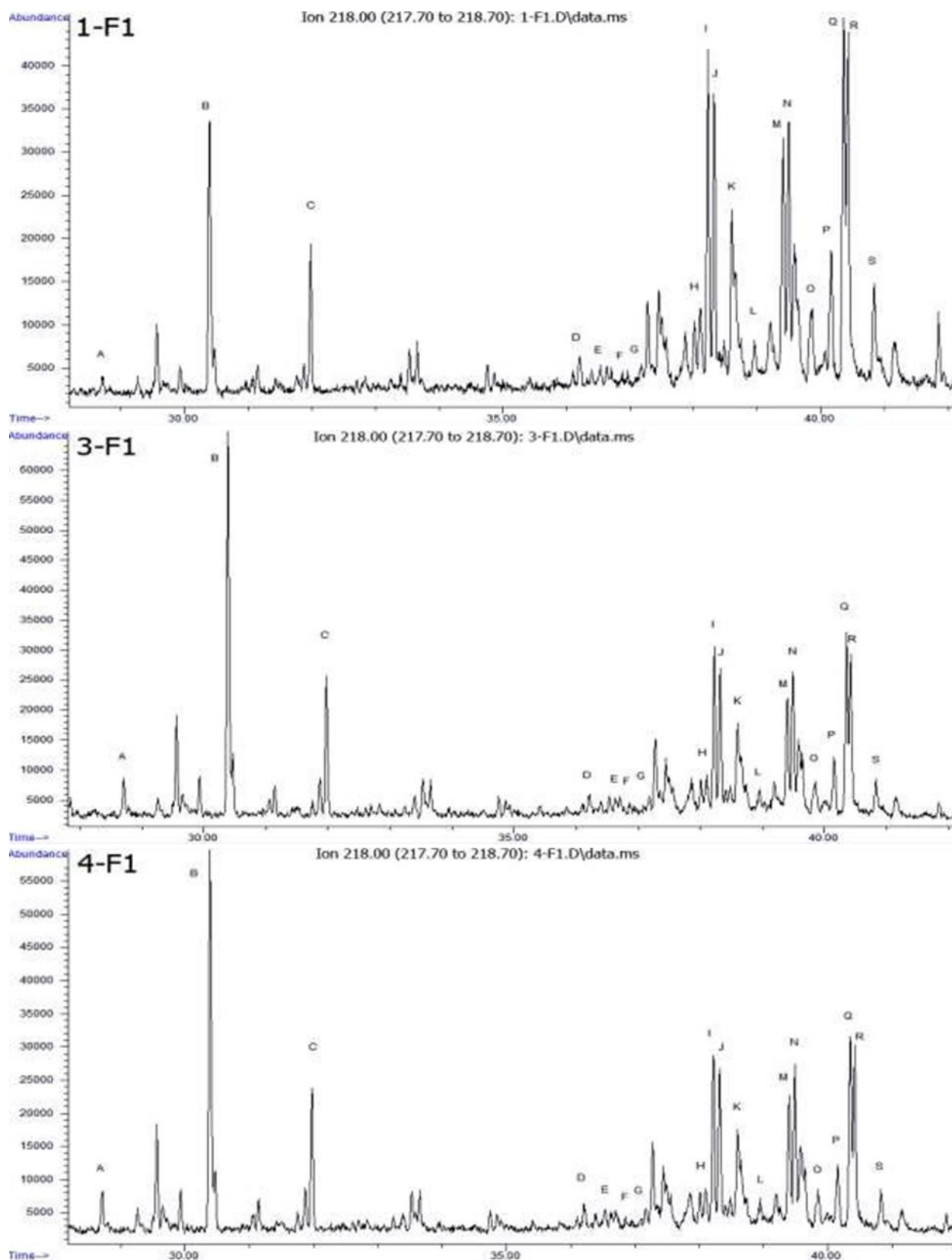


Fig. 4. Cromatogramas iónicos extraídos a m/z 218 de las muestras analizadas

Tabla 1. Identificación de las muestras.

Código	Muestra
1-F1	Crudo 1
3-F1	Crudo 3
4- F1	Crudo 4

Tabla 2. Identificación de picos de biomarcadores terpanos (m/z 191) en el fragmentograma de masas.

Pico	Compuesto	t. Retención (min)	Abreviatura
1	C19 Terpano Tricíclico	26,21	TR19
2	C20 Terpano Tricíclico	27,56	TR20
3	C21 Terpano Tricíclico	28,93	TR21
4	C22 Terpano Tricíclico	31,59	TR22
5	C23 Terpano Tricíclico	32,35	TR23
6	C24 Terpano Tricíclico	33,91	TR24
7	C25 Terpano Tricíclico A	34,95	TR25A
8	C25 Terpano Tricíclico B	35,07	TR25B
9	C24 Terpano Tetracíclico	35,95	TET24
10	C26 Terpano Tricíclico A	36,20	TR26A
11	C26 Terpano Tricíclico B	35,95	TR26B
12	C28 Terpano Tetracíclico A	37,44	TR28A
13	C28 Terpano Tetracíclico B	37,53	TR28B
14	C29 Terpano Tetracíclico A	38,32	TR29A
15	C29 Terpano Tetracíclico B	38,43	TR29B
16	Ts: 18 α (H),21 β (H)-22,29,30-Trisnorhopano	38,96	Ts
17	Tm: 17 α (H),21 β (H)-22,29,30-Trisnorhopano	39,42	Tm
18	C30 Terpano Tricíclico A	39,66	TR30A
19	C30 Terpano Tricíclico B	39,74	TR30B
20	C28 17 α (H),18 α (H),21 β (H)-28,30-Bisnorhopano	40,51	H28
21	17 α (H),21 β (H)-30-Norhopano	40,93	H29
22	17 α (H),21 β (H)-30-Norneohopano	41,00	C29Ts

23	18 α (H),21 β (H)-30-Norhopano (Normoretano)	41,46	M29
24	17 α (H),21 β (H)-Hopano	41,85	H30
25	17 α (H),30-nor-29-Homohopano	41,93	NOR30H
26	17 β (H),21 α (H)-Hopano (Moretano)	42,27	M30
27	22S-17 α (H),21 β (H)-30-Homohopano	42,98	H31S
28	22R-17 α (H),21 β (H)-30-Homohopano	43,12	H31R
29	Gammacerano	43,39	GAM
30	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31-Bishomohopano	43,96	H32S
31	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31-Bishomohopano	44,20	H32R
32	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-Trishomohopano	45,30	H33S
33	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32-Trishomohopano	45,67	H33R
34	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-Tetrakishomohopano	46,94	H34S
35	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33-Tetrakishomohopano	47,49	H34R
36	22S-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33,34-Pentakishomohopano	48,88	H35S
37	22R-17 α (H),21 β (H)-30,31,32,33,34-Pentakishomohopano	49,70	H35R

Tabla 3. Identificación de picos de biomarcadores esteranos (m/z 217 y 218) en el fragmentograma de masas.

Pico	Compuesto	t. Retención (min)	Abreviatura
A	C20 5 α (H),14 α (H),17 α (H)-esterano	29,26	S20
B	C21 5 α (H),14 β (H),17 β (H)-esterano	30,39	S21
C	C22 5 α (H),14 β (H),17 β (H)-esterano	31,97	S22
D	C27 20S-13 β (H),17 α (H)-diasterano	36,21	DIA27S
E	C27 20R-13 β (H),17 α (H)-diasterano	36,63	DIA27R
F	C27 20S-13 α (H),17 β (H)-diasterano	36,95	DIA27S2
G	C27 20R-13 α (H),17 β (H)-diasterano	37,17	DIA27R2
H	C27 20S-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-colestano	38,11	C27S
I	C27 20R-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-colestano	38,23	C27 $\beta\beta$ R
J	C27 20S-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-colestano	38,32	C27 $\beta\beta$ S

K	C27 20R-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-colestano	38,60	C27R
L	C28 20S-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-ergostano	38,96	C28S
M	C28 20R-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-ergostano	39,41	C28 $\beta\beta$ R
N	C28 20S-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-ergostano	39,50	C28 $\beta\beta$ S
O	C28 20R-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-ergostano	39,84	C28R
P	C29 20S-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-estigmastano	40,15	C29S
Q	C29 20R-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-estigmastano	40,36	C29 $\beta\beta$ R
R	C29 20S-5 α (H),14 β (H),17 β (H)-estigmastano	40,43	C29 $\beta\beta$ S
S	C29 20R-5 α (H),14 α (H),17 α (H)-estigmastano	40,84	C29R

Tabla 4. Parámetros geoquímicos más representativos de la fracción de compuestos alifáticos y sus aplicaciones.

Relación	Origen	Evolución térmica	Biodegradación
TERPANOS			
TR21/TR23	X		
TR23/TR24	X		
TR23/H30	X		
TR24/H30	X		
TETRA 24/TR 26	X		
Ts/Tm		X	
NOR30H/H30			X
H29/H30	X		
M30/H30			X
GAM/H30	X		
M(TR19–TR26)/H30		X	
H31S/H31R		X	
H32S/H32R		X	
H33S/H33R		X	
M(H31–H35)/H30	X		
H31/M(H31–H35)		X	
H32/M(H31–H35)		X	
H33/M(H31–H35)		X	
H34/M(H31–H35)		X	

H35/M(H31–H35)		X	
H35/H34	X		
ESTERANOS			
C21/ C22		X	
DIA 27S/DIA27R	X	X	
C27 $\beta\beta$ (S+R)/C29 $\beta\beta$ (S+R)	X		
C28 $\beta\beta$ (S + R)/C29 $\beta\beta$ (S+R)	X		
C27 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	X		
C28 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	X		
C29 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	X		
C27 $\alpha\alpha$ /C27 $\beta\beta$		X	
C28 $\alpha\alpha$ /C28 $\beta\beta$		X	
C29 $\alpha\alpha$ /C29 $\beta\beta$		X	
C27 (20S)/C27 (20R)		X	
C28 (20S)/C28 (20R)		X	
C29 (20S)/C29 (20R)		X	
C27–C28–C29 esteranos/H30	X		

Tabla 5. Resultados estadísticos de repetibilidad y precisión intermedia.

Parámetro	% DER	
	Repetibilidad	Precisión intermedia
TR21/TR23	2,160	2,509
TR23/TR24	2,174	2,758
TR23/H30	4,725	4,864
TR24/H30	3,030	4,578
Ts/Tm	3,523	4,863
H28/H30	3,030	3,725
NOR30H/H30	3,152	4,556
H29/H30	3,032	4,259
M30/H30	3,020	4,446
GAM/H30	3,200	3,912
M(TR19–TR26) /H30	3,007	4,345

H31S/H31R	2,512	3,937
H32S/H32R	2,290	3,308
H33S/H33R	2,355	3,233
M(H31–H35) /H30	2,036	2,850
H31/M(H31–H35)	2,683	3,187
H32/M(H31–H35)	2,233	2,967
H33/M(H31–H35)	2,778	3,445
H34/M(H31–H35)	2,740	3,915
H35/M(H31–H35)	2,253	2,689
DIA 27S/DIA27R	3,136	3,884
C27 $\beta\beta$ (S+R)/C29 $\beta\beta$ (S+R)	2,375	3,547
C28 $\beta\beta$ (S + R)/C29 $\beta\beta$ (S+R)	1,923	2,719
C27 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	1,841	2,654
C28 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	3,729	4,530
C29 $\beta\beta$ /(C27+C28+C29) $\beta\beta$	3,764	4,446
C27 $\alpha\alpha$ /C27 $\beta\beta$	2,599	3,232
C28 $\alpha\alpha$ /C28 $\beta\beta$	1,809	2,501
C29 $\alpha\alpha$ /C29 $\beta\beta$	2,193	3,410
C27 (20S)/C27 (20R)	2,687	3,539
C28 (20S)/C28 (20R)	2,748	3,583
C29 (20S)/C29 (20R)	2,569	3,322
C27–C28–C29 estera nos/H30	1,944	2,813

CONCLUSIONES

Se identificaron 37 compuestos del grupo de los terpanos y 19 compuestos del de los esteranos. La distribución de los mismos se obtuvo a través de los iones diagnósticos m/z 191, m/z 217 y m/z 218 de las fracciones de hidrocarburos saturados de las muestras de crudos. La repetibilidad, precisión intermedia y desviaciones estándares relativas fueron inferiores al 5 % lo que demuestra que los resultados están acorde a los criterios de calidad establecidos para métodos cromatográficos análogos. Se desarrolló una metodología analítica para el análisis de biomarcadores mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, que puede utilizarse en muestras de crudo para la determinación de parámetros geoquímicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cheng, X., Hou, D., Xu, C., Wang, F. (2016). Biodegradation of tricyclic terpanes in crude oils from the Bohai Bay Basin, *Organic Geochemistry*, 101, pp.11–21
- Determinación de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) en suelos contaminados con petróleo. Método de fraccionamiento rápido por cromatografía líquida, (2007). Laboratorio de química ambiental, CEINPET, CI-GC/M 16 02 rev 04.
- Determinación del contenido de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) por cromatografía de elución, (2005). Laboratorio de geoquímica orgánica, CEINPET, CI-GC/P 28 03.
- Domínguez, Z., Guzzo, J.V.P., Azevedo, D.A, López, J.O. (2007). Geochemical study and application of exploratory to the differentiation of onshore Cuba surface petroleum shows 23rd International Meeting on Organic Geochemistry, Torquay IMOOG, pp. 619-620.
- Domínguez, Z. (2008). Caracterización geoquímica de Asfaltitas Cubanas. Tesis de doctorado. Universidad Federal de Río de Janeiro. UFRJ. Brasil, pp. 273.
- Domínguez, Z., Guzzo, J.V.P, Azevedo, D.A. (2008). Clasificación geoquímica de asfaltitas cubanas, *Química nova*, 31, pp. 1330-1335.
- Domínguez, Z., López, J.O. Azevedo, D.A. (2006). Classification of Cuban oils by statistic and geochemical grouping”, *Abstrat, X Alago Congress on Organic Geochemistry*, Nov 4-10, Salvador de Bahia, Brazil.
- El-Sabagh, S.M., El-Naggar, A.Y., El Nady, M.M., Ebiad, M.A., Rashad A.M., Abdullah, E.S. (2018). Distribution of triterpanes and steranes biomarkers as indication of organic matters input and depositional environments of crude oils of oilfields in Gulf of Suez, Egypt. *Egyptian Journal of Petroleum*, 27, pp. 969-977.
- Fang, R., Littke, R., Zieger, L., Baniasad, A., Li, M., and Schwarzbauer, J. (2019). Changes of composition and content of tricyclic terpane, hopane, sterane, and aromatic biomarkers throughout the oil window: A detailed study on maturity parameters of Lower Toarcian Posidonia Shale of the Hils Syncline, NW Germany. *Organic Geochemistry*, 138.
- Fernández-Varela R., Andrade J.M., Muniategui S., Prada D. (2010). Selecting a reduced suite of diagnostic ratios calculated between petroleum biomarkers and polycyclic aromatic hydrocarbons to characterize a set of crude oils. *Journal of Chromatography*, 1217(52), pp. 8279-8289.

- López-Quintero, J. O.; Navarrete, L.E.; Pascual, O., López-Riebra J.G. y Blanco, M. (1997). Caracterización Geoquímica para la exploración de Hidrocarburos en Cuba. Centro de Investigaciones del Petróleo, Ciudad de La Habana (Informe Interno), pp. 163.
- Lorenzo, E., Roca-Beltrán, W.A., Martínez, M., Morato, A., Escandón-Panchana, P.C., y Álvarez-Domínguez, C.P. (2018). Correlación geoquímica entre crudos y rocas del sistema petrolero de la península de Santa Elena y el golfo de Guayaquil. *Boletín de Geología*, 40(1), pp. 31-42.
- Medeiros P.M., Simoneit B.R. (2007). Gas chromatography coupled to mass spectrometry for analyses of organic compounds and biomarkers as tracers for geological, environmental, and forensic research. *Journal of Separation Science*, 30, pp. 1516-1536.
- Mei, M., Bissada, K.K., Malloy, T.B., Mike Darnell, L., Szymcyk, E.B. (2018). Improved Method for Simultaneous Determination of Saturated and Aromatic Biomarkers, Organosulfur Compounds and Diamondoids in Crude Oils by GC-MS/MS. *Organic Geochemistry*, 116, pp. 35-50.
- Peters, K.E., Moldowan, J.W. (1993) *The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Peters, K.E., Walters, C.C., Moldowan, J.W. (2005). *The Biomarker Guide* (two volumes), second ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Seifert W.K., Moldowan J.M. (1978). Applications of steranes, terpanes and monoaromatics to the maturation, migration and source of crude oils. *Geochimica et Cosmochim Acta*, 42, pp. 77-95.
- Tao, S. Z., Wang, C., Du, J. G., Liu, L., Chen, Z. (2015). Geochemical application of tricyclic and tetracyclic terpanes biomarkers in crude oils of NW China. *Marine and Petroleum Geology*, 67(6), pp. 460-467.
- Walters, C.C., Wang, F.C., Higgins, M.B., Madincea, M.E. (2017). Universal biomarker analysis using GC×GC with dual FID and ToF-MS (EI/FI) detection. *Organic Geochemistry*, 115, pp.57-66.
- Walters, C.C., Wang, F.C., Higgins, M.B., Madincea, M.E. (2018). Universal Biomarker Analysis: Aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry*, 124, pp. 205-214.
- Wang Z., Stout S.A., Fingas M. (2006). Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. *Environmental Forensics*, 7, pp. 105-146.
- Wang, Z., Yang, C., Yang, Z., Brown, C. E., Hollebone, B. P., Stout, S. A. (2016). Petroleum biomarker fingerprinting for oil spill characterization and source identification. In *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics*, Stout (2nd Edition), Stout, S. A. and Wang, Z. (Eds.), Academic Press, pp. 131.
- Wang, Z.D., Fingas, M. (2003). Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47, pp. 423-452.

Wang, Z.D., Fingas, M., Sergy, G. (1994b). Study of 22-year-old Arrow oil samples using biomarker compounds by GC/MS. *Environmental Science and Technology*, 28, pp. 1733-1746.