

**ANALISIS DEL RIESGO AMBIENTAL DE LA EMULSION RUBIALES-AGUA
POR MEDIO DE LA ECOTOXICIDAD Y BIODEGRADABILIDAD**

LILIA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERIAS Y ADMINISTRACIÓN
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL
FLORIDABLANCA**

2013

**ANALISIS DEL RIESGO AMBIENTAL DE LA EMULSION RUBIALES-AGUA
POR MEDIO DE LA ECOTOXICIDAD Y BIODEGRADABILIDAD**

LILIA RODRIGUEZ RODRÍGUEZ

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental

Director

MsC. MARIA KOPYTKO

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA**

2013

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bucaramanga, Mayo de 2013

DEDICATORIA

A Dios, a mi Hija María Gabriela, a Jorge Luis, a mis Padres y Hermanos, pues son la luz de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a:

A mi hija María Gabriela, a Jorge Luis y a mi querida madre, quienes siempre me animaron especialmente en aquellos momentos en los que creí abandonar este propósito, gracias por su comprensión, tolerancia, tiempo, por sus ideas y valiosas orientaciones, pero sobre todo por su disposición incondicional durante todo el desarrollo de este proyecto.

A ECOPETROL-Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) por brindarme los recursos necesarios para el desarrollo de éste proyecto, así como el tiempo que me autorizó para “volarme” a clases.

A Astrid Pimienta y María Kopytko por ser guías permanentes en el desarrollo de este proyecto, condición clave para dar cierre al tema del riesgo ecológico de la tecnología de emulsiones desarrolladas en Ecopetrol como alternativa de transporte de crudos pesados y extra pesados, y con ello finalizar el ciclo de maduración de esta tecnología.

A Cesar Ariza y Carlos Rodríguez por su invaluable ayuda y conocimientos acerca de los estudios y analítica biotecnológica.

A todos y cada uno de mis compañeros con quienes he tenido la oportunidad de compartir horas gratas de trabajo y me permitieron ser simplemente lo que soy.

Finalmente agradezco a todos aquellos que han creído y seguirán creyendo en mí (familiares y amigos)...a todos ellos espero nunca defraudarlos.

LISTA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	18
1. OBJETIVOS	20
1.1 OBJETIVO GENERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. ANTECEDENTES	21
2.1 JUSTIFICACIÓN	24
3. MARCO TEORICO	27
3.1 EMULSIONES	27
3.1.1 Emulsión directa (w/o): agua dispersa en crudo	27
3.1.2 Emulsión inversa (o/w): crudo disperso en agua.	28
3.1.3 Propiedades de las emulsiones.	29
3.1.3.1 Viscosidad	30
3.1.3.2 Tensión superficial	30
3.1.3.3 Agente emulgente y/o surfactante.	31
3.2. ECO-TOXICOLOGÍA	33
3.2.1 Compuestos Contaminantes.	34
3.2.2 Compuestos del petróleo crudo y su toxicidad	35
3.3 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	38
3.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLAS	40
3.5 BIODEGRADABILIDAD	41
3.5.1 Biodegradabilidad Rápida	42
3.6 MARCO LEGAL	43
4. METODOLOGÍA	45
4.1 PREPARACIÓN DE EMULSIÓN RUBIALES	45

4.1.1 Caracterización de los productos caso de estudio	46
4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANALISIS DE ECOTOXICIDAD	48
4.3 ORGANISMOS DE PRUEBA PARA ECOTOXICIDAD	52
4.3.1 Scenedesmus acutus.	52
4.3.2 Daphnia pulex.	53
4.3.3 Oreochromis sp.	54
4.3.4 Lactuca sativa.	55
4.4 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	56
4.4.1 Ensayo de toxicidad aguda con Scenedesmus acutus (OECD 201, 2006).	56
4.4.2 Ensayo de toxicidad aguda en Daphnia pulex (OECD 202, 2004).	57
4.4.3 Ensayo de toxicidad aguda en Oreochromis sp. (OECD 203, 1992).	58
4.4.4 Ensayo de toxicidad aguda en Lactuca sativa (USEPA OPPTS 850.4200, 1996).	59
4.5 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS	60
4.6 ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN DE PELIGRO	61
4.7 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD RÁPIDA	62
4.7.1 Inóculo Empleado.	63
4.7.2 Respirómetro Automático (Oxitop).	63
5. RESULTADOS	65
5.1 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE EMULSION RUBIALES Y SUS COMPONENTES.	65
5.1.1 Caracterización de la Emulsión Rubiales	65
5.1.1.1 Tamaño partícula:	65
5.1.1.2 Comportamiento reologico (viscosimétrico):	66
5.1.1.3 Contenido de agua	66
5.1.1.4 Tensión interfacial:	66
5.1.1.5 Estabilidad estática	67
5.1.2 Caracterización crudo Rubiales.	67

5.1.2.1 Comportamiento reológico	68
5.1.2.2 Densidad del crudo Rubiales	68
5.1.2.3 Contenido de agua	68
5.1.2.4 Caracterización composición química crudo Rubiales	69
5.1.3 Caracterización emulgente Emulgrosson	70
5.2. ENSAYOS AGUDOS DE TOXICIDAD	70
5.2.1 Ensayo de toxicidad aguda con <i>Scenedesmus acutus</i> (OECD 201, 2006).	71
5.2.2. Ensayo de toxicidad aguda en <i>Daphnia pulex</i> (OECD 202, 2004).	73
5.2.3 Ensayo de toxicidad aguda en <i>Daphnia pulex</i> (OECD 202, 2004).	73
5.2.4 Ensayo de toxicidad aguda en <i>Oreochromis sp.</i> (OECD 203, 1992).	75
5.2.5 Ensayo de toxicidad aguda en <i>Lactuca sativa</i> (USEPA OPPTS 850.4200, 1996).	76
5.2.6 Análisis de identificación de peligro.	78
5.3 ANÁLISIS BIODEGRADABILIDAD RÁPIDA	81
5.3.1 Aditivo Emulgrosson.	82
5.3.2 Crudo Rubiales.	83
5.3.3 Emulsión Rubiales.	85
5.3.4 Biodegradabilidad Rápida de la Emulsión Rubiales, Crudo Rubiales y el aditivo Emulgrosson. Esquema Comparativo.	87
5.4 CRITERIO BIODEGRADABILIDAD - ECOTOXICIDAD DEL RIEGO AMBIENTAL	89
6. CONCLUSIONES	91
7. RECOMENDACIONES	93
BIBLIOGRAFIA	94
ANEXOS	100

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama descriptivo tipo de emulsión ³	28
Figura 2. Emulsificante: fuerzas que gobiernan su acción	32
Figura 3. Preparación de la emulsión Rubiales en el MCPFD	45
Figura 3b. Equipos empleados en la caracterización fisicoquímica de la emulsion y sus componentes.	47
Figura 4. Metodología general empleada en la evaluación de Ecotoxicidad.	48
Figura 5. Representación de la aproximación de dilución variable aplicada para la preparación de las fracciones adaptadas de agua (WAF, CEWAF).	50
Figura 6. Cultivos de organismos indicadores empleados en la Evaluación Ecotoxicológica de la Emulsión Rubiales y sus componentes	52
Figura 7. <i>Scenedesmus acutus</i>	53
Figura 8. <i>Daphnia pulex</i>	54
Figura 9. Alevinos <i>Oreochromis sp</i>	55
Figura 10. <i>Lactuca sativa</i>	55
Figura 11. Evaluación de biodegradabilidad rápida por respirometría	64
Figura 12. Características de la distribución de tamaño de partícula de la emulsión Rubiales.	66
Figura 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Scenedesmus acutus</i> como función del logaritmo de la concentración.	72
Figura 14. Porcentaje de supervivencia de <i>Daphnia pulex</i> como función del logaritmo de la concentración.	74
Figura 15. Porcentaje de supervivencia de <i>Oreochromis sp.</i> como función del logaritmo de la concentración.	76
Figura 16. Relación dosis-respuesta para los efectos en <i>Lactuca sativa</i> después de una exposición de 120 horas.	78

Figura 17. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para el aditivo Emulgrosson.	82
Figura 18. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida del aditivo Emulgrosson y el compuesto referencia (Benzoato de Sodio) en el tiempo.	83
Figura 19. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para el crudo Rubiales.	84
Figura 20. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida en el tiempo del crudo Rubiales y el compuesto referencia.	85
Figura 21. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para la Emulsión Rubiales.	86
Figura 22. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida en el tiempo de la Emulsión Rubiales y el compuesto referencia.	87

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Rangos generales de la composición elemental del petróleo crudo	36
Tabla 2. Concentración letal o efectiva media (CL ₅₀ /CE ₅₀) y la posterior selección de las concentraciones a utilizar en el test definitivo.	39
Tabla 3. Metodologías empleadas para la caracterización de los productos caso de estudio	46
Tabla 4. Resumen de especificaciones para la preparación de las soluciones usadas en los test toxicológicos.	49
Tabla 5. Soluciones de ensayo, observaciones visuales y concentraciones de exposición de Crudo Rubiales, Emulsión) y Emulgrosson® empleadas.	51
Tabla 6. Organismos y norma internacional vigente empleados para evaluar toxicidad crudo Rubiales (WAF), emulsión (CEWAF) y Emulgrosson®	56
Tabla 7. Clasificación toxicológica y Frase de Riesgo según rangos de concentración de CE50 para el componente acuático.	62
Tabla 8. Parámetros encontrados en el inóculo empleado para la determinación de biodegradabilidad rápida.	63
Tabla 9. Características de la emulsión Rubiales(o/w 80/20)	67
Tabla 10. Características reologicas y densidad del crudo Rubiales	69
Tabla 11. Características químicas composicionales del material de estudio	69
Tabla 12. Características del agente emulgente EMULGROSSON	70
Tabla 13. Resultado de evaluaciones de observación visual y concentraciones de exposición de Crudo Rubiales, Emulsión y Emulgrosson® empleadas.	71
Tabla 14. Resultados estadísticos de la prueba Mann-Withney U practicada a la población de Lactuca sativa expuesta a la fracción al Crudo Rubiales (WAF), Emulsión Rubiales-CEWAF y Emulgrosson.	77
Tabla 15. Resultados de los ensayos toxicológicos: Identificación de peligro y frase de riesgo asociada.	80

Tabla 16. Demanda Teórica de Oxígeno de los materiales estudiados y del compuesto de referencia empleado	81
Tabla 17. Resultados finales de biodegradabilidad rápida obtenidos para los tres materiales analizados	88
Tabla 18. Resumen de resultados	89

RESUMEN

TÍTULO: ANALISIS DEL RIESGO AMBIENTAL DE LA EMULSION RUBIALES-AGUA POR MEDIO DE LA ECOTOXICIDAD Y BIODEGRADABILIDAD

AUTOR: LILIA RODRIGUEZ RODRIGUEZ

FACULTAD: Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: MSC. MARIA KOPYTKO.

Una de las alternativas para posibilitar el transporte de crudos pesados en Colombia es la tecnología de emulsiones. Esta opción se ha convertido, a través del tiempo, en una fuerte alternativa para maximizar la evacuación de crudos pesados y extra pesados por los oleoductos existentes en Colombia, sin embargo los riesgos ambientales asociados a un derrame durante su transporte no han sido establecidos. El presente estudio tiene como finalidad determinar de manera experimental el riesgo ambiental de la emulsión Rubiales por medio de análisis de ecotoxicidad y biodegradabilidad. El estudio que se relaciona en este documento ha sido dividido en tres partes. La primera, relaciona las características fisicoquímicas determinadas a la emulsión Rubiales y sus componentes (crudo Rubiales y surfactante Emulgrosson). En una segunda parte, se presenta el análisis del riesgo ambiental mediante pruebas de ecotoxicidad en organismos productores y consumidores acuáticos: *Scenedesmus acutus*, *Daphnia pulex*, *Oreochromis sp.* and *Lactuca sativa*, asociados a la exposición tanto de la emulsión como a los componentes de ésta. Finalmente, la evaluación de la

persistencia en el ambiente de la emulsión Rubiales y sus componentes a partir de pruebas de biodegradabilidad rápida.

La emulsión fue preparada en un circuito de pruebas fluido dinámicas en una planta piloto del Instituto Colombiano del Petróleo. La formulación estaba compuesta por crudo Rubiales 80% (V), agua 20 %(V); y emulgente Emulgrosson, 1300 ppm. Fueron empleadas pruebas estandarizadas para la caracterización fisicoquímica de la emulsión y sus componentes. La viscosidad de la emulsión fue 183 centipoises a 30°C; la del crudo 3980 cP y la del emulgente Emulgrosson, 65 cP. Respectivamente, la estabilidad fue superior a 30 días bajo condiciones estáticas y presentó distribución de tamaño de partícula bimodal, correspondiendo el 60% de la distribución de partículas de tamaño 25 micras y el 40% a 10 micras.

La preparación de muestras de emulsión de crudo Rubiales, del crudo y del aditivo Emulgrosson siguieron las recomendaciones de Singer et al. (2000), y las modificaciones propuestas por Marram Grass y K'aihue (2003). Para la preparación de las diferentes concentraciones de surfactante fueron aplicadas las recomendaciones de las guías OECD (2000), para ensayos acuáticos de ecotoxicidad para sustancias y mezclas complejas.

La biodegradabilidad rápida de los productos fue la recomendada por OECD 301C guide. El cálculo de CL50/CE50 con 95 % de límites de confianza usaron el método Probit, aplicando Statplus Professional v 2009.

De acuerdo al WAF and CEWAF (Marram grass and Ka'aihue 2003), el crudo Rubiales y la emulsión Rubiales fueron catalogadas como nocivas para el medio ambiente acuático mientras que el emulgente Emulgrosson fue catalogado como tóxico, pero rápidamente biodegradable, lo cual representa un bajo riesgo para el medio ambiente.

No se encontró interacción tóxica entre el emulgente Emulgrosson y el crudo Rubiales para la mayoría de ensayos, aunque el crudo presentó un incremento de toxicidad cuando fue adicionado Emulgrosson en los ensayos de *Daphnia pulex*, probablemente como consecuencia de su estructura y actividad específica, causando disolución de las membranas del organismo.

Fue observado un porcentaje de biodegradación del 16.5% para la emulsión Rubiales lo cual da referencia que este producto es menos recalcitrante al ambiente que el crudo Rubiales, que mostró una biodegradación del 11.0 % ; no obstante los resultados indican que no es rápidamente biodegradable en agua fresca, por lo tanto deben ser formuladas estrategias de mitigación y protocolos de manipulación.

Keywords: Water-in-oil invert emulsions, toxicity, biodegradability, bioassays

ABSTRACT

TITLE: Environmental Risk Analysis Rubiales Emulsion by Toxicity and Biodegradability.

AUTHOR: Lilia Rodriguez Rodriguez

FACULTY: Ingeniería Ambiental

Director: Msc. Maria Kopytko

The option of transportation of heavy crude by emulsion technology has become a strong alternative to maximize evacuation of heavy and extra heavy crude oil by pipelines in Colombia. However, the environmental risks associated with accidental spills of this substance during transport have not been established yet. The purpose of this work was to achieve that. This study was divided into three parts.

First, physical and chemical characteristics of Rubiales crude oil, surfactant and Rubiales emulsion were measured. Then, was analyzed the environmental risk for *Scenedesmus acutus*, *Daphnia pulex*, *Oreochromis* sp. and *Lactuca sativa* by toxicity, associate with exposure to these substances. Finally, the Rubiales emulsion persistence in the environment, as well as their components, was tested by rapid biodegradability.

The Rubiales Emulsion was prepared, in a dynamic fluid circuit tests in the Colombian Petroleum Institute. The emulsion was composed by Rubiales crude oil (70 % V,) water (30 %V) and surfactant - Emulgrosson (1300 ppm). Standard methods were applied for analysis of physical characteristics. Viscosity at 30°C for crude was 3980 centipois (cP), for surfactant 65cP and Rubiales emulsion 183cP. The stability of Rubiales emulsion was greater than 30 days and bimodal distribution of particles (PSD): 60% Dp 25 micras and 40% Dp 10 micras.

Preparation of Rubiales crude oil samples and Rubiales emulsion followed the recommendations of Singer et al. (2000), and modifications proposed by Marram grass and Ka'aihue (2003). For the preparation of the different concentrations of surfactant were applied the recommendations of the OECD guide (2000), for toxicological aquatic essays with substances and difficult miscellanies. The rapid biodegradability of the products was recommended by CDE 301C guide. Calculation of the CL50/CE50 with 95 % of confidence limits used the Probit method, applying Statplus Professional v 2009.

According to the WAF and CEWAF (Marram grass and Ka'aihue 2003), the Rubiales crude oil and Rubiales emulsion were catalogued as harmful for the aquatic environment, whereas the surfactant -Emulgrosson was catalogued as poisonous in water, but rapidly biodegradable, which representing a lower risk for the environment.

It was not found a poisonous interaction between the additive (surfactant-Emulgrosson) and the crude oil for the majority of essays, nevertheless the crude oil presented an increase of toxicity when Emulgrosson was added in the essays with *Daphnia pulex*. Probably, as a consequence of its structure and specific activity, causing the organism's membrane dissolution.

A 16.5% biodegradation rate was observed for the Rubiales emulsion which means that this product is less recalcitrant to the environment than the crude Rubiales crude oil by its own biodegradation rate 11.0 %. Nevertheless, the results of biodegradability of the Rubiales emulsion indicate that is not rapidly biodegradable in fresh water. Therefore mitigation strategies and handling protocols must be formulated.

Keywords: Water-in-oil invert emulsions, toxicity, biodegradability, bioassays.

INTRODUCCION

El Instituto Colombiano del Petróleo-ICP Ecopetrol S.A. ha desarrollado la tecnología de emulsiones inversas de crudos pesados y extra pesados como alternativa para transporte por oleoducto. Esta tecnología que actualmente se encuentra como producto tecnológico de alto interés técnico-económico para viabilizar la movilidad de crudos extra pesados y como opción energética (combustible no convencional) no dispone de estudios de toxicidad y biodegradabilidad, aspectos indispensables para dar cubrimiento a los requisitos de bioseguridad que relaciona la normativa ICONTEC, NTC 4435 Ficha Técnica de Seguridad –MSDS- la cual es tomada por Ecopetrol como parte de la política de responsabilidad con el cuidado del medio ambiente. La realización de este trabajo da respuesta a la necesidad de Ecopetrol de contar con toda la información relativa al impacto generado al medio ambiente, consecuencias y contingencias en caso de derrame.

Las emulsiones son sistemas compuestos por dos fases inmiscibles, (agua-aceite) (petróleo crudo en este caso), un agente surfactante y un elemento mecánico que promueve la dispersión del hidrocarburo en el agua en finas partículas que se suspenden en el agua. La viscosidad del crudo Rubiales es cercana a 6500 centipoises @ 25°C, la emulsión Rubiales que contiene crudo Rubiales entre 70 a 75% (v/v) y agua entre 30 a 25% (v/v) tiene una viscosidad inferior a 80 centipoises posibilitando en ese sentido la bombeabilidad del crudo a través de oleoductos maximizando la capacidad de transporte por tubería.

El riesgo ambiental que se tendría al emplear esta tecnología para transporte por oleoducto y/o carro tanque, es que al presentarse una fuga, la velocidad y volumen del derrame sería más crítica dada su gran movilidad, así como la

profunda interacción que tendría con el suelo y agua; como infiltración en aguas subterráneas, rápida difusión a los cuerpos de agua superficiales y alteración de ecosistemas suelo-agua.

Resulta necesario evaluar todo el impacto generado desde la perspectiva ecotoxicológica y su biodegradabilidad a fin de dimensionar los efectos tóxicos causados por agentes contaminantes tanto naturales como sintéticos, a los componentes de los ecosistemas tratando de explicar sus causas y prever sus riesgos probables. (Levin et al., 1989).

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar el análisis del riesgo ambiental de emulsión Rubiales/agua por medio de parámetros ecotoxicológicos y de biodegradabilidad.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las características fisicoquímicas de la emulsión y de sus componentes (crudo y tensoactivo)
- Determinar la ecotoxicidad aguda de la emulsión y sus componentes (crudo y emulgente) en tres organismos indicadores.
- Evaluar la persistencia en el medio ambiente de la emulsión Rubiales y sus componentes (crudo y tensoactivo) con evaluaciones respirométricas de biodegradabilidad rápida.

2. ANTECEDENTES

La tecnología de emulsiones inversas aceite en agua es una de las alternativas tecnológicas de mayor interés para Ecopetrol y su Grupo Empresarial posibilitando el bombeo por oleoducto de crudos pesados y/o extra pesados así como la opción de incorporar a la canasta de productos un combustible alternativo (no convencional) de bajo costo, alta eficiencia en combustión y más amigable con el medio ambiente.

El transporte de crudos pesados y extra pesados se realiza actualmente bajo el esquema de mezcla empleando productos refinados como gasolinas, naftas los cuales reducen la viscosidad hasta los niveles de especificación para bombeo por oleoducto (inferior a 300 centistokes) haciendo costosa la operación de transporte. La alternativa de emulsiones no requiere diluyentes ni calentamiento para hacerlas bombeables a través de una tubería llegando a especificaciones de transporte con un 73% de holgura en el requerimiento viscosidad. Esta se constituye en la principal razón para que Ecopetrol implemente la tecnología de emulsiones como la alternativa de mayor conveniencia para evacuar la producción incremental hacia los puertos de exportación y refinerías y no depender de estos diluyentes.

Para la implementación de la tecnología de emulsiones es indispensable establecer el impacto ambiental, conocer particularmente los aspectos del riesgo ambiental mediante estudios eco toxicológicos y de biodegradabilidad para atender contingencias y con ello dar cumplimiento a las políticas de Ecopetrol “compromiso con el medio ambiente” así como integrar los resultados de este estudio para completar la información de los requerimientos de la norma NTC 4435 ICONTEC que define los lineamientos del de las fichas técnicas –MSDS

relacionadas con el manejo, acarreo y transporte de productos peligrosos y no peligrosos.

La información que aportarán los estudios del riesgo ambiental son importantes si se tiene en cuenta que durante las etapas de almacenamiento y transporte existe alta potencialidad de derrames a través de fugas y roturas de líneas de flujo, que ocurren en gran parte por acciones violentas de los grupos insurgentes y con menor frecuencia por afectación natural o accidentalidad, siendo necesario contar con información confiable que permita tomar correctivos oportunos, pertinentes y ambientalmente efectivos.

Es el caso también de los transportadores comerciales (gandolas y carro tanques) que acarrean este tipo de producto que están expuestos a volcamiento, fuga o derrame tanto en el sitio donde realizan el trasiego desde los centros de acopio hasta su destino final, con lo cual es preciso contar con la información del riesgo ambiental que puede generar el producto, con el fin de emprender las acciones de contingencia correspondientes acorde a las Normativas que regulan el transporte de Productos Químicos (Peligrosos y No peligrosos) en las cuales entre otras, se cita en el numeral 4 de los artículos 3o. y 5o. del Decreto 070 de enero de 2001 "Por el cual se modifica la estructura del Ministerio de Minas y Energía", estableciendo que corresponde a dicha entidad dictar, adoptar y hacer cumplir los reglamentos y las disposiciones constitucionales, legales y reglamentarias, relacionadas con el transporte, refinación, distribución, procesamiento, beneficio y comercialización de los recursos naturales no renovables, en los términos previstos en las normas legales vigentes. Igualmente el Decreto 1609/2002 tiene por objeto establecer los requisitos técnicos y de seguridad para el manejo y transporte de mercancías peligrosas por carretera en vehículos automotores en *MSDS*¹: todo el territorio nacional, con el fin de minimizar los riesgos, garantizar la

¹ Tomada del idioma Inglés significa Material Safety Data Sheet que para efectos de la Norma es equivalente a Hoja de Seguridad de Materiales y Productos

seguridad y proteger la vida y el medio ambiente, acorde a las definiciones y clasificaciones establecidas en la Norma Técnica Colombiana NTC 1692 "Transporte de mercancías peligrosas. Clasificación, etiquetado y rotulado".

Desde el año 2000, Ecopetrol ha venido realizando esfuerzos para ejercer sus operaciones con mayor responsabilidad y con ello reducir el riesgo de demandas interpuestas por parte de las comunidades afectadas por los derrames de hidrocarburo, (*derrames de tanques, líneas de flujo, etc.*). Igualmente, la Empresa busca minimizar la penalización por parte de las entidades ambientales, siendo un tema de alta prioridad, normatizar todas sus operaciones y de esta manera eliminar la ocurrencia de estas acciones.

La caracterización ecotoxicológica aguda por medio de una batería de bioensayos para cualquier tipo de producto, sustancia o mezcla, establece los elementos de evaluación y cuantificación del riesgo que el producto puede ocasionar en el ambiente acuático, considerando efectos nocivos a los organismos cuando son expuestos en condiciones agudas (respuesta severa y rápida) durante un período de tiempo y a concentraciones determinadas.

Además, en sistemas que operan en continuo (como estaciones o áreas operativas, en general) permiten una aproximación de predicción del impacto ambiental en relación con los ecosistemas acuáticos, mediante la formulación de un mecanismo de control de calidad o sistema de alarma por descarga a algún cuerpo de agua receptor (nivel de daño directo a la biota presente en él y al uso potencial del mismo).

Estas pruebas se han venido realizando en Ecopetrol para establecer el riesgo asociado a derrames de crudos y mezclas de hidrocarburos, pero aún no se han realizado para las emulsiones formuladas para transporte. Se tienen indicios que

la toxicidad causada por sistemas emulsionados aumentan el daño a ecosistemas tanto de suelo como de agua.

La alternativa de transporte de crudos pesados emulsionados en Colombia no ha sido aún implementada por lo que no se tienen antecedentes documentados del efecto generado bajo un escenario de derrame, lo que se espera de este trabajo es tener los estudios que soporten los efectos causados para desarrollar los controles, estrategias y contingencias más apropiadas.

2.1 JUSTIFICACIÓN

La operación de transporte por oleoducto, buque y carrotanque es una actividad con alto riesgo por las fugas y derrames que genera modificaciones de las características físico químico y biológicas del agua y el suelo. De igual modo como consecuencia causa la afectación de las poblaciones y comunidades del entorno (afectación de la salud, el paisaje, alteración de sus ingresos, entre otros).

Todos los productos de Ecopetrol (refinados y no refinados) para su comercialización requieren disponer de una Ficha Técnica de Seguridad (MSDS) que describe las características del producto, además de los requerimientos de la normativa ambiental colombiana (Decreto 1609/2002 “Transporte terrestre de mercancías peligrosas” Ministerio de Transporte, Ley 55/93 NTC 1692 “Programa Manejo de Combustibles, Aceites usados y Materiales Peligrosos, “Resolución 2499/02 Ministerio de Transporte “Manifiesto de Carga”).

La emulsión Rubiales probada como alternativa de transporte de crudos pesados y extrapolados no tiene una ficha técnica de seguridad que cubra la totalidad de los 16 requisitos de la norma NTC 4435 entre los cuales está la ecotoxicidad y biodegradabilidad.

Debido al riesgo potencial asociado a la operación y las cada vez más exigentes normativas ambientales, se requiere disponer de información confiable que permita conocer los efectos generados por la exposición del hidrocarburo emulsionado en el medio ambiente y de esta manera mitigar los efectos negativos para retornarlos a su uso habitual.

En este proyecto se plantea el estudio de la ecotoxicidad y biodegradabilidad de la emulsión Rubiales para establecer el riesgo ambiental asociado a su uso. El estudio se realizó mediante evaluaciones sobre la toxicidad aguda y biodegradabilidad de la mezcla y sus componentes, orientado a formular criterios para poder tomar decisiones en caso de derrame. De igual manera éste estudio permite generar instructivos sobre cómo confinar el producto y hasta cual debe ser su tratamiento y disposición final.

La evaluación ecotoxicológica está basada en parámetros comparativos con respecto al blanco “no expuesto”, para conocer el nivel de toxicidad tanto de la emulsión como de sus componentes crudo y agente surfactante por separado, que a su vez permita identificar y/o mejorar la formulación de la emulsión y ajustarla a componentes menos contaminantes y más amigables con el medio ambiente.

Las evaluaciones de biodegradabilidad mediante pruebas respirométricas, permiten establecer el potencial de transformación de una sustancia por vía biológica y por ende su posible persistencia en el ambiente, cuyo resultado complementa la evaluación ecotoxicológica ya que indican el impacto potencial en el ambiente que tiene la sustancia.

Los resultados finales de este proyecto permitirán integrar los datos de “Toxicidad” a la Ficha de Seguridad del producto Emulsión Rubiales y producto Emulgrosson; y con ello dar respuesta al requerimiento para liberar el producto tecnológico, cumpliendo todos los estándares y Normativas internas de Ecopetrol y las

entidades ambientales que regulan el transporte de productos peligrosos.

3. MARCO TEORICO

3.1 EMULSIONES

Una emulsión es un sistema conformado por dos fases líquidas inmiscibles, en la cual una de las fases es dispersada en la otra en forma de pequeñas gotas por la acción de un agente surfactante y/o emulgente. Este agente puede estar presente en forma natural en el crudo (ácidos carboxílicos) o ser adicionado. Si está presente en el crudo, generalmente se forman emulsiones “directas”; es decir, emulsiones espontáneas durante las operaciones de extracción y producción del yacimiento (levantamiento); mientras que generalmente las de tipo “inverso” son formuladas y formadas bajo condiciones controladas como alternativa para transporte de crudos pesados y extra pesados por oleoducto. De acuerdo a esto, para que se forme una emulsión directa o inversa deben cumplirse al menos tres aspectos:

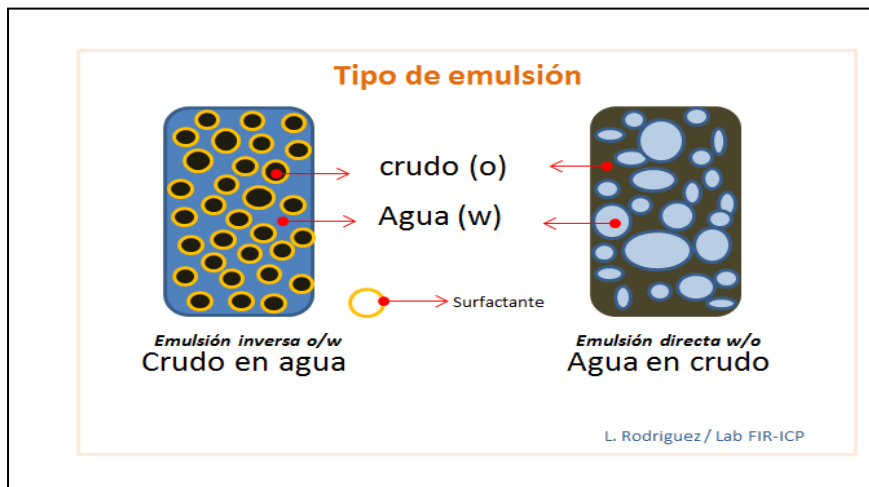
- Presencia de dos fases inmiscibles (aceite-agua)
- Un agente emulgente (surfactante)
- Acción mecánica o perturbación (Agitación)

3.1.1 Emulsión directa (w/o): agua dispersa en crudo. La emulsión directa es como se mencionó anteriormente, aquella formada de manera espontánea en el yacimiento o durante la etapa de extracción del crudo a través de los sistemas de trasiego (bombas). Al existir agua de formación en el yacimiento, ésta es arrastrada conjuntamente con el crudo durante la operación de bombeo a superficie (levantamiento de crudo). La perturbación generada por la bomba (agitación extrema) forma un sistema en el cual el crudo por lo general envuelve al agua, la cual viaja en la matriz de éste en forma de globulillos de heterogéneo

tamaño, y generalmente resultan más viscosas que el crudo original (antes de que se emulsionara con agua).²

3.1.2 Emulsión inversa (o/w): crudo disperso en agua. En este caso la fase continua es el agua donde se encuentra el crudo disperso en finas gotas. Este tipo de emulsión está caracterizado por ser de baja viscosidad, alta movilidad y por ello es empleada como alternativa para transporte de crudos pesados y extra pesados por oleoducto, Ver Figura1. Diagrama tipo de emulsión.

Figura 1. Diagrama descriptivo tipo de emulsión3



Fuente: Rodriguez 2010. Poster Workshop Crudos Pesados, Villavicencio

En una emulsión determinada, las características de flujo dependen del líquido que forme la fase externa, o de si la emulsión es oleo-acuosa o hidro-oleosa. El tipo de emulsión que resulte depende de:

- 1º) Tipo, cantidad y calidad del agente emulgente y/o surfactante
- 2º) Razón entre ingredientes (Relación volumétrica aceite-agua)
- 3º) Orden en que se añaden los ingredientes al mezclarlos (orden de adición).

² Becher, Encyclopedia of Emulsion Technology, Theory and Practice. (1998). Vol.4. Editorial CRC Press.

La dispersabilidad de una emulsión es determinada por la fase continua; si la fase continua es hidrosoluble, -crudo disperso en agua- la emulsión puede ser diluida con agua, si la fase continua es oleo soluble, (agua dispersa en crudo) la emulsión se puede disolver en aceite.³ (Grosso, 1999)

3.1.3 Propiedades de las emulsiones.

Las propiedades de las emulsiones más importantes son:

- Viscosidad de la fase continua
- Tamaño de partícula de la fase dispersa
- Tensión interfacial crudo-agua
- Estabilidad
- Viscosidad del sistema emulsionado

Puesto que las partículas de una emulsión están suspendidas libremente en un líquido, obedecen a la ley de Stokes si éstas no están cargadas. Para muchos fines industriales la definición de estabilidad no incluye los principios de coalescencia de las partículas de la emulsión y la sedimentación. La incorporación de aire en una emulsión puede tener como consecuencia la reducción notable de la estabilidad.

El tamaño y la distribución de las partículas en una emulsión están en función de la concentración del agente emulgente, del orden de adición de la mezcla de fases y del tipo e intensidad de la agitación. Si se agrega mayor volumen o concentración del emulgente se propiciará mayor número de partículas (densidad de gotas) por volumen de fase, el tamaño de las partículas también se reduce y la viscosidad puede ir en aumento.

³ Grosso, J.L., Afanador E., Vidales H., Hernandez F., (1999) Efecto del contenido de aceite en la estabilidad de emulsiones inversas. Jornadas Ciencia y Tecnología- para el Avance de la Ciencia. Ecopetrol Instituto Colombiano del Petróleo.

La tecnología de emulsiones ICP está basada en la dispersión de un hidrocarburo pesado y/o extra pesado en agua. La dispersión del hidrocarburo a escala laboratorio se lleva a cabo en dos etapas: En una primera fase, a partir de unas condiciones específicas de agitación mecánica se logra una dispersión con distribución de tamaño de partícula promedio de 25 micras y en una segunda etapa (agitación alto corte) se obtiene una dispersión con tamaño medio de 10 micras. Con ello, las dispersiones formadas en la primera y segunda fase se mezclan obteniéndose una emulsión de tipo bimodal de muy baja viscosidad y alta estabilidad, condiciones necesarias para lograr las condiciones de movilidad en tuberías (oleoductos). A escala planta piloto esto se logra en un set de mezcladores en línea en una sola fase del proceso o en línea.

3.1.3.1 Viscosidad. Es la propiedad física que relaciona el esfuerzo o resistencia a fluir de una sustancia. Este parámetro está altamente influenciado por la temperatura y velocidad de deformación.

3.1.3.2 Tensión superficial. Las fuerzas cohesivas entre las moléculas de un líquido, son las responsables del fenómeno conocido como tensión superficial. Las moléculas de la superficie no tienen otras iguales sobre todos sus lados, y por lo tanto se cohesionan más fuertemente, con aquellas asociadas directamente en la superficie. Esto forma una película de superficie, que hace más difícil mover un objeto a través de la superficie, que cuando está completamente sumergido.

La tensión superficial, se mide normalmente en dinas/cm., y es la fuerza que se requiere en dinas para romper una película de 1 cm. de longitud. Se puede establecer de forma equivalente la energía superficial en ergios por centímetro cuadrado. El agua a 20°C tiene una tensión superficial de 72.8 dinas/cm comparada con 22.3 para el alcohol etílico y 465 para el mercurio⁴.

⁴ Becher, Encyclopedia of Emulsion Technology, Theory and Practice. (1998). Vol.4. Editorial CRC Press.

3.1.3.3 Agente emulgente y/o surfactante. Los tensoactivos, emulgentes o surfactantes son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases (p.ej., dos líquidos insolubles uno en otro). El agente emulgente o surfactante es también denominado “agente de acción superficial”. Con frecuencia se usa incorrectamente el término "surfactante". Los emulgentes forman un grupo de la clase general de agentes de actividad superficial. Otros grupos son los agentes humectantes, solubilizadores, detergentes, agentes de suspensión.

Los emulgentes se emplean en la formulación de emulsiones para facilitar la dispersión de una fase en la matriz de la otra fase y dar estabilidad a la emulsión formulada. Estos efectos se producen por la reproducción de la tensión interfacial entre las dos fases y por acción coloidal protectora, respectivamente. En general, los emulgentes son sustancias muy complejas y cuanto más complejas funcionan con mayor eficiencia. Este aspecto se tiene en cuenta en durante la práctica de formulación y con frecuencia se usan combinaciones de dos o más emulgentes. Los emulgentes se pueden dividir en iónicos y no iónicos. Los de tipo iónico constan de un grupo lipófilo orgánico y un grupo hidrófilo. Estos a su vez se subdividen en aniónicos y catiónicos, según sea la naturaleza del grupo activo. Ordinariamente se considera que la porción lipófila de la molécula es la porción de actividad superficial. (Ver Figura 2, Emulsificante: fuerzas que gobiernan su acción)

Como es de suponer, no son mutuamente compatibles los agentes aniónicos y catiónicos de actividad superficial, pues en virtud de las cargas iónicas tienden a neutralizarse entre sí y se anula su actividad superficial.

Los emulgentes no iónicos son totalmente covalentes y no tienen ninguna tendencia a la ionización. Por consiguiente, pueden asociarse con otros agentes no iónicos de actividad superficial y con agentes aniónicos o catiónicos. Los de

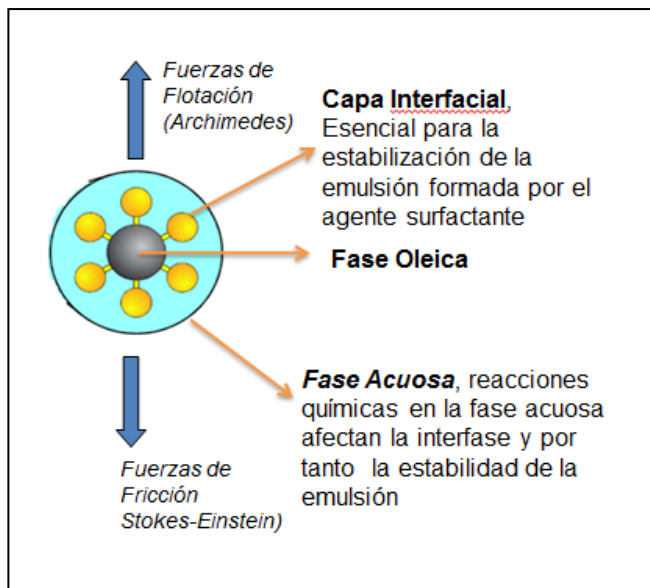
tipo no iónicos son más inmunes contra la acción de electrolitos que los agentes aniónicos de actividad superficial.

De las diversas propiedades de los emulgentes, una de las más importantes es el equilibrio hidrófilo-lipófilo. Este es una expresión de atracción simultánea relativa de un agente de acción superficial con respecto al agua y al aceite.

El equilibrio hidrófilo-lipófilo de un emulgente determina el tipo de emulsión que tiende a ser formada.

La Solubilidad de un emulgente es de suma importancia en la preparación de concentrados emulsionables. Es preciso que el emulgente permanezca disuelto en cualquier condición de almacenamiento. Con frecuencia es posible aumentar la solubilidad de un emulgente con algún co-emulsivo. También son usuales diversos disolventes como conjugadores o co-disolventes.

Figura 2. Emulsificante: fuerzas que gobiernan su acción



Fuente: Becher 1998

3.2. ECO-TOXICOLOGÍA

El eco-toxicología estudia los efectos tóxicos causados por agentes contaminantes tanto naturales como sintéticos, a los componentes de los ecosistemas, tratando de explicar sus causas y prever sus riesgos probables. Los agentes contaminantes son sustancias cuya ocurrencia en la naturaleza es al menos en parte el resultado de la actividad humana y que tienen un efecto deletéreo en los organismos vivos.

La mayoría de procesos industriales se caracterizan por ser una fuente habitual de contaminantes que pueden suponer o no riesgo ambiental. El riesgo ambiental que pueda suponer un contaminante dependerá de su toxicidad inherente (capacidad de causar algún efecto nocivo sobre un organismo vivo), del grado de exposición de los organismos, que a su vez dependerá de la cantidad que ingrese al ecosistema, de cuánto pase a los distintos compartimientos del ecosistema, de sus propiedades físicas y químicas y la de sus productos de transformación, de su persistencia y de las características del ecosistema⁵.

Para evaluar el riesgo ambiental que suponen los compuestos contaminantes que entran en los ecosistemas se requieren de análisis físicos y químicos que nos ayudan a determinar su cantidad y distribución de estos el ambiente. Sin embargo, de central importancia, para evaluar si hay o no un efecto nocivo de un compuesto sobre los organismos vivos, es la relación entre la cantidad de químico a la que un organismo es expuesto, naturaleza y el consecuente grado de los efectos tóxicos.

⁵ Newman M.C. & M.A. Unger. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology 2nd Edition. Lewis (Eds). CRC press. Florida U.S.

La relación dosis-respuesta provee las bases para la evaluación de los peligros y riesgos que presenten los químicos que entran a los ecosistemas⁶. Para hallar esta relación es indispensable hacer pruebas de toxicidad (bioensayos) las cuales evalúan el efecto de la concentración del compuesto sobre los sistemas biológicos midiendo diferentes respuestas físicas agudas o crónicas en diferentes organismos⁷.

No obstante, hay un creciente interés en la comunidad científica por la medición de respuestas crónicas relacionadas con los rasgos demográficos de las poblaciones naturales (ej. crecimiento, reproducción, comportamiento, función inmune), la manera más común de medir la toxicidad de un producto que entra en un sistema natural sigue siendo la muerte (toxicidad aguda).

3.2.1 Compuestos Contaminantes. Un compuesto contaminante es simplemente aquella sustancia que se encuentra presente donde no debería estar o en concentraciones que sobrepasan las concentraciones ambientales históricas⁸.

Los compuestos contaminantes se pueden dividir en 2 categorías básicas: (1) Inorgánicos, Contaminantes de fuentes minerales y (2) Orgánicos, contaminantes obtenidos de organismos vivos.

Los contaminantes inorgánicos se pueden definir como compuestos de base mineral que típicamente no contienen carbono elemental. Los metales son la clase más grande de contaminantes inorgánicos. Los metales se caracterizan por su apariencia brillante, maleabilidad, ductilidad, y conductividad. Los metaloides, de

⁶ Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly y D.B. Peakall. 2006. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis group (Eds). Florida U.S.

⁷ APHA. 2012. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: Ed Andrew D. Eaton, Lenore S. Clesceri; Arnold E. Greenberg. 22nd Ed.

⁸ Chapman, P.M. (2007) Determining when contamination is pollution - weight of evidence determinations for sediments and effluents. Environment international, 33, 492–501.

apariencia menos brillante, semiconductores, y que incluyen elementos como el silicón, y el arsénico, son considerados también como metales en la literatura ambiental (Newman & Unger, 2003). Otros contaminantes inorgánicos de gran importancia son los gases inorgánicos como el dióxido de carbono (CO_2), óxidos de nitrógeno (NO_x), y dióxido de sulfuro (SO_2). Estos gases son producidos por la quema de combustibles fósiles desde fuentes estacionarias o móviles y algunos están dentro de los gases de efecto invernadero más potentes y persistentes (ej. Dióxido de carbono atmosférico (CO_2) y óxido nitroso (N_2O))⁹.

Se consideran contaminantes orgánicos aquellos que contienen carbón y que involucran al menos un enlace covalente C-H (ej. Metano (CH_4), pero no Dióxido de carbono (CO_2)). Una excepción a esta regla es el grafito. Incluyen aquellos intencionalmente usados como venenos (ej., insecticidas y herbicidas) y aquellos que son productos, subproductos, o desechos de procesos industriales¹⁰.

Dentro de los contaminantes orgánicos que más se destacan se encuentran los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), Bi Feniles Poli-clorinados (BPC), bi Eniles Poli-Brominados (BPB), Clorofluorocarbonados (CFC), Alquenos Organoclorados, Fenoles clorinados, Pesticidas organo clorados, Dibenzo Dioxinas Policlorinadas (DDPC), Dibenzofuranos policlorinados (DFPC), Pesticidas organofosforados, entre otros.

3.2.2 Compuestos del petróleo crudo y su toxicidad. El petróleo crudo es en esencia una mezcla compleja. Esta mezcla tiene una proporción altamente variable de hidrocarburos con rangos desde 97% en peso, en crudos livianos hasta un 50% en crudos pesados y bitúmenes, y puede contener también sulfuro,

⁹ Shang, Q., Yang, X., Gao, C., Wu, P., Liu, J., Xu, Y., Shen, Q., Zou, J. & Guo, S. (2011) Net annual global warming potential and greenhouse gas intensity in Chinese double rice-cropping systems: a 3-year field measurement in long-term fertilizer experiments. *Global Change Biology*, 17, 2196–2210.

¹⁰ Newman M.C. & M.A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology* 2nd Edition. Lewis (Eds). CRC press. Florida U.S.

oxígeno, nitrógeno y algunos compuestos metálicos como vanadio, níquel, hierro, cobre etc.¹¹ La composición elemental del petróleo varía generalmente dentro de los rangos consignados en la Tabla 1.

Tabla 1. Rangos generales de la composición elemental del petróleo crudo

Elemento	Porcentaje en Peso
Carbono	83-87%
Hidrógeno	10-14%
Nitrógeno	0.1-2%
Oxígeno	0.05-1.5%
Sulfuro	0.05-6%
Metales	<1000ppm

Fuente (tomado de Speight 1999)

La mayoría de petróleos crudos contienen químicos que representan un peligro potencial para el medio ambiente. Dentro de estos podemos destacar 3 grupos principales: (1) Los hidrocarburos mono aromáticos, (2) los hidrocarburos aromáticos poli cíclicos y (3) los metales.

Hidrocarburos mono aromáticos (HMA): Los hidrocarburos mono aromáticos (HMA), incluyen entre otros, el Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno (BTEX). Estos compuestos se caracterizan por ser volátiles, solubles y tener bajo peso molecular. En el ambiente, se particionan rápidamente del crudo y se evaporan o disuelven en el agua. Los BTEX están entre los compuestos que más rápido desaparecen de aguas y sedimentos cuando se ocasiona un derrame de crudo (Hayes et al. 1992). Sin embargo, la agencia para la protección ambiental de los estados unidos (USEPA) los ha clasificado como contaminantes prioritarios debido a que aún en muy bajas cantidades los BTEX pueden causar daño al

¹¹ Speight, J.G. (1999) The Chemistry and Technology of Petroleum. 3rd Edition. Marcel Dekker, New York.

hígado, riñón, llevar a la parálisis del sistema nervioso central y causar disfunción reproductiva (Murata, Tsujikawa, & Kawanishi 1999; Brautbar & Williams 2002).

Hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (HAP):

Los hidrocarburos aromáticos poli cíclicos –HAP- son contaminantes orgánicos ampliamente distribuidos. Se originan tanto de las actividades humanas (ej. Industria, combustión, derrames de crudo) como de procesos naturales (volcanismo, fuegos naturales)¹².

Los HAPs son compuestos químicos lipofílicos, no polares, que están compuestos por dos o más anillos bencénicos. Debido a su hidrofobicidad, tienden a sorberse al material orgánico particulado y terminan en suelos y sedimentos de ríos, lagos y océanos.

La agencia para la protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha identificado 16 de estos HAPs como contaminantes prioritarios, pues pueden representar alto riesgo para el ambiente y la salud humana.

Los principales efectos de estos contaminantes son narcóticos, sin embargo; se ha comprobado efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos¹³¹⁴¹⁵¹⁶.

¹² Lima, A.L.C., Farrington, J.W. & Reddy, C.M. (2005) Combustion-Derived Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment—A Review. *Environmental Forensics*, 6, 109–131.

¹³ Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D'Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C. & De Flora, S. (2002) Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutation research*, 515, 125–34.

¹⁴ Umbuzeiro, G. a, Franco, A., Martins, M.H., Kummrow, F., Carvalho, L., Schmeiser, H.H., Leykauf, J., Stiborova, M. & Claxton, L.D. (2008) Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutation research*, 652, 72–80.

¹⁵ Shailaja, M.S., Rajamanickam, R. & Wahidulla, S. (2006) Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 143, 174–7.

¹⁶ Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T.K., Scholz, N.L. & Incardona, J.P. (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 88, 121–7.

Metales: Múltiples tipos de metales pueden estar presentes en el petróleo crudo. Algunos de ellos pueden representar un serio riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Estos pueden ser carcinogénicos y afectar el sistema nervioso central (Hg, Pb, As), el riñón (Hg, Pb, Cd, Cu) o la piel, huesos y dientes (Ni, Cd, Cu, Cr)¹⁷.

3.3 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Estos ensayos están diseñados para evaluar los efectos de un compuesto, elemento o mezcla química en uno o varios organismos seleccionados, expuestos a un rango de concentraciones durante un tiempo corto (Rad et al. 1995). Dentro de los criterios de medición (puntos finales) más comunes en los test de toxicidad aguda están:

1. Peces, (mortalidad)
2. Invertebrados, (inmovilidad y mortalidad)
3. Crecimiento, (algas y plantas).

Los test de toxicidad aguda están diseñados para proporcionar información dosis-respuesta expresada como la concentración del compuesto que es letal (CL₅₀) o causa un efecto (CE₅₀) en el 50% de los organismos de ensayo expuestos dentro de un periodo predeterminado de tiempo (24-a 120 horas) dependiendo de la especie la cual se estima¹⁸.

Normalmente, los test de toxicidad agudos constan de un control y como mínimo 5 concentraciones diferentes de la muestra problema con un factor de dilución de

¹⁷ Zevenhoven, R. & Kilpinen, P. (2002) Control of Pollutants in Flue Gases and Fuel Gases, 2nd ed (eds R Zevenhoven and P Kilpinen). The Nordic Energy Research Programme Solid Fuel Committee, Espoo.

¹⁸ US EPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms 5th Edition. EPA-821-R-02-012.

0.5 %. Antes de iniciar el test se realiza un pretest de determinación de rangos en el que grupos pequeños de organismos son expuestos a varias diluciones ampliamente espaciadas siguiendo una serie logarítmica (ej. 1000, 100, 10, 1, 0.1), por un periodo de 8 a 24 h. Una vez se determina el rango en el cual cae la concentración letal o concentración efectiva media (CL_{50}/CE_{50}) se realiza la prueba definitiva tratando que las concentraciones definitivas abarquen el espectro desde la concentración más baja donde hay una mortalidad del 100% de organismos hasta la concentración más alta donde sobrevivieron todos los organismos. Como se observa en el ejemplo de la Tabla 2, se muestra en los recuadros la concentración más baja donde hay un efecto del 100% y la más alta donde no hay efecto.

Tabla 2. Concentración letal o efectiva media (CL_{50}/CE_{50}) y la posterior selección de las concentraciones a utilizar en el test definitivo.

Test determinación de rangos		Test definitivo
Concentración	Respuesta (% mortalidad)	Concentración
1000	100	100
100	100	50
10	30	25
1	0	12.5
0.1	0	6.25
0.01	0	0.3125

Fuente: USEPA 2002

3.4 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD DE MEZCLAS

La mayoría de ensayos toxicológicos se realizan para determinar los efectos nocivos de un compuesto simple. Sin embargo, es frecuente, que algunos de los materiales de ensayo contengan apreciables cantidades de otros compuestos o sub productos de procesos de industriales o manufacturas.

Algunos productos o formulaciones pueden tener solventes como vehículo, emulsificadores o estabilizantes. En el análisis de impacto ambiental, si se quiere hacer una estimación del impacto toxico de una sustancia o producto, los ensayos toxicológicos deben ser hechos con el producto o sustancia tal y como es liberado al ambiente¹⁹. Esto es porque la exposición a mezclas puede resultar en interacciones toxicológicas²⁰.

Una interacción toxicológica es aquella en la cual la exposición a dos o más químicos resulta en una respuesta biológica cualitativamente o cuantitativamente diferente a la esperada por la acción de cada uno de los químicos.

Las 4 interacciones más comunes entre químicos son:

- **Efecto aditivo:** Ocurre cuando el efecto combinado de los dos químicos es igual a la suma de sus efectos individuales
- **Efecto sinérgico:** Ocurre cuando el efecto combinado de dos o más químicos es mucho mayor a la suma de sus efectos individuales.
- **Potenciación:** Ocurre cuando un químico solo tiene toxicidad cuando está acompañado de otro químico

¹⁹ Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly y D.B. Peakall. 2006. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis group (Eds). Florida U.S.

²⁰ Xu, X., Li, Y., Wang, Y. & Wang, Y. (2011) Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. Toxicology in vitro, 25, 294–300.

- **Antagonismo:** Ocurre cuando dos o más químicos interfieren con la acción de cada uno, pudiendo de este modo disminuir la toxicidad²¹.

3.5 BIODEGRADABILIDAD

La biodegradabilidad es un parámetro determinante en el comportamiento ambiental de las sustancias químicas y una propiedad deseable de los productos que se liberan en grandes cantidades al medio natural, tales como detergentes, pesticidas, materiales de embalaje, etc. Mediante el proceso conocido como biodegradación, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos, la mayoría de las veces en productos menos tóxicos que los compuestos originales²². La biodegradación puede ser ‘primaria’ y conducir a simples alteraciones estructurales del compuesto, o bien implicar su conversión a productos inorgánicos de bajo peso molecular y constituyentes celulares, en cuyo caso se denomina ‘biodegradación última’ o ‘mineralización’ como se representa en la ecuación:

Compuesto orgánico + O₂ microorganismos → CO₂ + H₂O + sales + biomasa

La biodegradabilidad ha sido definida como la capacidad intrínseca de una sustancia a ser transformada en una estructura química más simple por vía microbiana (Trautwein & Kümmerer. 2012.). Para su evaluación se han diseñado una serie de pruebas, las cuales buscan cuantificar el grado de persistencia de estructuras químicas en ambientes naturales o industriales²³.

²¹ Newman M.C. & M.A. Unger. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology 2nd Edition. Lewis (Eds). CRC press. Florida U.S.

²² Pedrazzani R., Ceretti E., Zerbini L., Casale R., Gozio E., Bertanza G., Gelatti U., Donato F., Feretti D. (2012). “Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations”. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 84: pgs 274-281.

²³ OECD-201. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo. 2006. Guidelines for the testing of chemicals Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

3.5.1 Biodegradabilidad Rápida. El principio general de estas pruebas es la incubación aerobia estática, o por lote, de una cantidad reducida de biomasa en un medio mineral, a pH neutro y a una temperatura entre 20 y 25°C. La sustancia en estudio se añade a una concentración definida, como única fuente de carbono y energía. El inóculo consiste en una población microbiana natural que no haya sido expuesta al compuesto de prueba²⁴.

Estas pruebas pueden aplicarse a una gran variedad de compuestos, debido a que se basan en el seguimiento de parámetros directos y no específicos a la molécula que se estudia, como el Carbono Orgánico Disuelto (COD), o bien de parámetros indirectos correlacionados con la mineralización de la molécula, ya sea como la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) o la producción de CO₂²⁵.

Simultáneamente a la prueba se corren varios testigos, que aseguran que los resultados no se deben a una degradación abiótica, a la eliminación física de la molécula por adsorción, a la toxicidad de la sustancia o a una actividad deficiente del inóculo; ésta última se evalúa con moléculas de referencia fácilmente biodegradables, tales como la anilina, el acetato de sodio o el benzoato de sodio²⁶

Los resultados de los ensayos respirométricos se corrigen con la respiración endógena del inóculo, la cual se mide en ausencia de la sustancia de prueba. El nivel límite de biodegradación exigido por estas pruebas es una disminución del 70% cuando se monitorea el COD, y del 60% de la Demanda Teórica de O₂ (ThO₂) o de la Producción Teórica de CO₂ (ThCO₂) cuando se trata de pruebas respirométricas, valores que deben alcanzarse en un período de 28 días. ThO₂ y

²⁴ Boethling R.S., Lynch D.G., Thom, G.C. (2003) "Predicting ready biodegradability of premanufacture notice chemicals". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 837–844.

²⁵ Jurado E, Fernández-Serrano M, Núñez-Olea J, Lechuga M, Jiménez JL, Ríos F (2011). "Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation tests". *Water Environ Res.*, 83, 154-16.

²⁶ Liwarska-Bizukojc E, Gendaszewska D. (2013). "Removal of imidazolium ionic liquids by microbial associations: Study of the biodegradability and kinetics". *J Biosci Bioeng.* 115, 71-75

ThCO₂ se calculan a partir de la estructura química de la molécula considerando una biodegradación total de la misma²⁷.

Para un resultado positivo, y a excepción de la prueba MITI I (301 C), los niveles límite de biodegradación deben además alcanzarse en los diez días que se suceden al final de la fase de latencia, la cual se define arbitrariamente como el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación del 10%. A este criterio se le conoce como 'la ventana de los 10 días'. El nivel máximo de biodegradación presentado al cabo de 28 días, la duración de la fase de latencia (tL) y el tiempo de vida media (t1/2), definido como el tiempo transcurrido para obtener una biodegradación del 50%, se reportan como resultado de las pruebas.

3.6 MARCO LEGAL

En este apartado se referencian las normas y reglamentos que rigen la protección, conservación, uso sostenible y manejo de recursos naturales en Colombia, en especial, los cuerpos de agua superficiales, contempladas dentro del objetivo principal del presente estudio. Una de éstas normas es el decreto 3930 de 2010, el cual, derogó parcialmente el decreto 1594 del 1984, y para efectos del presente trabajo, soporta la simulación de calidad de agua de sistemas hídricos, tanto lóticos como lénticos, la establece como un requerimiento dentro de los trámites para la obtención y renovación de permisos de vertimiento en Colombia.

Ley 23 de 1973

Principios fundamentales sobre prevención y control de la contaminación del aire, agua y suelo y otorgó facultades al Presidente de la República para expedir el Código de los Recursos Naturales.

²⁷ OECD-203. 1992. Guidelines for the testing of chemicals. Fish, Acute Toxicity Test.

Decreto Ley 2811 de 1974

Código nacional de los Recursos Naturales Renovables RNR y no renovables y de protección al medio ambiente. El ambiente es patrimonio común, el estado y los particulares deben participar en su preservación y manejo. Regula el manejo de los RNR, la defensa del ambiente y sus elementos.

Ley 99 de 1993

Crea el Ministerio del Medio Ambiente y Organiza el Sistema Nacional Ambiental (SINA). Reforma el sector Público encargado de la gestión ambiental. Organiza el sistema Nacional Ambiental y exige la Planificación de la gestión ambiental de proyectos. Los principios que se destacan y que están relacionados con las actividades portuarias son: La definición de los fundamentos de la política ambiental, la estructura del SINA en cabeza del Ministerio del Medio Ambiente, los procedimientos de licenciamiento ambiental como requisito para la ejecución de proyectos o actividades que puedan causar daño al ambiente y los mecanismos de participación ciudadana en todas las etapas de desarrollo de este tipo de proyectos.

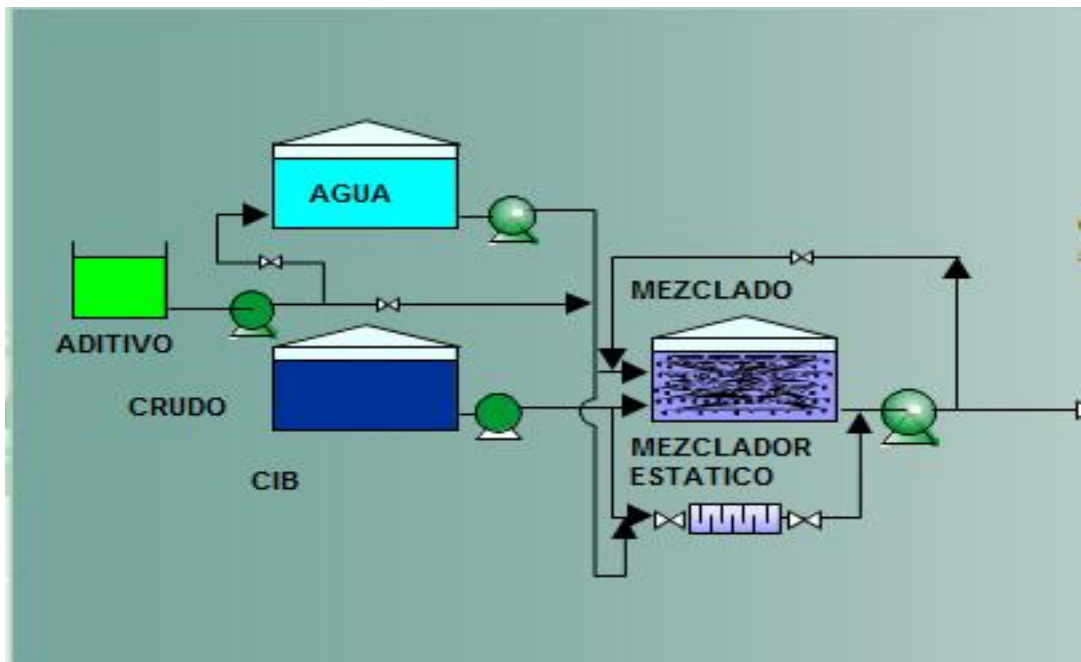
4. METODOLOGÍA

4.1 PREPARACIÓN DE EMULSIÓN RUBIALES

En un circuito de pruebas fluido dinámicas-CPFD- del Instituto Colombiano del Petróleo, fue preparada la “Emulsión Rubiales” la cual está compuesta por crudo Rubiales, 80% (V); agua, 20%(V) y un surfactante o emulgente, “Emulgrosson”, 1300 ppm, siguiendo el protocolo de la patente Ecopetrol establecido como alternativa para transporte de crudos pesados y extra pesados por oleoducto.

La preparación de la emulsión Rubiales en el MCPFD se presenta en la Figura 3

Figura 3. Preparación de la emulsión Rubiales en el MCPFD



Fuente: R. Barrero, L. Rodriguez, E. Patiño, Tecnología emulsiones ICP.

Una vez preparada, se tomó una muestra la cual fue caracterizada al igual que el crudo y el aditivo, en el laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología del Instituto colombiano del petróleo-Ecopetrol-ICP. La emulsión obtenida es de tipo inverso, es decir, crudo Rubiales, 80% (v) disperso en finas gotas (dispersión bimodal) en agua (aprox. 20% (v) empleando Emulgrosson como agente emulgente, a una concentración de 1300 ppm.

4.1.1 Caracterización de los productos caso de estudio: En la Tabla 3 Figura 3b se relacionan las metodologías y equipos empleados en la caracterización fisicoquímica de la emulsión Rubiales y sus componentes.

Tabla 3. Metodologías empleadas para la caracterización de los productos caso de estudio

Prueba	Metodología
Comportamiento reologico fluidos alta viscosidad	UST-FIR-I-008 “Comportamiento Reológico de Fluidos de Alta Viscosidad”
Tensión interfacial	UST-FIR-I-001 “Tensión interfacial soluciones acuosas, poliméricas e hidrocarburos líquidos”
Tensión superficial	UST-FIR-I-002 “Tensión Superficial en productos del petróleo, productos químicos y soluciones acuosas”
Distribución tamaño partícula	UST-FIR-I-014 “Distribución y Tamaño de Partícula”
Estabilidad estática	UST-119-P-024 “Procedimiento técnico de ensayo para la Estabilidad Estática a Suspensiones y Emulsiones”
Densidad	ASTM
Contenido de agua	UST-119-P-027 “Procedimiento técnico de ensayo para determinar Contenido de agua en Emulsiones de crudos pesados”
CHN (Carbono, hidrogeno, nitrógeno, oxigeno)	ASTM D2591

Fuente: Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología-Ecopetrol-ICP

Equipos empleados:

Microscopio marca Olympus

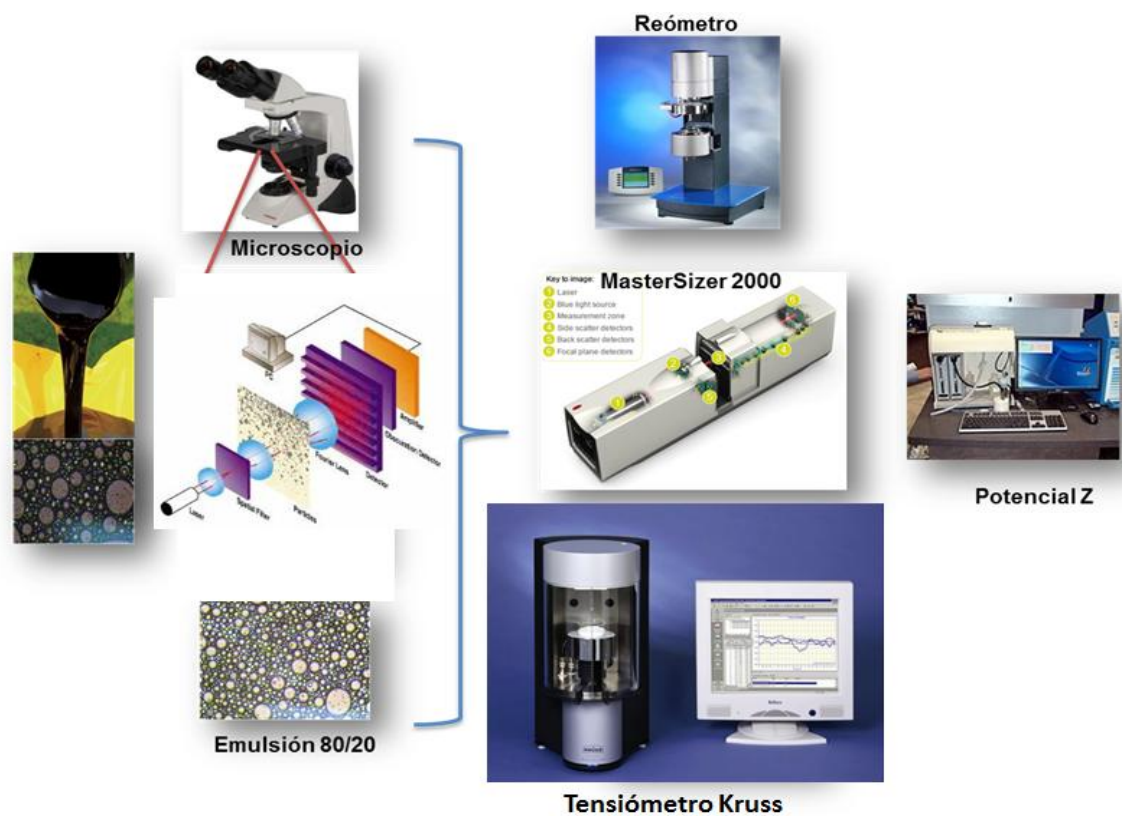
Tensiómetro marca Kruss

Analizador tamaño partícula Mastersizer 2000 marca Malvern

Reómetro MCR502 marca Anton Paar

Potencial zeta marca Horiba

Figura 3b. Equipos empleados en la caracterización fisicoquímica de la emulsion y sus componentes.

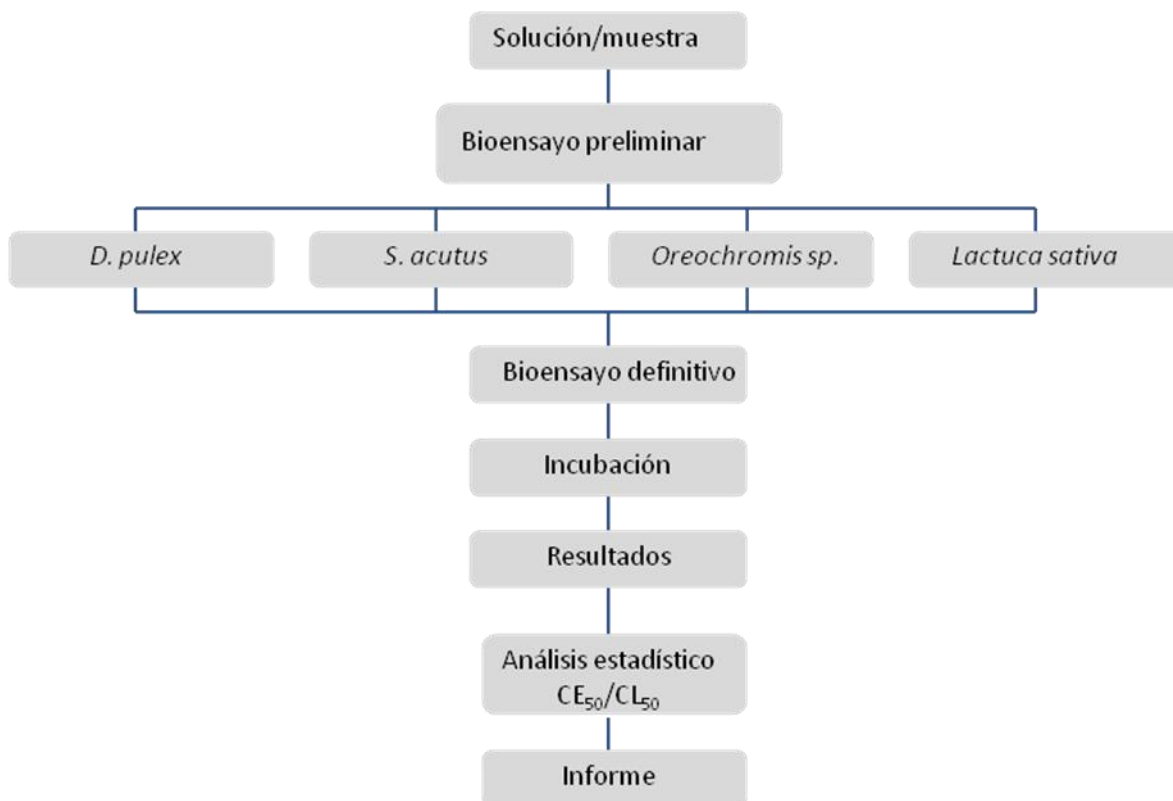


Fuente: Registro fotográfico Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología-Ecopetrol-ICP

4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANALISIS DE ECOTOXICIDAD

La metodología general empleada para realizar la evaluación de la Ecotoxicidad se relaciona en la Figura 4.

Figura 4. Metodología general empleada en la evaluación de Ecotoxicidad.



Fuente: Protocolo Pruebas Toxicidad Laboratorio Biotecnología-ICP 2012

El protocolo para la preparación de las muestras de petróleo crudo, y petróleo crudo emulsionado siguió las recomendaciones de Singer et al. (2000), teniendo en cuenta las modificaciones propuestas por Barron & Ka'aihue (2003). Para la preparación de las diferentes concentraciones de Emulgrosson se siguieron las recomendaciones descritas en el documento guía de la OECD (2000), para ensayos toxicológicos acuáticos con sustancias y mezclas difíciles. (Tabla 4, Figura 5).

Tabla 4. Resumen de especificaciones para la preparación de las soluciones usadas en los test toxicológicos.

Características	Crudo Rubiales (WAF)	Crudo Rubiales + Emulgrosón (CEWAF)	Emulgrosón
			
Agua de Dilución	Agua Cristal®	Agua Cristal®	Agua Cristal®
Tratamientos de Ensayo	Dilución en serie geométrica 0.5 partiendo de una carga inicial elevada	Dilución en serie geométrica 0.5 partiendo de una carga inicial elevada	Dilución en serie geométrica 0.5 partiendo de una carga inicial elevada
Tipo/Tamaño Recipiente de Ensayo	Recipientes de vidrio de 1 litro y 10 litros,	Recipientes de vidrio de 1 litro y 10 litros,	Recipientes de vidrio de 1 litro y 10 litros,
Espacio de Cabeza	20-25% del volumen de la solución	20-25% del volumen de la solución	20-25% del volumen de la solución
Velocidad de mezcla/Profundidad de vortex	200±2 rpm. Sin vortex	Vortex 20-25%	Vortex completo
Tiempo de Mezcla/Sedimentación	24 horas, 1 hora de sedimentación	24 horas, 1 hora de sedimentación	24 horas, no es necesaria sedimentación
Condiciones de Mezcla	Recipientes sellados, mezcla en la oscuridad	Recipientes sellados, mezcla en la oscuridad	Recipientes sellados

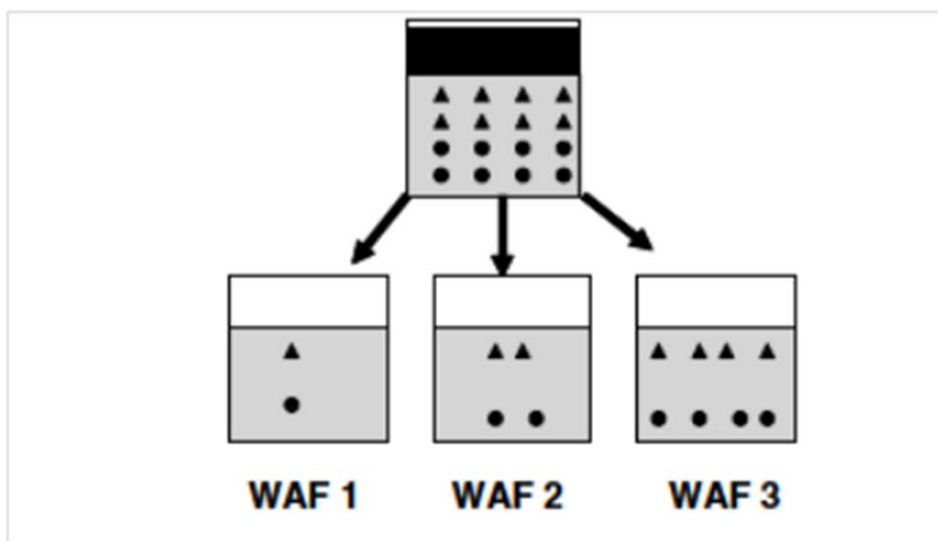
Fuente: Laboratorio Toxicología-Ecopetrol-ICP

En la Figura 5 se relacionan las preparaciones de las muestras fracción adaptada de agua Crudo rubiales –Water Addapted Fraction- (WAF), Fracción adaptada de agua químicamente mejorada –Crude Enhanced Water Addapted Fraction-

CEWAF (Crudo rubiales + Emulgrosson®), y emulgente Emulgrosson® (izquierda a derecha).

Para cada uno de los organismos de ensayo se prepararon fracciones adaptadas de agua (WAF) de crudo y crudo +Emulgrosson® (CEWAF). Tanto para el crudo, como para el crudo + Emulgrosson® se prepararon soluciones únicas concentradas de las que a través de diluciones sucesivas se derivan las concentraciones de exposición tomado con modificaciones de Barron & Ka’aihue²⁸ En la Figura 5 se representan a manera de esquema las diluciones sucesivas: Los triángulos y esferas simbolizan diferentes concentraciones de la componente oleosa en el agua.

Figura 5. Representación de la aproximación de dilución variable aplicada para la preparación de las fracciones adaptadas de agua (WAF, CEWAF).



Fuente: Marin Pollution Bulletin- Mace G. Barron a*, Lisa Ka’aihue b

Cinco concentraciones (más un control) fueron utilizadas para el petróleo crudo (WAF) y el petróleo crudo emulsificado (CEWAF), siendo el más alto nivel de exposición 100% del WAF. De manera similar para el emulsificante

²⁸ Barron, M.G. & Ka’aihue, L. (2003) Critical evaluation of CROSERF test methods for oil dispersant toxicity testing under subarctic conditions. Marine pollution bulletin, 46, 1191–9.

(Emulgrosson®) fueron utilizadas 6 concentraciones de ensayo incluyendo el control. Los niveles de dilución se determinaron experimentalmente realizando pre-tests con cada una de las mezclas de ensayo (Tabla 5)

Tabla 5. Soluciones de ensayo, observaciones visuales y concentraciones de exposición de Crudo Rubiales, Emulsión) y Emulgrosson® empleadas.

Solución Ensayo	Concentraciones definitivas			
	<i>D. Pulex</i>	<i>S. acutus</i>	<i>Oreochromis</i> <i>sp.</i>	<i>L. sativa</i>
	(%WAF 1:18)	(%WAF 1:9)	(%WAF 1:18)	(%WAF 1:9)
Crudo	3.125,	100, 50, 25,	100, 50,	100, 50,
Rubiales	1..562,	12.5, 6.25	25, 12.5,	25, 12.5,
(WAF)	0.781, 0.39,		6.25 0.196	6.25
	0.195			
	(%WAF 1:18)	(%WAF 1:9)	(%WAF 1:18)	(%WAF 1:9)
Crudo	3.125,	100, 50, 25,	12.5, 6.25,	100, 50,
Rubiales +	1..562,	12.5, 6.25	3.125,	25, 12.5,
Emulgrosso	0.781, 0.39,		1.562,	6.25
n (CEWAF)	0.196		0.781	
	50, 25,	100000,500	62.5,	100, 50,
Emulgroson	12.5, 6.25,	00, 25000,	31.25, 25,	25, 12.5,
	3.125 ppm	12500,6500	12.5, 6.25	6.25 ppm
		ppm	ppm	

Fuente: Laboratorio Toxicología-Ecopetrol-ICP

4.3 ORGANISMOS DE PRUEBA PARA ECOTOXICIDAD

Las pruebas de Ecotoxicidad se realizaron empleando cultivo de *Scenedesmus acutus* los cuales se mantuvieron bajo temperatura controlada y agitación tal como se relaciona en la Figura 6. De igual manera fueron empleados cultivos de *Daphnia pulex* confinados en cubas y se adaptó *Oreochromis Sp* en acuario con sistema de aireación. Todas estas pruebas fueron efectuadas en el laboratorio de Ecotoxicología, área de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo.

Figura 6. Cultivos de organismos indicadores empleados en la Evaluación Ecotoxicológica de la Emulsión Rubiales y sus componentes



Cultivo de *Scenedesmus acutus*



Cultivo de *Daphnia pulex*



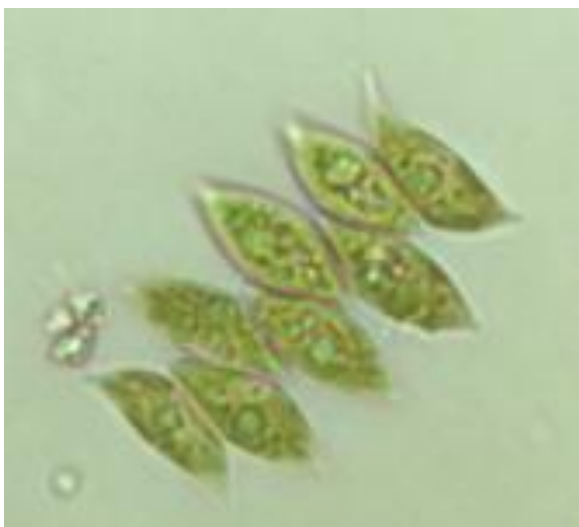
Adaptación de *Oreochromis sp.*

Fuente: Montaje pruebas toxicidad Laboratorio Toxicología-Biotecnología-ICP

4.3.1 *Scenedesmus acutus*. El alga verde *S. acutus* (Figura 7) fue utilizada como organismo de prueba. Los individuos se obtuvieron del cultivo stock del laboratorio de Biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-Ecopetrol).

La cepa fue mantenida en erlenmeyers de 500ml de capacidad en un cultivo continuo que fue renovado cada tercer día para que se mantuviera siempre en fase exponencial. Las algas se mantuvieron en medio estándar Bristol, en un cuarto climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con luz continua (4000 lux aprox.) , asegurando los erlenmeyers en constante agitación en un shaker a 100 rpm. Se realizó regularmente un Test de referencia agudos empleando dicromato de potasio.

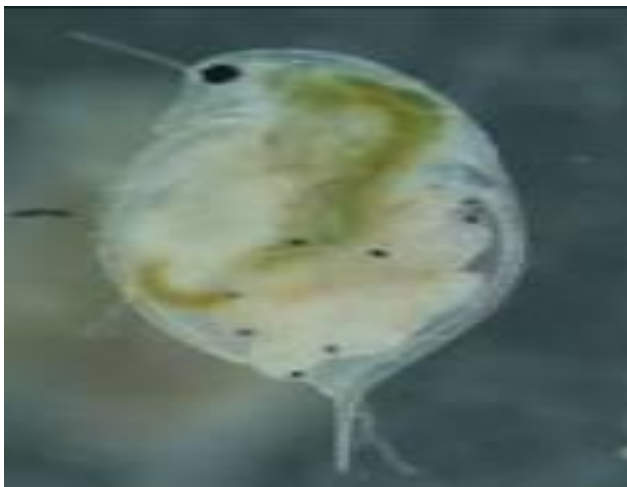
Figura 7. *Scenedesmus acutus*



Fuente: Registro fotográfico Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

4.3.2 *Daphnia pulex*. El crustáceo de agua dulce *D. pulex* fue utilizado como organismo de prueba. Los animales fueron obtenidos del cultivo stock del laboratorio de biotecnología del Instituto Colombiano del Petróleo (ICP-Ecopetrol), donde fueron mantenidos en cultivos continuos de 10 adultos en 2 litros de agua de dilución con una dureza entre 80 y 180 mg CaCO_3/L en un cuarto climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con luz moderada (800 lux aprox.) y un régimen 16:8-h luz: oscuridad. Ver Figura 8.

Figura 8. *Daphnia pulex*



Fuente: Registro fotográfico Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

El agua de dilución se preparó en el laboratorio, utilizando agua de botellones Cristal® y oxigenándolos por una hora mínimo. El agua de los cultivos fue renovada una vez por semana y los organismos fueron alimentados con una suspensión de algas verdes (*Scenedesmus acutus*) a diario. Se realizó regularmente un Test de referencia agudos empleando dicromato de potasio.

4.3.3 *Oreochromis sp.* Este pez de agua dulce (Figura 9) fue utilizado como organismo de prueba. Los animales fueron obtenidos de un cultivo comercial. Al llegar al laboratorio los peces pasan por un proceso de aclimatación que dura 7 días donde fueron mantenidos en acuarios de 70X40 cm con agua de dilución con una dureza entre 80 y 180 mg CaCO₃/L en un cuarto climatizado (22± 2 °C) con luz moderada (800 lux aprox.) y un régimen 16:8-h luz: oscuridad.

Figura 9. Alevinos *Oreochromis sp*



Fuente: Registro fotográfico Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

El agua de dilución se preparó en el laboratorio, utilizando agua de botellones cristal y oxigenándolos por una hora mínimo. El agua de los acuarios fue renovada dos veces durante el proceso de aclimatación y los peces fueron alimentados con pellets de mojarrina dos veces al día.

4.3.4 *Lactuca sativa*. Semillas de lechuga (Figura 10) fueron utilizadas como organismo de prueba. Las semillas fueron obtenidas de la casa comercial de semillas Fercon, entidad que está reconocida por la resolución del ICA No 01660 del 27/05/2008. Según la casa comercializadora, esta semilla tiene un porcentaje de germinación del 85% y una pureza del 99 %.

Figura 10. *Lactuca sativa*



Fuente: Registro fotográfico Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

4.4 ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Para los ensayos de toxicidad aguda se empleó una batería de bioensayos compuesta por 4 especies 3 pertenecientes al medio acuático (*Scenedesmus acutus*, *Daphnia pulex* y *Oreochromis sp*) y una al medio terrestre (*Lactuca sativa*), siguiendo protocolos internacionales vigentes (Tabla 6).

Tabla 6. Organismos y norma internacional vigente empleados para evaluar toxicidad crudo Rubiales (WAF), emulsión (CEWAF) y Emulgrosson®

Organismo	Norma Internacional	Tiempo de Exposición	Punto Final	Nivel Trófico
<i>Scenedesmus acutus</i>	OECD 201	72 h	CE ₅₀	Productor acuático
<i>Daphnia pulex</i>	OECD 202	48 h	CL ₅₀	Consumidor acuático
<i>Oreochromis sp.</i>	OECD 203	96 h	CL ₅₀	Consumidor acuático
<i>Lactuca sativa</i>	USEPA* OPPTS 850.4200	120 h	CE ₅₀	Productor terrestre

Fuente: USEPA: United States Environment Protection Agency.

4.4.1 Ensayo de toxicidad aguda con *Scenedesmus acutus* (OECD 201, 2006).

El test de inhibición con Algas verdes (OECD 201, 2006) fue usado para dar un estimativo de los efectos tóxicos de la muestra en los productores primarios.

A partir del cultivo de las cepas en fase exponencial, se prepararon los inóculos para realizar el bioensayo.

Los bioensayos se realizaron en erlenmeyers de 250 mL, empleando un volumen de 100 mL de la solución problema, 5ml de medio de cultivo y una alícuota del

inóculo suficiente para dar una concentración inicial aproximada de 5×10^3 células/mL.

El diseño experimental incluyó 3 grupos para cada concentración testada, lo que proporcionó tres réplicas independientes. Los tratamientos y controles se incubaron a 20 ± 2 °C en un cuarto climatizado con luz continua durante 72 horas (4000 lux aprox.), manteniendo los erlenmeyers en constante agitación en un shaker a 100 rpm.

Al finalizar las 72 horas de experimentación, las algas fueron contadas en una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico Zeiss en una magnificación de (400 X). La respuesta del sistema se midió como la reducción de la tasa de crecimiento en los cultivos algales (unidades de prueba) expuestos a las diferentes concentraciones de la muestra problema. La respuesta fue evaluada como la reducción de la tasa de crecimiento en función de la concentración, en comparación con la media de la tasa crecimiento de los controles. La reducción del crecimiento (inhibición) se expresó como la concentración efectiva media - CE50.

4.4.2 Ensayo de toxicidad aguda en *Daphnia pulex* (OECD 202, 2004). El ensayo agudo de inmovilización con el crustáceo de agua dulce *Daphnia sp.* fue usado para dar un estimativo de los efectos tóxicos de la muestra en estudio en los invertebrados acuáticos.

El diseño experimental incluyó un grupo de 20 animales que fue expuesto a cada concentración testada. Los animales fueron separados en 4 grupos de 5 animales cada uno, para proveer cuatro réplicas independientes.

Los recipientes de 50ml fueron llenados con 25 ml de solución problema (lixiviado). Luego los grupos de 5 organismos cada uno fueron adicionados a los recipientes con una pipeta Pasteur de vidrio teniendo cuidado de no maltratarlos.

Los neonatos de *D. pulex* se mantuvieron allí por un periodo de 48 horas. Después de este periodo cada unidad experimental fue revisada para determinar cuántos de estos neonatos habían muerto o se encontraban inmóviles.

La respuesta del sistema se midió como la mortalidad de los individuos de *D. pulex* en cada uno de los tratamientos (concentraciones nominales de la muestra problema en porcentaje v/v). La respuesta fue evaluada como la función de la concentración de la exposición en comparación con la media de mortalidad de los controles. La mortalidad se expresó como la concentración letal media -CL50.

4.4.3 Ensayo de toxicidad aguda en *Oreochromis sp.* (OECD 203, 1992). El ensayo agudo de inmovilización con *Oreochromis sp* fue usado para dar un estimativo de los efectos tóxicos de la muestra en estudio en los vertebrados acuáticos.

El diseño experimental incluyo un grupo de 15 animales (3X5) que fueron expuestos a cada concentración testada. Los animales fueron separados en 2 grupos de 5 animales cada uno para proveer 2 réplicas independientes.

Peceras circulares de vidrio fueron llenadas con 3 litros de solución problema. Luego los grupos de 5 peces cada uno fueron adicionados a los recipientes teniendo cuidado en no maltratarlos.

Los alevinos se mantuvieron allí por un periodo de 96 horas. Después de las 96 horas cada célula experimental fue revisada para determinar cuántos de estos alevinos habían muerto o estaban inmovilizados.

La respuesta del sistema se midió como la mortalidad de los individuos de *Oreochromis sp.* en cada uno de los tratamientos (concentraciones la muestra problema). La respuesta fue evaluada como la función de la concentración de la exposición en comparación con la media de mortalidad de los controles. La mortalidad se expresó como la concentración letal media, CL50.

4.4.4 Ensayo de toxicidad aguda en *Lactuca sativa* (USEPA OPPTS 850.4200, 1996). El test de germinación e inhibición de crecimiento con *Lactuca sativa*, fue empleado para evaluar los efectos fitotóxicos sobre el proceso de germinación de la semilla y el desarrollo de la plántula durante los primeros días de crecimiento.

El diseño experimental incluyó un grupo de 20 semillas que fueron expuestas a cada concentración testada. Las semillas fueron separadas en 4 grupos de 5 unidades cada uno, para proveer 4 réplicas independientes.

A Cajas de Petri de 100 mm de diámetro a las que previamente se les colocó en la base un papel de filtro (Whatman No 3 de 90mm de diámetro), se les adicionaron 10 ml de muestra problema en sus diferentes concentraciones. Un control blanco fue preparado de la misma manera, remplazando los 10ml de muestra con agua desionizada.

Luego cada grupo de 5 semillas fue adicionado a las cajas de Petri con ayuda de una pinza de acero teniendo cuidado en no maltratarlas. Las semillas se mantuvieron en una cámara oscura a temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por un periodo de 7 días.

Finalmente, después de los 7 días cada unidad experimental fue revisada, el número de semillas germinadas fue contado, y el largo de las raíces y tallos de las semillas germinadas fue medido.

La respuesta del sistema se midió como el porcentaje de germinación de semillas y los porcentajes de inhibición del crecimiento de la raíz y el tallo con respecto al control.

La respuesta fue evaluada como la función de la concentración de la exposición en comparación con la media de la germinación y la longitud de tallos y raíces en los tratamientos. El porcentaje de germinación se expresó como la concentración letal CL50 y la inhibición del crecimiento de tallos y raíces como la concentración efectiva CE50.

4.5 CÁLCULOS ESTADÍSTICOS

Para el cálculo de la CL50/CE50 con sus respectivos límites de confianza al 95% se utilizó el método Probit, haciendo uso de Statplus Professional v 2009.

El método de análisis Probit²⁹ permite estimar la CE50 o CL50 ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias.

El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en la cual, la carga letal, concentración letal o concentración efectiva media (LL50, CL50, CE50) corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar un efecto al 50% de la población en estudio.

Para las muestras analizadas utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), puesto que no se pudo hallar toxicidad aguda, se realizaron análisis estadísticos

²⁹ Finney, D. J. and W. L. Stevens. 1948. "A table for the calculation of working probits and weights in Probit analysis." *Biometrika* 35: 191-201.

tendientes a verificar la presencia de toxicidad sub aguda. Previa determinación del no cumplimiento de los criterios de distribución normal (Shapiro-Wilk's test) y homogeneidad de varianzas (Levene test) los datos fueron analizados hacienda uso de un test no paramétrico U de Mann-Whitney.

4.6 ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN DE PELIGRO

Después de estimar el CL50/CE50 de cada especie de ensayo se hizo una identificación de peligrosidad potencial de la muestra teniendo en cuenta la Directiva 67/548/CEE del consejo de la Comunidad Económica Europea relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancia peligrosas.

La identificación del peligro se llevó a cabo basándose en las propiedades intrínsecas de la sustancia objeto de ensayo, considerando como tales, la toxicidad inherente para los organismos del medio, su capacidad de bioacumulación y su degradabilidad. En el caso de estudio se evaluó solamente la toxicidad inherente para los organismos del medio acuático, a partir de estas toxicidades derivamos la identificación del peligro.

El sistema de clasificación se basa fundamentalmente en la eco-toxicidad y define básicamente 10 categorías de las cuales son pertinentes para nuestro estudio en forma prioritaria las que involucran el componente acuático (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación toxicológica y Frase de Riesgo según rangos de concentración de CE50 para el componente acuático.

Toxicidad Aguda (CL50-CE50 mg/l)	Código Clasificación	Frase de riesgo
≤1	R50	Muy Tóxica para el medio acuático
1-10	R51	Tóxica para el medio acuático
10-100	R52	Nociva para el medio acuático
≥100	--	No Peligrosa para medio acuático
<100	R53	Tóxica para la flora

Fuente: Directiva 67/548/CEE del consejo de la Comunidad Económica Europea

4.7 EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD RÁPIDA

Se valoró la biodegradabilidad rápida de los productos según la guía de la OCDE 301C. Esta evaluación se basa en mediciones respirométricas por el secuestro o consumo de oxígeno de una solución agitada, o suspensión de la sustancia de prueba en un medio mineral, inoculada con microorganismos no pre-adaptados. El consumo de oxígeno se midió automáticamente por un periodo de 28 días en un respirómetro oscuro y cerrado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. El CO_2 producido fue absorbido en soda. La biodegradación se expresa como el porcentaje de oxígeno tomado (expresado como DBO y corregido con el tomado por un blanco) del oxígeno tomado teóricamente (ThOD). El cálculo de la ThOD se muestra en el Anexo 1. El método teórico aplica solamente para compuestos orgánicos con fórmula conocida. De igual modo se debe tener en cuenta su pureza y proporciones de composición en mezclas.

Esta evaluación de biodegradabilidad rápida es estándar a nivel de laboratorio y permitió medir la capacidad o facilidad de transformación en condiciones

aeróbicas que tiene la matriz evaluada (y por ende sus elementos constituyentes), lo cual permite extrapolar a condiciones reales de exposición ambiental.

4.7.1 Inóculo Empleado. El inóculo para la pruebas de biodegradabilidad consistió en una muestra de lodo activado del tanque de aireación de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del Instituto colombiano del petróleo, la cual cumple con todas las condiciones y requerimientos necesarios para llevar a cabo la prueba de biodegradabilidad rápida (Vázquez-Rodríguez y col. 2007). Los parámetros relacionados en cuanto a calidad del inóculo son el pH, el porcentaje de oxígeno disuelto y la viabilidad de microorganismos expresada unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) y determinada a través de una prueba de recuento de aerobios totales (RAT) (Ver tabla 8).

Tabla 8. Parámetros del inóculo empleado para la determinación de biodegradabilidad rápida.

pH	OD (%)	RAT* (UFC/mL)
7.2	5	10 ⁵

Fuente: Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

4.7.2 Respirómetro Automático (Oxítóp). Las mediciones respirométricas fueron llevadas a cabo por un respirómetro automático Oxítóp el cual se basa en una medición de presión (por diferencia) a través de sensores electrónicos piezo-resistivos, ubicados en un cabezal que se adapta a botellas especiales para el montaje de biodegradabilidad. Dichos cabezales se muestran en la figura a continuación, (Figura 11).

Figura 11. Evaluación de biodegradabilidad rápida por respirometría



Fuente: Montaje Pruebas Biodegradabilidad rápida Laboratorio Biotecnología-ICP

La preparación del ensayo, los materiales y reactivos empleados en la Prueba de Biodegradabilidad Rápida se relacionan en el Anexo 2b.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE EMULSION RUBIALES Y SUS COMPONENTES.

Una muestra representativa de emulsión Rubiales fue tomada del circuito de pruebas fluidodinámicas del Instituto Colombiano del Petróleo para realizar la totalidad de pruebas fisicoquímicas, toxicológicas y de biodegradabilidad rápida. Los componentes de la emulsión, en este caso crudo Rubiales y aditivo emulgente Emulgrosson fueron igualmente llevados a laboratorio para cubrir su caracterización.

5.1.1 Caracterización de la Emulsión Rubiales. A continuación se presentan los resultados de la caracterización básica de la Emulsión Rubiales: Tamaño de partícula, comportamiento reológico (viscosimétrico), tensión interfacial, densidad, contenido de agua, estabilidad.

5.1.1.1 Tamaño partícula: La emulsión Rubiales presentó características bimodales al verificar su distribución de tamaño de partícula, observándose que el 60% del volumen de dicha distribución correspondía a tamaños de partícula equivalentes a 25 micras, mientras que el 40% en volumen correspondió a partículas inferiores a 10 micras. En la Figura 12 y Tabla 9 se relacionan las características de la medición de la distribución obtenida.

Figura 12. Características de la distribución de tamaño de partícula de la emulsión Rubiales.

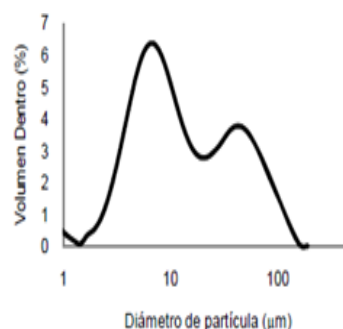
Distribución bimodal: 60% Dp 25 micras

40% Dp 10 micras

Viscosidad: 183 centiPoises (cP) @ 30°C

Estabilidad: > 30 días

Fuente: Tecnología formulación emulsiones
Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología.



5.1.1.2 Comportamiento reologico (viscosimétrico): Teniendo en cuenta que la temperatura es el parámetro que más afecta la viscosidad y/o propiedades de flujo, la valoración de comportamiento reologico (viscosimétrico) fue realizado en un amplio rango, simulando condiciones reales de transporte por oleoducto, (perfil térmico) entre 25 y 50°C. Se pudo apreciar que la emulsión exhibió características pseudoplásticas, mostrando viscosidad que disminuyó con el aumento de la velocidad de deformación y/o caudal, (Ver Tabla 9) por esta razón los valores de viscosidad se relacionan a diferentes velocidades en cada una de las temperaturas evaluadas. El efecto de la temperatura se apreció muy marcado en especial por debajo de 30°C mostrando un incremento cercano al 30% cuando se comparan los valores de viscosidad obtenidos a 30 y 25°C, respectivamente.

5.1.1.3 Contenido de agua: La prueba para establecer el contenido neto volumétrico de agua en la emulsión Rubiales mostró 20% en volumen. Esta prueba confirmó la relación crudo/agua formulada durante la preparación en la planta piloto, la cual correspondió a 80/20 (%V/V) crudo/agua.

5.1.1.4 Tensión interfacial: La tensión interfacial entre la fase acuosa y oleosa (crudo Rubiales) determinada por el método del anillo de Du Noy dió como resultado 42 dinas/cm @ 25°C. La Tensión superficial del agua fue de 72.3

dinas/cm @ 25°C, mientras que la del crudo Rubiales a la misma temperatura fue de 26.7 dinas/cm.(Ver Tabla 9)

5.1.1.5 Estabilidad estática: Al cabo de 30 días la emulsión bajo condiciones de total reposo confinada en una probeta de 500 ml presentó total homogeneidad: No fue observada separación de fases crudo-agua. Sus características de distribución de tamaño de partícula prácticamente mostraron igual tendencia que en el tiempo cero, es decir, al inicio de la prueba.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de la caracterización general realizada a la emulsión Rubiales.

Tabla 9. Características de la emulsión Rubiales(o/w 80/20)

Comportamiento reologico, viscosidad en centiPoises				Distribución tamaño partícula, micras			Contenido de Agua (%V)	Tensión Interfacial (dinas/cm)	Estabilidad (días)
D*,s-1	25° C	30° C	50° C	D (v;0.1)	D (v;0.5)	D (v;0.9)			
10	267	183	110	5.77	16.59	69.21	20	42	> 30
50	214	165	105						
100	207	152	95						
300	181	135	86						

Fuente: Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología-Ecopetrol-ICP

*Ds-1 → Velocidad de deformación

5.1.2 Caracterización crudo Rubiales. Se consideró de interés realizar pruebas de la caracterización reologica (viscosimétrica), tensión superficial, densidad y contenido de agua. Esta última tiene significativa importancia en la formulación de la emulsión.

5.1.2.1 Comportamiento reológico: El crudo Rubiales presentó comportamiento pseudoplástico a temperatura inferior a 40°C. A mayor temperatura exhibió comportamiento newtoniano, el cual se caracteriza por mantener viscosidad constante con la variación de la velocidad de deformación y/o caudal. El valor de incertidumbre de esta prueba es de $\pm 3\%$.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de viscosidad a diferente temperatura y velocidad de deformación analizados.

5.1.2.2 Densidad del crudo Rubiales: La prueba realizada en densitómetro capilar, mostró densidad cercana a la del agua, 0.9654 @ 15°C.

5.1.2.3 Contenido de agua: Resulta importante determinar el volumen neto de agua que arrastra el crudo durante la etapa de extracción del yacimiento y permanece en éste después de tratamiento (etapa de deshidratación y desgasificación) en los campos de producción, previo a la formación de la emulsión para realizar los cálculos de formulación de la emulsión inversa. En este caso, el crudo presentó 0.4% de agua como emulsión directa (agua dentro del crudo). Este valor obtenido por evaluación mediante destilación, se descuenta del neto de la fracción volumétrica de agua a adicionar en la etapa de formación de la emulsión inversa. Ver Tabla 10.

Tabla 10. Características reologicas y densidad del crudo Rubiales

Comportamiento reologico, (Viscosidad dinámica); centiPoises					Tensión superficial , Dinas/cm	Densida d, g/cc (15°C)	Contenid o de Agua (%V)
D*,s ⁻¹	25°C	30°C	40°C	50°C			
10	4970	3980	798	452	28	0.9654	0.4
50	4762	3628	797	452			
100	4680	3625	797	450			
300	4320	3618	796	450			

Fuente: Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología-Ecopetrol-ICP

D*→ Velocidad de deformación, s⁻¹

5.1.2.4 Caracterización composición química crudo Rubiales: Mediante pruebas llevadas a cabo en espectrofotómetro de masas se determinó el contenido de componentes elementales del crudo Rubiales: Carbono, nitrógeno y oxígeno, información clave para las pruebas de biodegradabilidad rápida. Ver Tabla 11.

Tabla 11. Características químicas composicionales del material de estudio

Caracterización componente química			
Componente	Crudo Rubiales	Emulgrosson	Emulsión Rubiales
Carbono	83,41	77,12	62,79
Nitrógeno	8,69	12,85	6.83
Oxígeno	0.02	10,03	0.03

Fuente: Laboratorio Cromatografía-Ecopetrol-ICP

5.1.3 Caracterización emulgente Emulgrosson: En la Tabla 12 se presentan las características principales del surfactante y/o emulgente Emulgrosson.

Tabla 12. Características del agente emulgente EMULGROSSON

Tensión Superficial, Dinas/cm	Viscosidad, @ 30°C	Densidad, g/cc (15°C)	pH	Concentración miscelar crítica
31	65	1.0256	8-9	680 ppm

Fuente: Laboratorio Fenómenos Interfaciales & Reología-Ecopetrol-ICP

5.2. ENSAYOS AGUDOS DE TOXICIDAD

Los ensayos de toxicidad fueron realizados a partir de evaluaciones de observación visual bajo el efecto de un rango de concentraciones de exposición de crudo Rubiales, emulsión y Emulgrosson en organismos productores y consumidores acuáticos. En la Tabla 13 se relacionan los resultados de las evaluaciones de exposición de los organismos empleados vs. Concentración de exposición.

Tabla 13. Resultado de evaluaciones de observación visual y concentraciones de exposición de Crudo Rubiales, Emulsión y Emulgrosson® empleadas.

Solución Ensayo	Observación visual	Concentraciones definitivas			
		<i>D. Pulex</i>	<i>S. acutus</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	<i>L. sativa</i>
Crudo Rubiales (WAF)	No se observan partículas en suspensión, color claro	(%WAF 1:18) 3.125, 1..562, 0.781, 0.39, 0.195	(%WAF 1:9) 100, 50, 25, 12.5, 6.25	(%WAF 1:18) 100, 50, 25, 12.5, 6.25 0.196	(%WAF 1:9) 100, 50, 25, 12.5, 6.25
Crudo Rubiales + Emulgrosson (CEWAF)	Se observan gotas en suspensión, color pardo oscuro	(%WAF 1:18) 3.125, 1..562, 0.781, 0.39, 0.196	(%WAF 1:9) 100, 50, 25, 12.5, 6.25	(%WAF 1:18) 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781	(%WAF 1:9) 100, 50, 25, 12.5, 6.25
Emulgrosson	No se observan partículas en suspensión, color pardo claro	50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ppm	100000, 5000, 25000, 12500, 6500 ppm	62.5, 31.25, 25, 12.5, 6.25 ppm	100, 50, 25, 12.5, 6.25 ppm

Fuente: Laboratorio Toxicología-Ecopetrol -ICP

5.2.1 Ensayo de toxicidad aguda con *Scenedesmus acutus* (OECD 201, 2006).

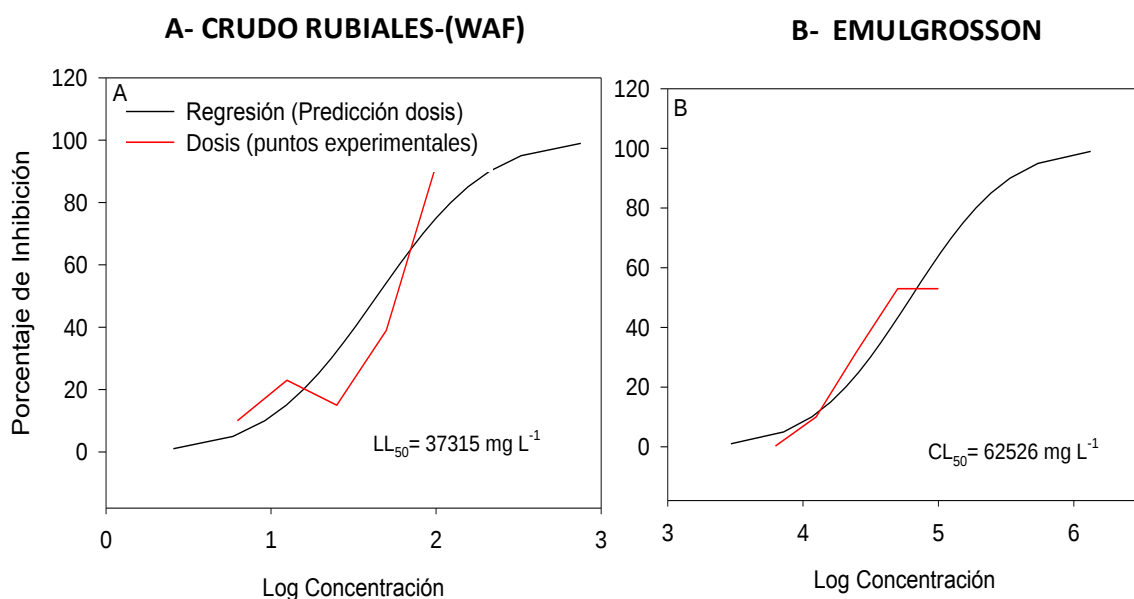
Las algas fueron expuestas a diluciones seriadas de las fracciones adaptadas de agua de crudo rubiales –WAF y emulsión (Crudo rubiales + Emulgrosson)-CEWAF. De manera similar, se expusieron por un periodo de 72h a diluciones seriadas de Emulgrosson®.

En la Figura 13 el porcentaje de inhibición de crecimiento se graficó como una función del logaritmo de la concentración en la fracción adaptada de agua de Crudo Rubiales –WAF- (Figura 13.A.) y del logaritmo de la concentración (mg L-1) de Emulgrosson® (Figura 13.B) para encontrar el LL50 y CE50 respectivamente.

En dicha Figura se indican las líneas experimentales y la línea de regresión Probit que ajusta.

Para la fracción adaptada de agua químicamente mejorada de crudo Rubiales es decir la Emulsión Rubiales, –CEWAF- no se pudo hallar LL50 pues sobrepasó la más alta concentración testada (85000 mg/L) indicando esto que aun con la máxima concentración probada no se apreció afectación alguna en este organismo. La fracción adaptada de agua de crudo Rubiales (LL50= 37315 mg L⁻¹) fue aproximadamente 2 veces más tóxica que el Emulgrosson (CE50= 62526 mg L⁻¹) para alga *Scenedesmus acutus*. Los resultados muestran entonces que en su orden, la muestra más tóxica para *Scenedesmus acutus* es el WAF de crudo Rubiales, seguida por la muestra de Emulgrosson. La emulsión como se mencionó antes, para el rango de dosificaciones evaluadas no mostró afectación (inhibición crecimiento) por ello no se presenta gráfica.

Figura 13. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Scenedesmus acutus* como función del logaritmo de la concentración.



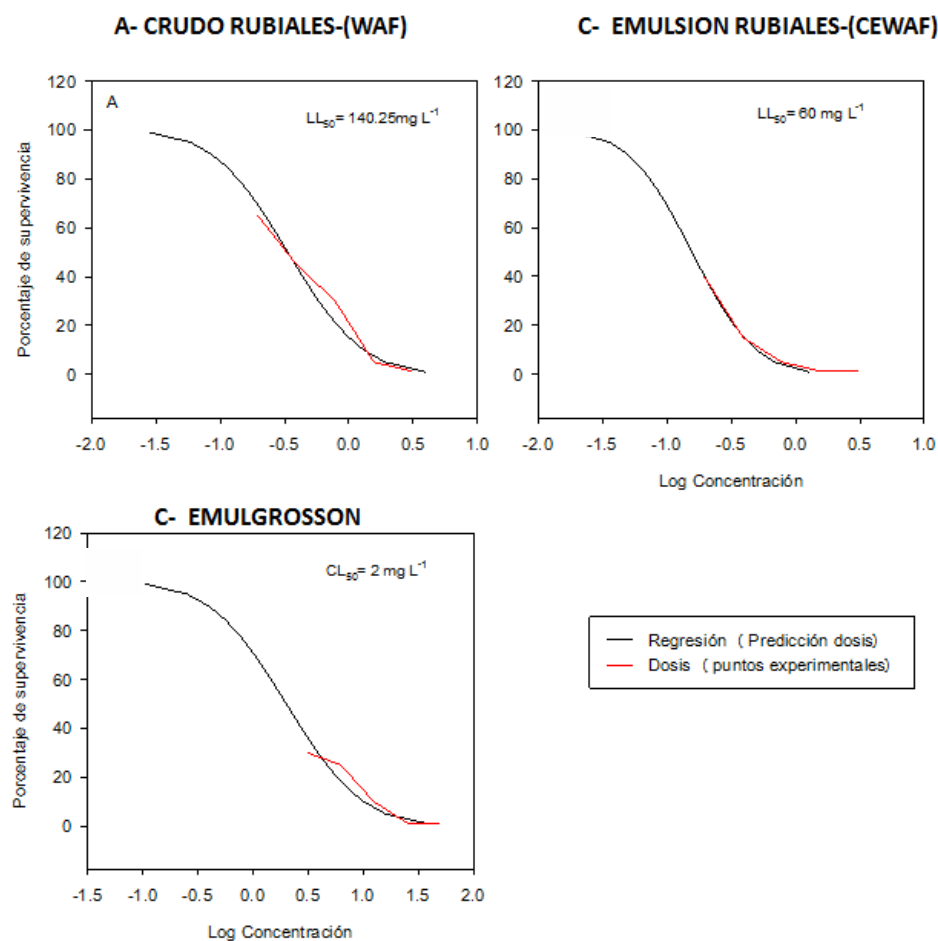
Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

5.2.2. Ensayo de toxicidad aguda en *Daphnia pulex* (OECD 202, 2004). El crustáceo de agua dulce *Daphnia pulex* fue expuesto a diluciones seriadas de las fracciones adaptadas de agua de crudo rubiales –waf-y emulsión (Crudo rubiales + Emulgrosson)-CEWAF. De manera similar, se expusieron organismos de *Daphnia pulex* a diluciones seriadas de Emulgrosson®.

5.2.3 Ensayo de toxicidad aguda en *Daphnia pulex* (OECD 202, 2004). El crustáceo de agua dulce *Daphnia pulex* fue expuesto a diluciones seriadas de las fracciones adaptadas de agua de crudo Rubiales-WAF- y emulsión (Crudo Rubiales + Emulgrosson)-CEWAF-. De manera similar, se expusieron organismos de *Daphnia pulex* a diluciones seriadas de Emulgroson®.

En la Figura 14 el porcentaje de supervivencia es graficado como una función del logaritmo de la concentración en las fracciones adaptadas de agua (WAF) de Crudo Rubiales (Figura 14A), la emulsión (Figura 14B) y como función del logaritmo de la concentración (mg L⁻¹) de Emulgroson® (Figura 14C) para encontrar el LL50 y CE50. Se indican las líneas y la línea Probit que ajusta.

Figura 14. Porcentaje de supervivencia de *Daphnia pulex* como función del logaritmo de la concentración.



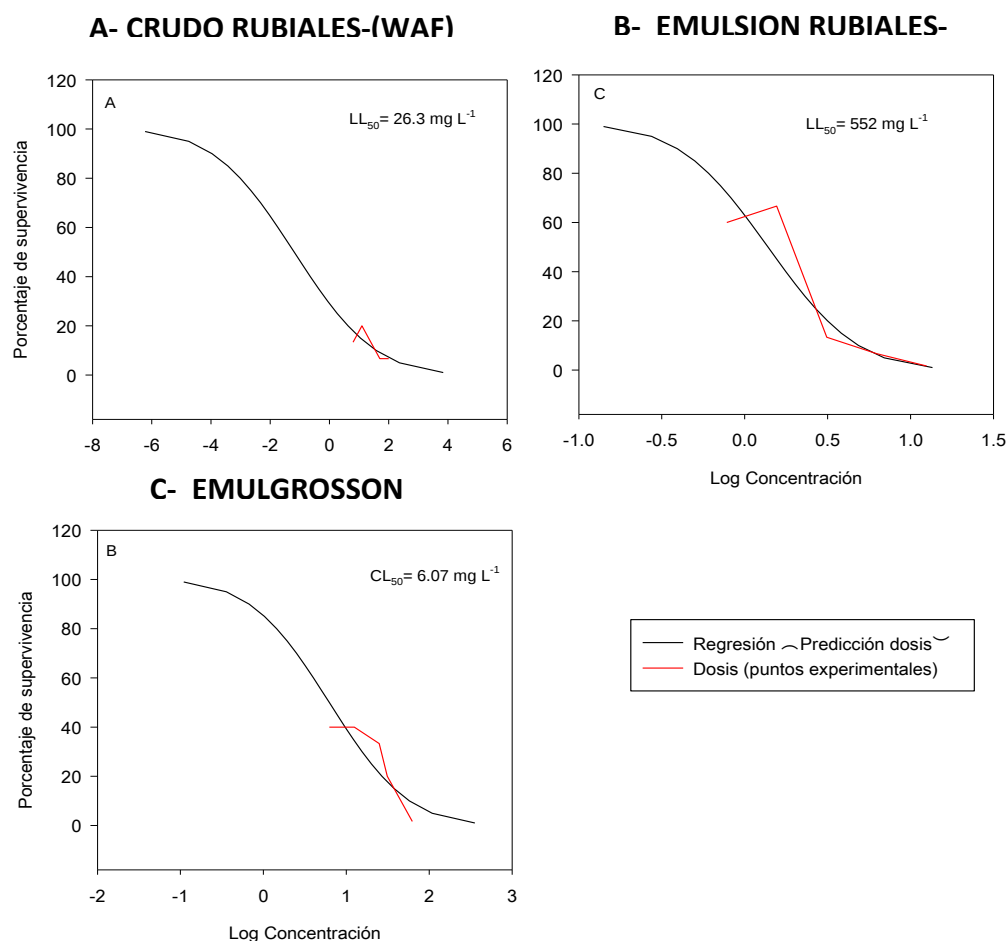
Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

De acuerdo a los resultados obtenidos con *Daphnia pulex*, se pudo establecer que el crudo Rubiales es la sustancia menos nociva, $LL_{50} = 140.25 \text{ mg L}^{-1}$; siguiéndole la emulsión; $LL_{50} = 60 \text{ mg L}^{-1}$ mientras que el emulgente sí resulta tóxico, $CL_{50} = 2 \text{ mg L}^{-1}$ llegando a la condición de letalidad del 50% de la población.

5.2.4 Ensayo de toxicidad aguda en *Oreochromis sp.* (OECD 203, 1992). El pez de agua dulce *Oreochromis sp.* fue expuesto a diluciones seriadas de las fracciones adaptadas de agua de crudo Rubiales y emulsión (Crudo rubiales + Emulgrosson). De manera similar, se expusieron organismos de *Oreochromis sp* a diluciones seriadas de Emulgrosos®.

En la Figura 15 el porcentaje de supervivencia es graficado como una función del logaritmo de la concentración en las fracciones adaptadas de agua (WAF) de Crudo Rubiales y (Figura 15 A) la emulsión (Figura 15 B) y como función del logaritmo de la concentración (mg L⁻¹) de Emulgrosson® (Figura 15 C) para encontrar el LL50 y CE50

Figura 15. Porcentaje de supervivencia de *Oreochromis sp.* como función del logaritmo de la concentración.



Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

5.2.5 Ensayo de toxicidad aguda en *Lactuca sativa* (USEPA OPPTS 850.4200, 1996). Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) fueron expuestas a diluciones seriadas de las fracciones adaptadas de agua de crudo Rubiales y emulsión (Crudo rubiales + Emulgrosson). De manera similar, se expusieron a diluciones seriadas de Emulgrosson®.

Las pruebas iniciales fueron realizadas exponiendo a alta carga las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), pudiéndose observar que a la máxima concentración y/o

carga, no se observó ningún efecto tóxico. Por esta razón se llevaron a cabo pruebas de toxicidad subaguda y se corrieron análisis estadísticos tendientes a verificar la presencia de algún efecto toxico. Tanto las pruebas de toxicidad aguda como la subaguda frente a los criterios de distribución normal (Shapiro-Wilk's test) y homogeneidad de varianzas (Levene test) no cumplieron; por esta razón se analizó a partir del uso de un test no paramétrico U de Mann-Whitney la valoración de toxicidad. En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 14. Resultados estadísticos de la prueba Mann-Withney U practicada a la población de *Lactuca sativa* expuesta a la fracción al Crudo Rubiales (WAF), Emulsión Rubiales-CEWAF y Emulgrosson.

Contrastes		Estadístico	Cudo Rubiales (WAF)	Crudo Rubiales + Emulgrosson (CEWAF)	Emulgrosson
Control	6.25%	Mann-Withney U	3.500	4.000	2.500
		Exact Sig. (1-tailed)	.45	.500	.250
	12.5%	Mann-Withney U	2.000	4.000	1.000
		Exact Sig. (1-tailed)	.200	.500	.150
	25%	Mann-Withney U	4.000	3.500	4.500
		Exact Sig. (1-tailed)	.500	.400	.700
	50%	Mann-Withney U	2.500	4.500	1.500
		Exact Sig.(1-tailed)	.250	.600	.150
	100%	Mann-Withney U	2.000	2.000	2.500
		Exact Sig.(1-tailed)	.200	.250	.250

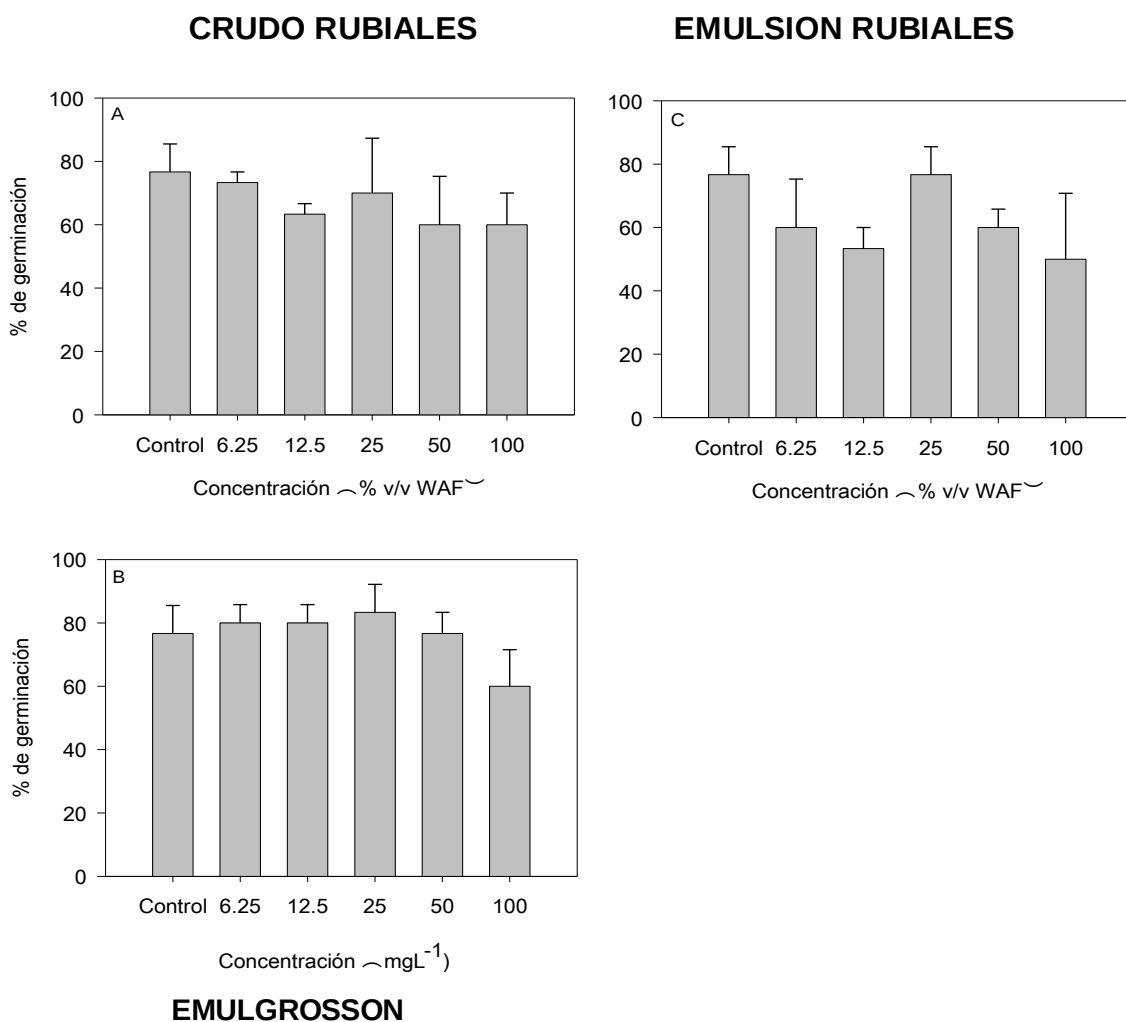
Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

Esto es significancia exacta si el valor esta por encima de 0.05 que es la probabilidad usada en la mayoría de estudios pues no hay diferencias significativas entre el control y ese tratamiento

Tras los estadísticos no se halló toxicidad aguda medida como CE50 para ninguna de las sustancias de prueba. De igual modo, no se hallaron diferencias significativas ($p < 0.05$) esto es, significancia exacta que es la probabilidad usada en la mayoría de estudios; pues no hay diferencia entre la media de germinación del control y los tratamientos de los diferentes productos muestreados, por lo que

se descarta presencia de algún tipo de toxicidad sub aguda. En la Figura 16 se presenta la relación dosis-respuesta: Las columnas representan el porcentaje de germinación alcanzado y las barras el error estándar.

Figura 16. Relación dosis-respuesta para los efectos en *Lactuca sativa* después de una exposición de 120 horas.



Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

5.2.6 Análisis de identificación de peligro. Los valores medios de carga letal (LL50, por sus siglas en inglés Lethal Loading) variaron desde 26.3 mgL⁻¹ (Crudo

Rubiales (WAF), ensayo con *Oreochromis sp.*) hasta 37315 mgL-1 (Crudo Rubiales (WAF), ensayo con *Scenedesmus acutus*). Para los ensayos realizados con *Lactuca sativa* los valores de LL50 sobrepasaron las máximas concentraciones testeadas. Igualmente para el ensayo *Scenedesmus acutus* con la emulsión Rubiales no se encontró toxicidad aguda alguna en la máxima concentración testada.

El ensayo con el crustáceo de agua dulce *Daphnia pulex* fue el más sensitivo de los 4 que se utilizaron. Sin embargo, *Oreochromis sp.* fue el organismo más sensible en el ensayo realizado con la fracción adaptada de agua de Crudo Rubiales. Los organismos menos sensibles fueron las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) para las que no se pudo encontrar toxicidad aguda medida como CL50/CE50 en las máximas concentraciones testeadas (Tabla 16).

Siguiendo la normatividad aprobada en la Directiva 67/548/CEE del consejo de la Comunidad Económica Europea relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas tenemos que, el crudo rubiales es catalogado como nocivo para el medio acuático, al igual que la emulsión (Crudo Rubiales + Emulgrosson), mientras que el Emulgrosson® fue catalogado como tóxico para el medio acuático.

Tabla 15. Resultados de los ensayos toxicológicos: Identificación de peligro y frase de riesgo asociada.

Solución de Ensayo	<i>S. acutus</i> LL50/CE ₅₀ 72h mgL ⁻¹	<i>D. Pulex</i> LL50/CL ₅₀ 48h mgL ⁻¹	<i>Oreochromis</i> sp. LL50/CL ₅₀ 96h mgL ⁻¹	<i>L. sativa</i> LL50/CE ₅₀ 120h mgL ⁻¹	Identificación de Peligro	Frase de Riesgo Asociada
Crudo Rubiales (WAF)	37315	140.25	<u>26.3</u>	>80000	R52	<u>Nociva</u> para el medio acuático
Crudo Rubiales + Emulgrosson (CEWAF)	>85000	<u>60</u>	552	>85000	R52	<u>Nociva</u> para el medio acuático
Emulgrosson*	62526	<u>2</u>	6.07	>100	R51	<u>Tóxica</u> para el medio acuático

Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

*Para los ensayos donde no se pudo obtener la CL50 y/o LL50 a la mayor concentración testeada el resultado va acompañado del símbolo matemático “>”

En la Tabla 16 se puede observar que para la mayoría de especies de ensayo no hay evidencia de una interacción toxica entre el Crudo Rubiales y el agente emulsificante (Emulgrosson). Estos hallazgos, no corresponden con aquellos de otros estudios en donde se observa un incremento de la toxicidad de diferentes crudos cuando son adicionados agentes dispersantes o emulsificantes. (Milinkovitch et al. 2011; Bhattacharyya, Klerks & Nyman 2003). Sin embargo, el ensayo realizado con *Daphnia pulex* sigue el patrón más común en la literatura, el cual indica que hay un incremento de la toxicidad del crudo una vez este es dispersado. Este incremento en la toxicidad del crudo dispersado puede deberse a una mayor disponibilidad de contaminantes como los PAH's (Ramachandran et al. 2004) o a la acción física de gotas de crudo dispersadas dentro de la columna de agua por acción del emulsificante.

No obstante, la mayoría de literatura científica afirma que la adición de emulsificantes y dispersantes aumentan la toxicidad del crudo, trabajos como el de Singer et al 1998 y Clark et al. 1993, muestran que tal interacción puede ser dependiente del punto final, la duración de la exposición y las especies de ensayo. Además, muchas veces pudieron comprobar que no hay un incremento significativo de la toxicidad una vez se añade dispersante al crudo.

Todos los ensayos eco toxicológicos realizados resultaron válidos a la luz de las normas OECD 201 de 2006, OECD 202 de 2004, OECD 203 de 1992 y USEPA 850.4200 de 1996.

5.3 ANÁLISIS BIODEGRADABILIDAD RÁPIDA

Con el fin de poder llevar a cabo el reporte de los datos de biodegradabilidad rápida se realizaron los cálculos de la demanda teórica de Oxígeno (ThO₂) para cada uno de los materiales objeto de estudio, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 16. Demanda Teórica de Oxígeno de los materiales estudiados y del compuesto de referencia empleado

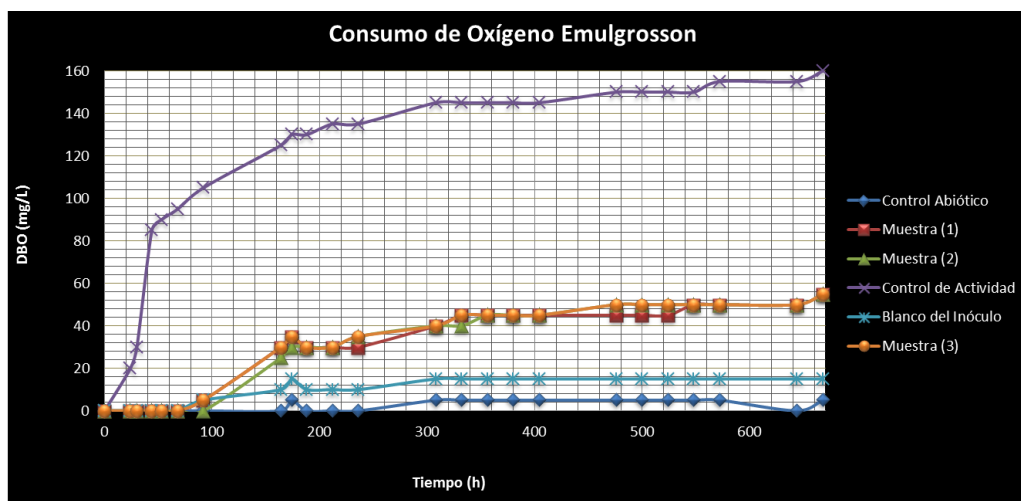
Material	ThO ₂ (mgO ₂ /mg Material)
Aditivo Emulgrosson	2.98
Crudo Rubiales	0.90
Emulsión Rubiales	0.89
Benzoato de Sodio (Referencia)	1.67

Fuente: Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

A continuación se presentan los resultados de biodegradabilidad rápida para cada uno de los componentes de la emulsión (aditivo Emulgrosson y crudo Rubiales) como para la Emulsión Rubiales.

5.3.1 Aditivo Emulgrosson. La prueba realizada para hacer seguimiento de biodegradación rápida se observa en la Figura 17. Allí se aprecia que la degradación del Emulgrosson logró consumir una mayor cantidad de oxígeno que el blanco del inóculo, por lo cual concluye que logró biodegradarse en alguna proporción.

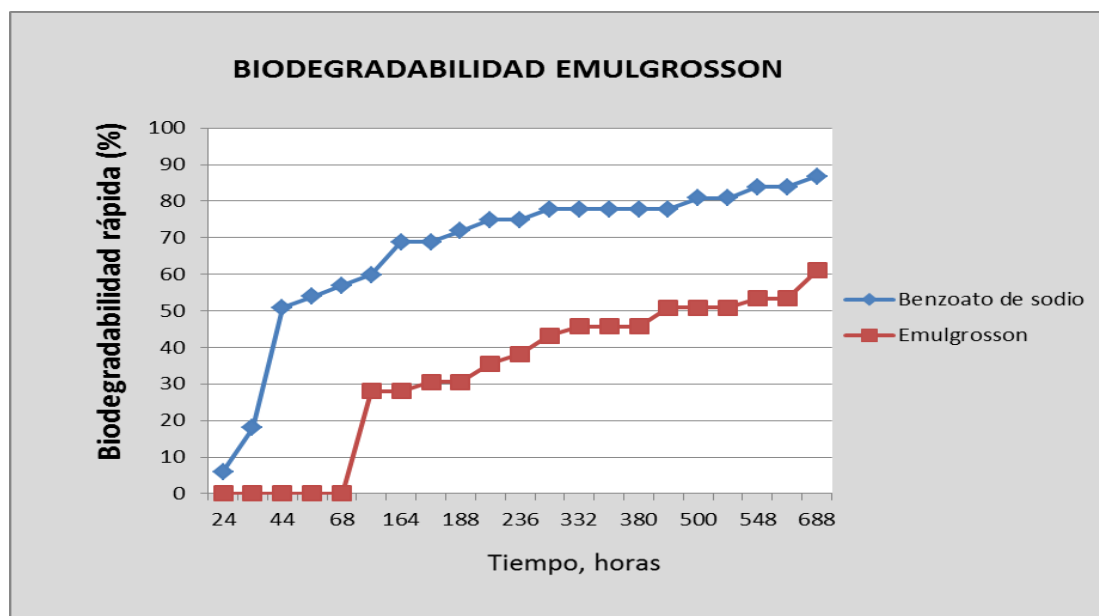
Figura 17. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para el aditivo Emulgrosson.



Fuente: Laboratorio Biotecnología Ecopetrol-ICP

En la Figura 18, se reportan los datos de biodegradabilidad rápida expresados como un seguimiento en tiempo. El Benzoato de Sodio, material de referencia experimental alcanzó el 60% de Biodegradación en el día 4, lo que significa que la prueba fue válida según los criterios de guía OECD 301C.

Figura 18. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida del aditivo Emulgrosson y el compuesto referencia (Benzoato de Sodio) en el tiempo.

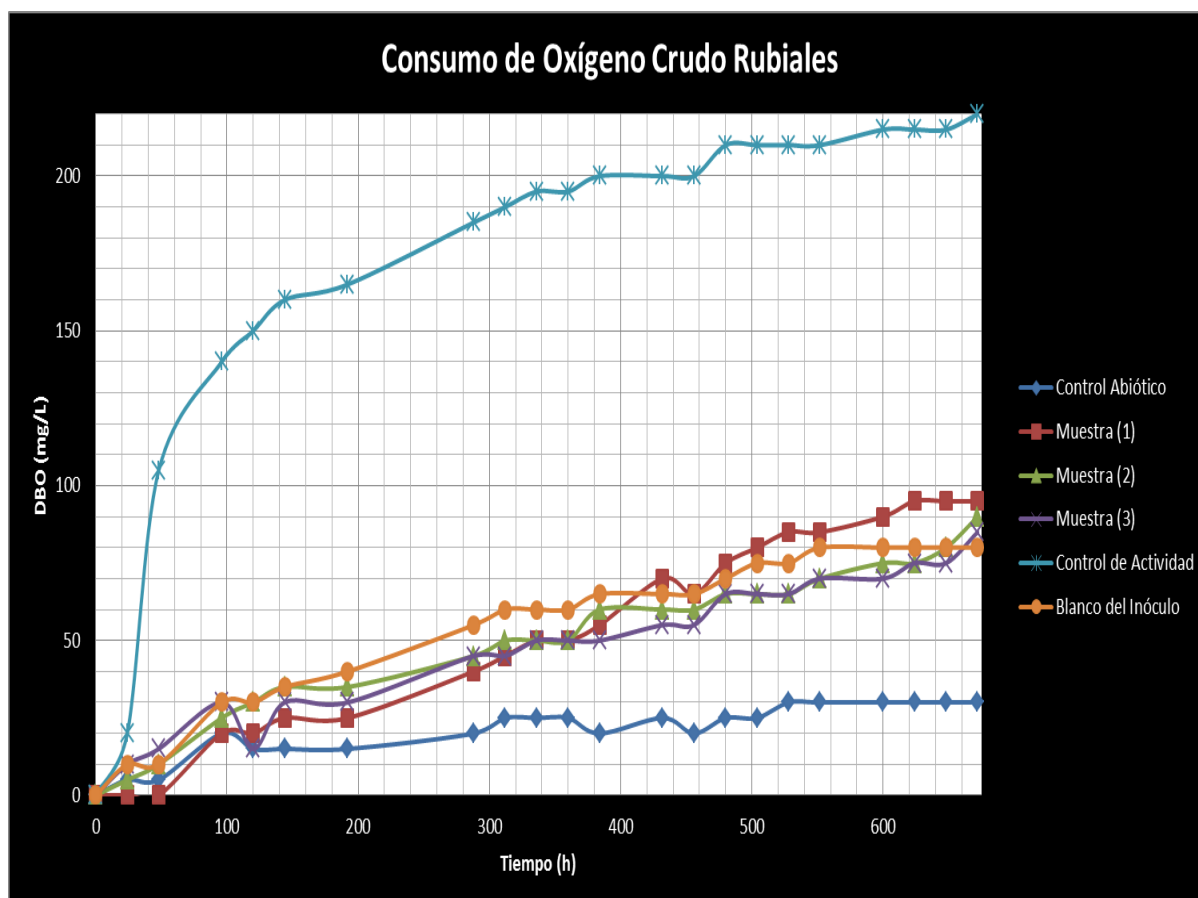


Fuente: Laboratorio Biotecnología-Ecopetrol-ICP

También se observó que el aditivo Emulgrosson sometido a prueba logró un 61.01 % de Biodegradación en los 28 días por lo cual se concluye que el compuesto es rápidamente biodegradable. El resultado obtenido da referencia de las características funcionales del Emulgrosson, el cual no se acumula en el medio ambiente.

5.3.2 Crudo Rubiales. En la Figura 19 puede observarse el curso de la biodegradación del montaje realizado para el crudo Rubiales expresado como consumo de oxígeno en DBO. Se puede observar que no existen diferencias significativas entre el consumo de oxígeno logrado por el triplicado de muestras y el blanco del inóculo. Esto permite interpretar que los valores de biodegradación son muy bajos debido a que el consumo de oxígeno del inóculo se resta al de la muestras como factor de corrección.

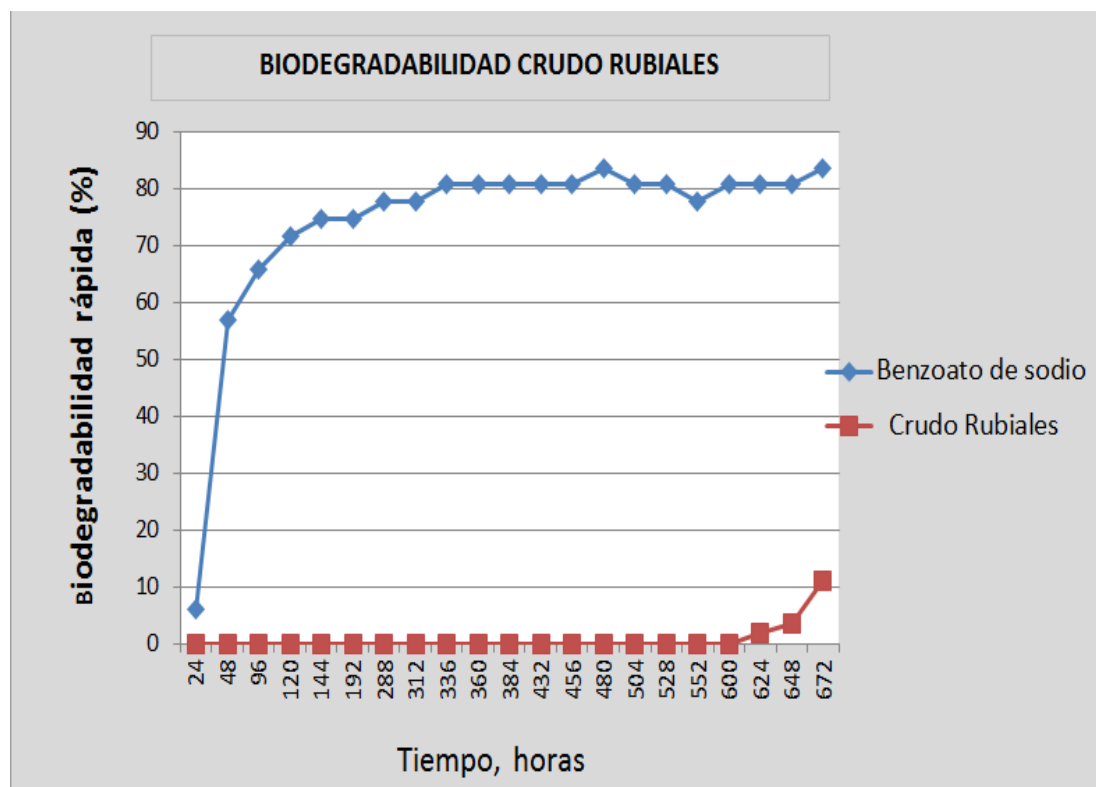
Figura 19. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para el crudo Rubiales.



Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

Finalmente, en la gráfica de seguimiento de la biodegradación en el tiempo (ver Figura 20), se observa que este no alcanzó un porcentaje de biodegradación suficiente para considerarse rápidamente biodegradable (11.10%). Adicionalmente, se puede concluir que el montaje fue técnicamente correcto ya que el control de actividad compuesto por el material experimental de referencia logró un 60% de biodegradación en tan solo 3 días, y al final de la prueba (28 días) un 84% lo cual era el valor esperado.

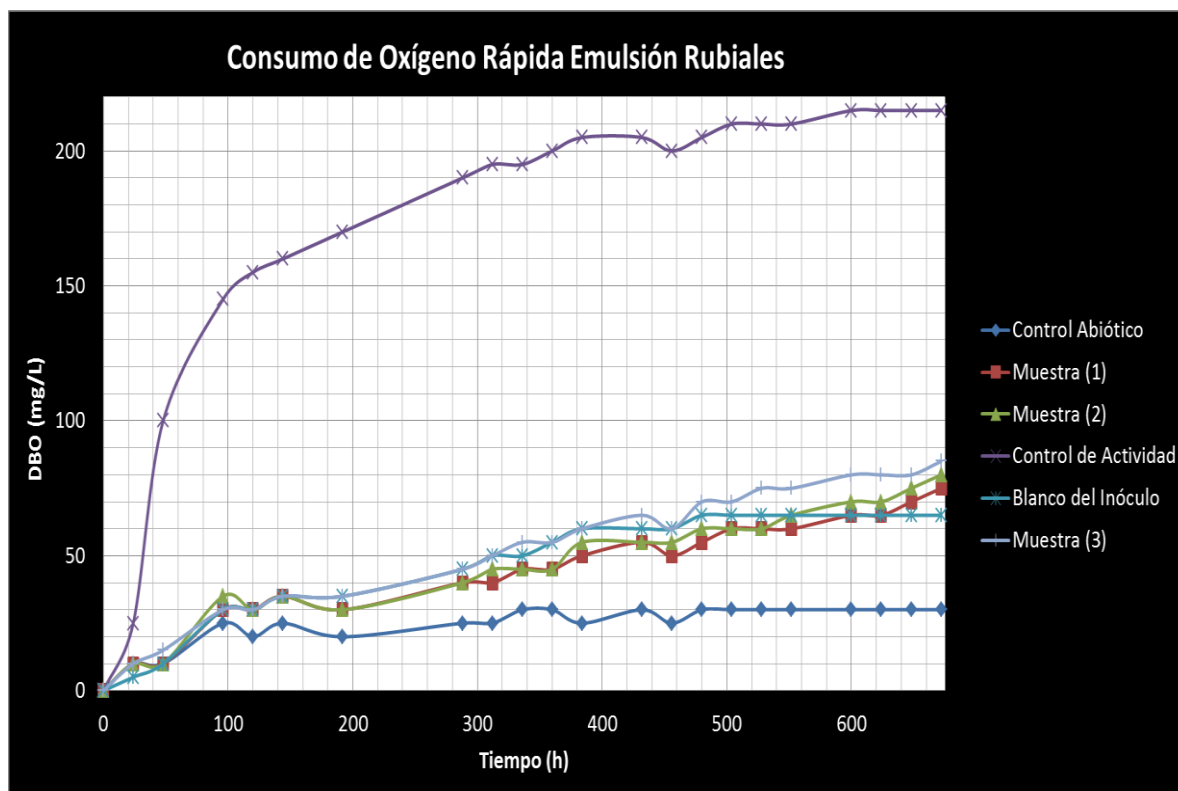
Figura 20. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida en el tiempo del crudo Rubiales y el compuesto referencia.



Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

5.3.3 Emulsión Rubiales. A continuación en la Figura 21, se representa el consumo de oxígeno expuesto como DBO, de la prueba de biodegradabilidad rápida realizada a la emulsión Rubiales objeto de estudio.

Figura 21. Consumo de Oxígeno (DBO) obtenido en los 28 días de la prueba de biodegradación rápida para la Emulsión Rubiales.



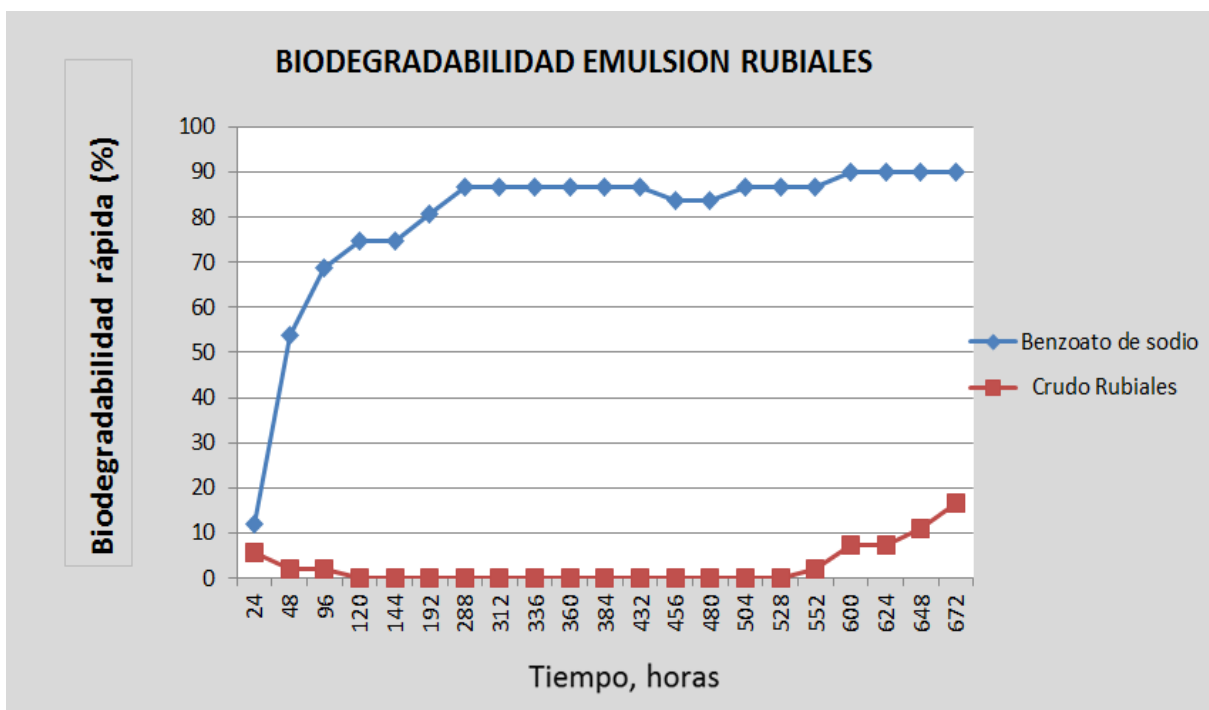
Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

Finalmente, puede observarse que no existe una diferencia marcada entre el consumo de oxígeno obtenido para el blanco del inóculo, que corresponde al consumo de oxígeno registrado únicamente por la actividad bacteriana sin incluir ningún sustrato, y el consumo de oxígeno de la emulsión Rubiales durante el tiempo del análisis.

El porcentaje de biodegradación alcanzado por la emulsión Rubiales en los 28 días de prueba (16.71%) no es suficiente para considerar este material como rápidamente biodegradable. Adicionalmente se puede establecer que técnica y operativamente el ensayo realizado cumplió con los parámetros exigidos de validez para el control de actividad, Benzoato de Sodio, mostrando un porcentaje

de biodegradabilidad del 89.82% al finalizar el ensayo. Sumado a esto alcanzó el límite de aceptabilidad (60% Biodegradación) en tan solo 3 días (ver Figura 22).

Figura 22. Seguimiento de la biodegradabilidad rápida en el tiempo de la Emulsión Rubiales y el compuesto referencia.



Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

De los resultados de biodegradación obtenidos para cada una de las matrices analizadas puede observarse que tienen tendencia de incremento en cuanto a su consumo de oxígeno y por consiguiente su biodegradabilidad. Esta observación permite inferir que posiblemente los compuestos evaluados puedan biodegradarse, pero con una mayor cantidad de tiempo.

5.3.4 Biodegradabilidad Rápida de la Emulsión Rubiales, Crudo Rubiales y el aditivo Emulgrosson. Esquema Comparativo. En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de biodegradabilidad rápida para el aditivo Emulgrosson, crudo Rubiales y Emulsión Rubiales. En ella se observan los criterios de

aceptabilidad de los compuestos en cuanto a Biodegradabilidad Rápida según la guía OECD 301 (OECD, 1992)

Tabla 17. Resultados finales de biodegradabilidad rápida obtenidos para los tres materiales analizados

Muestra	Biodegradabilidad (%)	Rápida* Rápidamente Biodegradable
Emulgrosson	61.01	Si
Crudo Rubiales	11.10	No
Emulsión Rubiales	16.71	No

Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

*Expresado como %ThO₂

Puede observarse que la emulsión Rubiales es en un porcentaje cercano al 5% más rápidamente biodegradable que el crudo Rubiales. Este fenómeno puede estar asociado al efecto surfactante del aditivo el cual como se vio es un compuesto biodegradable, y a que la emulsión por sí misma es un sistema coloidal (dispersión de aceite en finas gotas en fase acuosa), las cuales generan una mayor biodisponibilidad del producto para los microorganismos degradadores. Este principio de dispersión ha sido ampliamente reportado por diversos autores como una de las técnicas más eficientes de biorremediación de derrames de crudo en sistemas acuíferos³⁰.

Debe resaltarse el hecho de la emulsión evaluada puede ser intrínsecamente biodegradable ya que esta técnica está diseñada para materiales más recalcitrantes, pero igualmente biodegradable; teniendo en cuenta que la tendencia observada en el tiempo para este material es el de aumentar su consumo de oxígeno y por ende su biodegradabilidad. Diversos estudios de

³⁰ Prince R.C., McFarlin K.M., Butler J.D., Febbo E.J., Wang F.C.Y, Nedwed T.J. (2013). "The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea". Chemosphere, Vol. 90 (2): pgs 521-526.

biodegradabilidad simulada pueden realizarse con el fin de reproducir de forma más acertada las condiciones ambientales que se verían afectadas por este producto³¹.

5.4 CRITERIO BIODEGRADABILIDAD - ECOTOXICIDAD DEL RIEGO AMBIENTAL

En la tabla 18 se resumen los resultados obtenidos en los análisis realizados a los tres materiales estudiados y se observa que únicamente para el caso del aditivo Emulgrosson se obtuvo un resultado favorable para el medio ambiente, siendo este último una sustancia rápidamente biodegradable.

Tabla 18. Resumen de resultados

Material	Factor Biodegradabilidad Rápida	Factor Ecotoxicidad
Emulgrosson	Rápidamente Biodegradable	Tóxica para el medio acuático
Crudo Rubiales	No Rápidamente Biodegradable	Nociva para el medio acuático*
Emulsión Rubiales	No Rápidamente Biodegradable	Nociva para el medio acuático**

Fuente: Laboratorio Toxicología Ecopetrol-ICP

*WAF

**CEWAF

³¹ Bao M., Wang L., Sun P., Cao L., Zou J., Li Y. (2012). "Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment". Marine Pollution Bulletin, 64, 1177-1185.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de ecotoxicidad y biodegradabilidad se concluye que una afectación del medio ambiente ocasionada por un derrame de la emulsión Rubiales es potencialmente perjudicial para el ecosistema. Su manejo debe hacerse dentro de los lineamientos de seguridad prescritos para este tipo de sustancias y es necesario realizar mayores estudios con el fin de determinar cuan perjudicial pueda ser en los diferentes ecosistemas de Colombia.

6. CONCLUSIONES

PRUEBAS DE TOXICIDAD:

El crudo Rubiales y la emulsión Rubiales (Crudo Rubiales + Emulgrosson), fueron catalogados como nocivos para el medio acuático, mientras que el Emulgrosson® fue catalogado como tóxico para el medio acuático.

No se encontró interacción tóxica entre el aditivo emulsificante y el crudo para la mayoría de las especies de ensayo.

Se comprobó incremento de toxicidad del crudo cuando se le adicionó emulsificante en los ensayos conducidos con *Daphnia pulex*, probablemente debido a que su estructura y propiedades anfotéricas causan la disolución de membranas del organismo.

El aditivo resulto más toxico que el crudo y la emulsión (crudo + emulsificante) para la mayoría de especies de ensayo, sin embargo al ser rápidamente biodegradable no representará un riesgo alto para el medio ambiente.

PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD

El aditivo Emulgrosson se considera rápidamente biodegradable bajo las condiciones experimentales realizadas empleando un inóculo no pre-adaptado. Esto implica que este compuesto corresponde a un material “verde” que no se acumula en el medio ambiente.

Se observó que la emulsión Rubiales (Biodegradación: 16.71 %), es menos recalcitrante al medio ambiente que el crudo Rubiales por si solo (Biodegradación: 11.10 %); esto debido al efecto de biodisponibilidad que se ve incrementado por la

formación de micelas de menor tamaño, las cuales son más asequibles a los microorganismos que pueden biodegradar los compuestos presentes en el crudo

Los resultados de biodegradabilidad encontrados para la emulsión Rubiales indican que esta no es rápidamente biodegradable en agua dulce y puede permanecer presente en el medio acuífero por lo que deben formularse estrategias de mitigación y formulación de protocolos de manejo de residuos.

7. RECOMENDACIONES

Se sugiere hacer mediciones de hidrocarburos totales en las soluciones WAF Y CWAF para tener como base de los cálculos toxicológicos una variable medida y no nominal, lo que nos acercaría más a la exposición real de los organismos al hidrocarburo y al hidrocarburo dispersado.

Se deben realizar estudios más profundos acerca de la biodegradabilidad de la emulsión Rubiales, ya sea estudios de biodegradabilidad simulada e inherente; con el fin de establecer con mayor precisión cual es el tiempo que toma en degradarse la emulsión estudiada.

De igual forma, se sugiere realizar estudios de biodegradabilidad en suelos ya que el transporte en línea (oleoductos) de este producto se realiza mayoritariamente por tierra. La definición del tipo o los tipos de suelo de acuerdo al impacto que puedan llegar a causar comprende un interrogante que debe responderse.

Formular estrategias de mitigación y protocolos de manejo de residuos como resultado de posibles incidentes ambientales, que junto con estudios de biodegradación de la emulsión Rubiales acompañada de agentes que puedan dar solución a un posible impacto ambiental, serían un adelanto en cuanto a las medidas de mitigación que puedan tomarse en caso de presentarse un evento en el cual se vea afectado el medio ambiente.

BIBLIOGRAFIA

APHA. 2012. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington: Ed Andrew D. Eaton, Lenore S. Clesceri; Arnold E. Greenberg. 22nd Ed.

ALABASTER, J. S., AND R. LLOYD. 1980. Water quality criteria for freshwater fish. European Inland Fisheries Advisory Commission Report (FAO). Buttersworth, London-Boston.

BAO M., WANG L., SUN P., CAO L., ZOU J., LI Y. (2012). "Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment". Marine Pollution Bulletin, 64, 1177-1185.

Becher, Encyclopedia of Emulsion Technology, Theory and Practice. (1998). Vol.4. Editorial CRC Press.

Bhattacharyya, S., Klerks, P.L. & Nyman, J. a. (2003) Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987), 122, 205–15.

Boethling R.S., Lynch D.G., Thom, G.C. (2003) "Predicting ready biodegradability of premanufacture notice chemicals". Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 837–844.

BARRON, M.G. & KA'AIHUE, L. (2003) Critical evaluation of CROSERF test methods for oil dispersant toxicity testing under subarctic conditions. Marine pollution bulletin, 46, 1191–9.

BRAUTBAR, N. & WILLIAMS, J. (2002) Review Industrial solvents and liver toxicity : Risk assessment , risk factors and mechanisms. , 491.

CARLS, M.G., HOLLAND, L., LARSEN, M., COLLIER, T.K., SCHOLZ, N.L. & INCARDONA, J.P. (2008) Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands), 88, 121–7.

CHAPMAN, P.M. (2007) Determining when contamination is pollution - weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment international*, 33, 492–501.

Clark, J.R., Bragin, G.E., Febbo, E.J. & Letinski, D.J. (1993) Toxicity of physically and chemically dispersed oils under continuous and environmentally realistic exposure conditions : Applicability to dispersant use decisions in spill response planning. *International oil spill conference*.

Finney, D. J. and W. L. Stevens. 1948. "A table for the calculation of working probits and weights in Probit analysis." *Biometrika* 35: 191-201.

Grosso, J.L., Afanador E., Vidales H., Hernandez F., (1999) Efecto del contenido de aceite en la estabilidad de emulsiones inversas. *Jornadas Ciencia y Tecnología- para el Avance de la Ciencia*. Ecopetrol Instituto Colombiano del Petróleo.

Hayes, M.O., R. Hoff, J. Michel, D. Scholz, and G. Shigenaka, R.N.H. 92-4. (1992) *An Introduction To Coastal Habitats And Biological Resources For Oil Spill Response*. Washington.

Heintz, R. a, Short, J.W., Rice, S.D. & Carls, M.G. (2008) Comment on “Toxicity of weathered Exxon Valdez crude oil to pink salmon embryos”. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 27, 1475–6; author reply 1476–8.

Jurado E, Fernández-Serrano M, Núñez-Olea J, Lechuga M, Jiménez JL, Ríos F (2011). “Effect of concentration on the primary and ultimate biodegradation of alkylpolyglucosides in aerobic biodegradation tests”. *Water Environ Res.*, 83, 154-16.

Lima, A.L.C., Farrington, J.W. & Reddy, C.M. (2005) Combustion-Derived Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment—A Review. *Environmental Forensics*, 6, 109–131.

Liwarska-Bizukojc E, Gendaszewska D. (2013). “Removal of imidazolium ionic liquids by microbial associations: Study of the biodegradability and kinetics”. *J Biosci Bioeng.* 115, 71-75.

Milinkovitch T., Imbert N., Sanchez W., Le Floch S., Thomas-Guyon H. (2013). “Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: Biomarkers in the heart of the juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*)”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 1-8.

Murata, M., Tsujikawa, M. & Kawanishi, S. (1999) Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*, 261, 478–83.

Newman M.C. & M.A. Unger. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology* 2nd Edition. Lewis (Eds). CRC press. Florida U.S.

OECD-201. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo.2006. Guidelines for the testing of chemicals Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

OECD-202. 2004. Guidelines for the testing of chemicals Daphnia sp., Immobilization test.

OECD-203. 1992. Guidelines for the testing of chemicals. Fish, Acute Toxicity Test.

OECD-301c.1992. Guidelines for the testing of chemicals, Ready Biodegradability. MITI (Ministry of International Trade and Industry, Japan.

OECD. 2000. Series on Testing and Assessment number 23. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures.

Pedrazzani R., Ceretti E., Zerbini L., Casale R., Gozio E., Bertanza G., Gelatti U., Donato F., Feretti D. (2012). "Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations". Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 84: pgs 274-281.

Prince R.C., McFarlin K.M., Butler J.D., Febbo E.J., Wang F.C.Y, Nedwed T.J. (2013). "The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea". Chemosphere, Vol. 90 (2): pgs 521-526.

Ramachandran, S.D., Hodson, P. V, Khan, C.W. & Lee, K. (2004) Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. Ecotoxicology and environmental safety, 59, 300–8.

Rand G.M., P.G. Wells, y L.S. Mcarty. 1995. Introduction to aquatic ecotoxicology. In: Fundamentals of Aquatic Ecotoxicology Effects, Environmental fate and Risk Assesment. 2nd Edition. Gary M. Rand (Eds.). CRC press. Florida U.S.

Rodriguez, L., Barrero R., Patiño, E., (2010). Workshop Crudos Pesado. Poster "Alternativas transporte crudos pesados". Villavicencio.

Shailaja, M.S., Rajamanickam, R. & Wahidulla, S. (2006) Increased formation of carcinogenic PAH metabolites in fish promoted by nitrite. Environmental pollution (Barking, Essex : 1987), 143, 174–7.

Shang, Q., Yang, X., Gao, C., Wu, P., Liu, J., Xu, Y., Shen, Q., Zou, J. & Guo, S. (2011) Net annual global warming potential and greenhouse gas intensity in Chinese double rice-cropping systems: a 3-year field measurement in long-term fertilizer experiments. Global Change Biology, 17, 2196–2210.

Singer, M.M., Aurandà, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelhoà, G.M. & Sowby, M.L. (2000) Standardization of the Preparation and Quantitation of Water-accommodated Fractions of Petroleum for Toxicity Testing. , 40, 1007–1016.

Speight, J.G. (1999) The Chemistry and Technology of Petroleum. 3rd Edition. Marcel Dekker, New York.

Trautwein C, Kümmerer K. (2012). "Ready biodegradability of trifluoromethylated phenothiazine drugs, structural elucidation of their aquatic transformation products, and identification of environmental risks studied by LC-MS (n) and QSAR". Environ Sci Pollut Res Int. Vol. 19 (8): pgs. 3162-3177.

Umbuzeiro, G. a, Franco, A., Martins, M.H., Kummrow, F., Carvalho, L., Schmeiser, H.H., Leykauf, J., Stiborova, M. & Claxton, L.D. (2008) Mutagenicity

and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutation research*, 652, 72–80.

US EPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms 5th Edition. EPA-821-R-02-012.

Vázquez-Rodríguez G.A., Garabétian F., Rols JL (2007). “Inocula from activated sludge for ready biodegradability testing: Homogenization by preconditioning”. *Chemosphere*, 8, 1447-1454.

Viganò, L., Camoirano, A., Izzotti, A., D’Agostini, F., Polesello, S., Francisci, C. & De Flora, S. (2002) Mutagenicity of sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas. *Mutation research*, 515, 125–34.

Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly y D.B. Peakall. 2006. Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis group (Eds). Florida U.S.

Xu, X., Li, Y., Wang, Y. & Wang, Y. (2011) Assessment of toxic interactions of heavy metals in multi-component mixtures using sea urchin embryo-larval bioassay. *Toxicology in vitro*, 25, 294–300.

Zevenhoven, R. & Kilpinen, P. (2002) Control of Pollutants in Flue Gases and Fuel Gases, 2nd ed (eds R Zevenhoven and P Kilpinen). The Nordic Energy Research Programme Solid Fuel Committee, Espoo.

ANEXOS

Anexo A. Demanda Teórica de Oxígeno (ThOD)

La demanda teórica de oxígeno puede calcularse si se conoce la composición elemental o formula empírica del compuesto. Por ejemplo para el compuesto:

CcHhClclNnNanaOoPpSs

La ThOD sin nitrificación sería:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1(h-cl-n)}{2} + 3s + \frac{5p}{2} + \frac{1na}{2} - o \right] mg/mg}{PM} \quad (1)$$

El cálculo de ThOD considerando nitrificación es como se indica a continuación:

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1(h-cl)}{2} + 3s + \frac{5n}{2} + \frac{5p}{2} + \frac{1na}{2} - o \right] mg/mg}{PM} \quad (2)$$

Donde PM es el peso molecular.

Anexo B. Preparación del Medio Mineral para Biodegradabilidad Rápida según la Guía OECD 301C

Preparar las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico.

a) Fosfato di hidrógeno de potasio, KH_2PO_4 : 8.50g

Fosfato di básico de potasio K_2HPO_4 : 21.75g

Ortofosfato di sódico dodecahidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 44.60g

Cloruro de Amonio, NH_4Cl : 1.70g

Disolver en agua y completar hasta 1 litro. El pH de la solución debe ser 7.2.

b) Sulfato de magnesio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 22.50 g

Disolver en agua y completar hasta 1 litro.

c) Cloruro de Calcio anhidro, CaCl_2 : 27.50g

Disolver en agua y completar hasta 1 litro.

d) Cloruro de Hierro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g

Disolver en agua y completar hasta 1 litro.

Preparación del Medio Mineral

Tomar 3 mL de cada solución (a), (b), (c) y (d) y llevar a un litro.

Anexo C. Materiales Y Reactivos Pruebas De Biodegradabilidad Rapida

Materiales:

- 6 Medidores electrolíticos automático de DBO Oxitop
- Baño termostático de temperatura constante ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) o una recamara Oxitop Box
- Agitadores magnéticos
- Plancha de agitación magnética de 6 puestos (Oxitop Box)

Reactivos

- Fosfato ácido de potasio, KH_2PO_4
- Ortofosfato dibásico de potasio K_2HPO_4
- Ortofosfato disódico dodecahidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de Amonio, NH_4Cl
- Sulfato de magnesio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Cloruro de Calcio anhidro, CaCl_2
- Cloruro de Hierro III hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

La preparación de las soluciones madre para el medio mineral se muestra en el *Anexo 2*.

Anexo D. Preparación del Ensayo Biodegradabilidad Rápida

Preparación de frascos

Para cada montaje se preparan los siguientes frascos:

Frasco 1: Sustancia de prueba en agua 100 mg/L

Frasco 2,3 y 4: Sustancia de prueba en el medio mineral 100mg/L

Frasco 5: Compuesto de referencia en medio mineral 100 mg/L

Frasco 6: Únicamente medio mineral

Se adicionó un adsorbente de CO₂ a cada uno de los frascos. Se ajustó el pH en los frascos 2, 3 y 4 a 7.0 antes de la inoculación.

Procedimiento:

Se inocularon los frascos 2, 3 y 4 (suspensiones de prueba), 5 (control de actividad) y 6 (blanco de inóculo) con una pequeña cantidad de inóculo de tal forma que se obtuvo una concentración de 30 mg/L de sólidos suspendidos. No se adicionó inóculo a la botella 1, ya que esta funciona como control abiótico. Se ajustó el equipo y se verificó que no existiesen fugas ni entradas de aire, luego se iniciaron los agitadores y se comenzó la lectura de toma de oxígeno (en usencia de luz). Se verificó constantemente la temperatura, la agitación y los demás dispositivos teniendo en cuenta cualquier cambio en la coloración de las muestras día a día.