

Evaluation of a surfactant of natural origin as a dispersant in oil spills in seas

Duvanís Enrique Herazo-Navajas ^a & Antonio Romero-Hernández ^{b†}

^a Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad Ciencias, Medellín, Colombia. deherazon@unal.edu.co

^b Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Minas, Medellín, Colombia. aromero@unal.edu.co

Received: January 27th, 2021. Received in revised form: May 25th, 2021. Accepted: June 18th, 2021.

Abstract

Among the different agents for controlling oil spills in seas, natural dispersant formulations are presented as a sustainable alternative to conventional chemical dispersants. This study analyzes the efficiency of a surfactant mixture of vegetable origin with D-limonene solvent, to disperse petroleum hydrocarbons present in salt water bodies. This was evaluated with two types of commercial hydrocarbons in Colombia: Castilla Blend crude of 19.1 ° API and South Blend crude of 29.8 ° API. The data showed an average dispersion effectiveness of 22.83% for Castilla Blend and 49.98% for South Blend crude respectively. These results reveal the potential of natural surfactant mixtures to be an ecological and economical solution in the control of hydrocarbon spills.

Keywords: natural surfactant; efficiency; dispersants; oil spill.

Evaluación de un surfactante de origen natural como dispersante en derrames de hidrocarburos en mares

Resumen

Entre los diferentes agentes de control de derrames de hidrocarburos en mares, las formulaciones dispersantes naturales se presentan como una alternativa sostenible frente a los convencionales dispersantes químicos. Este estudio analiza la eficiencia de una mezcla surfactante de origen vegetal con solvente D-limoneno, para dispersar hidrocarburos del petróleo presentes en cuerpos de agua salada. Esto se evaluó con dos tipos de hidrocarburos comerciales en Colombia: crudo Castilla Blend de 19,1° API y crudo South Blend 29,8° API. Los datos mostraron un promedio de efectividad de dispersión del 22.83% para el Castilla Blend y un 50% para el crudo South Blend respectivamente. Estos resultados revelan el potencial de las mezclas surfactantes naturales para ser una solución ecológica y económica en el control de derrames de hidrocarburos.

Palabras clave: surfactante natural; eficiencia; dispersantes; derrame de hidrocarburos.

1. Introducción

El aumento de las operaciones costeras y el transporte fluvial de las compañías petrolíferas, motivadas por la actual demanda mundial de recursos fósiles debido al crecimiento poblacional, aumentan el riesgo de los derrames de hidrocarburos. Las acciones que se han implementado para contrarrestar los derrames de petróleo varían de acuerdo con el caso, siendo los dispersantes químicos los utilizados como una medida rápida para contrarrestarlos [1].

En el año 2010, la explosión de la plataforma petrolera Deepwater Horizon, situada en el golfo de México, implementó

como medida de contingencia la aplicación de un estimado sin precedentes de aproximadamente 2.1 millones de galones de dispersante químico de petróleo, representando así una amenaza para el medioambiente marino, como consecuencia de los componentes altamente tóxicos [2]. Por lo tanto, la búsqueda de dispersantes eficientes, pero menos tóxicos, se ha convertido en un ímpetu fundamental en la actualidad.

El principal objetivo ante un derrame de hidrocarburos en mares es contener el avance de la mancha para lo cual existen diversos mecanismos de respuesta: agentes biológicos, agentes de hundimiento, agentes de recolección superficial y dispersantes químicos. Estos últimos son los de mayor

implementación debido a su alta eficiencia, disponibilidad y fácil aplicación en campo; sin embargo, recientemente su uso está siendo limitado por causa de los efectos adversos que estos tienen sobre el medio ambiente. Ostroumov (2003) describe, por ejemplo, cómo los tensoactivos sintéticos y sus mezclas químicas inhiben la actividad de filtración de ostras y mejillones

Con lo cual, la actual preocupación en materia ambiental ha conducido a los gobiernos hacia normativas ambientales más estrictas, obligando a las industrias a hallar alternativas como los surfactantes naturales [3]. Por ello, el objetivo de este trabajo descansa en evaluar la eficiencia de una mezcla surfactante natural obtenida a partir de materias primas como el coco y la naranja, entre otras, en el tratamiento de agua de mar contaminada con petróleo crudo, como una solución alternativa a los dispersantes químicos convencionales.

2. Riesgos derivados de los hidrocarburos del petróleo

La contaminación de los suelos y las aguas subterráneas por los hidrocarburos se ha convertido en un foco de gran preocupación tanto en los países industrializados como en los países en desarrollo, debido a su amplia distribución ambiental, que puede llegar al suelo, las aguas subterráneas y el aire [4]. Los hidrocarburos BTEX presentes en la composición de gasolina y gasóleo son los primeros en llegar a la capa freática, pues sus constituyentes son solubles en agua [5]. En consecuencia, estos compuestos altamente tóxicos (excepto el etilbenceno) son las principales causas de muerte por toxicidad [6].

En ese orden de ideas, Fellenberg (1980) informó que cuando está en contacto con el agua, el petróleo y sus subproductos se esparcen y forman una capa delgada en la superficie que impide el intercambio de gases entre el aire y el agua, y bloquea la luz solar al fitoplancton interrumpiendo la cadena alimenticia.

La exposición a hidrocarburos BTEX durante un largo periodo de tiempo a bajas concentraciones presenta una serie de efectos crónicos. Entre ellos, el benceno es considerado como el más tóxico, y puede causar la depresión de las células sanguíneas primitivas pluripotentes, que se extiende a través de cualquier etapa de maduración celular, daño a la médula ósea, como necrosis, edema, hemorragia y fibrosis, que también interfieren con la producción de células sanguíneas; leucemia y cáncer de hígado.

3. Mezcla Surfactante de origen vegetal

Las saponinas, los surfactantes más conocidos a base de plantas, son compuestos glucosídicos que contienen o bien un triterpenoide o un esteroide alcaloide como núcleo hidrófobo (aglicona) [7,8]. El núcleo está conectado a cadenas hidrofílicas de azúcar a través de enlaces éter o éster. Las presencias simultáneas de aglicona y cadenas de azúcar proporcionan actividad superficial. Los surfactantes naturales son biodegradables, biocompatibles y menos tóxicos y, por ello, representan menos amenaza para el medioambiente. Al respecto, Molgaard et al. (2000) demostraron la biodegradación completa de Endod (*Phytolacca dodecandra*L'Herit) en 10 días; se pueden producir en grandes cantidades a bajo costo y se utilizan en actividades de control ambiental como el manejo de

emulsiones industriales, el control de derrames de petróleo, la desintoxicación de efluentes industriales y la biorremediación de suelos contaminados [7].

El solvente limoneno es un terpeno, proveniente de aceites esenciales de plantas aromáticas como las frutas cítricas (limón, naranja, mandarina, entre otras), y cuentan con propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y antioxidantes. Se encuentra presente en distintas variedades de cítricos en altos contenidos, especialmente en su piel o cáscara, al igual que en plantas como el Romero, Hierba Luisa y en maderas como el Palo Santo [8]. El D-Limoneno (también llamado R o alfa) posee un intenso aroma a cítricos mientras que el del isómero-L (llamado a su vez S o beta) el olor es más parecido al pino [9]. Normalmente el limoneno se cataloga como solvente, puesto que una parte de su estructura se inserta en la película interfacial mientras que el resto se distribuye entre las fases acuosas e hidrofóbica, por lo cual se aprovecha en la formulación de agentes desengrasantes [10]. Por último, cabe resaltar que la toxicidad del D-Limoneno es muy baja. Estudios realizados con el objetivo de determinar la toxicidad aguda y los efectos de tipo ansiolítico en el manejo de la ansiedad en animales, indicaron que después del tratamiento agudo con limoneno a dosis de 25, 50 y 75 mg/kg, no se observó mortalidad durante los 14 días de observación; razón por la cual se considera un compuesto seguro para el uso en humanos y medioambiente [11].

4. Modelo cinético de biodegradación

Las reacciones de degradación de los hidrocarburos presentes en el agua pueden seguir cinéticas de distinto orden. No obstante, de forma general, se pueden describir como modelos cinéticos de primer orden donde la degradación de los hidrocarburos varía en función del tiempo, como se muestra en la Ec. 1 [12].

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (1)$$

En donde:

C_0 : Concentración inicial de petróleo expresada en [HTP] en el tiempo cero.

C : Concentración en el tiempo t

Por lo tanto, una representación gráfica del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo arroja una línea recta, cuya pendiente se puede relacionar con la constante de degradación (k).

De la Ec. 1 es posible determinar el tiempo de vida media del contaminante, este indica el tiempo en el cual la concentración del contaminante que se encontraba inicialmente se reduce a la mitad.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K} \quad (2)$$

4.1 Equipos y métodos

4.2 Caracterización de la mezcla surfactante natural

El surfactante en estudio es una mezcla sinérgica de nutrientes, biosurfactantes, disolventes naturales de grasa-petróleo y agentes secuestrantes, extraídos por la técnica de

Tabla 1.

Características de la mezcla surfactante natural de prueba	
Propiedad	Descripción
Color	Ligeramente transparente
Aspecto	Líquido ligeramente viscoso
Viscosidad (cps)	Ligera (110 a 37°C)
Material	Mezcla líquida homogénea
Solubilidad en agua	99 %
Punto de inflamación	Líquido no inflamable
Punto de ebullición	92 °C
Olor	Característico
Densidad de vapor (Aire = 1.00)	0.62
Evaporación (Acetato Butílico =1)	0.7
Gravedad específica (wt/litro)	2.27
Punto derretimiento	NA
Viscosidad	110 cps
Materia insoluble	0.65 %
Presión de vapor @200C:	17.0 mm
Porcentaje volátil por volumen	Ninguno
Tensión Externa (dynes/cm @250C):	29.5

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2

Características del solvente de la mezcla surfactante natural de prueba	
Propiedad	Descripción
CAS	5989-275
Nombre químico	1-metil-4-(1-metiletetil) ciclohexeno
Fórmula química	C10H16
Peso molecular	136.23
Punto de fusión (°C)	74.35
Punto de ebullición (°C)	176
Densidad (g/cm ³ a 20 a °C)	0.841
Presión de vapor (Pascales a 20 a °C)	190

Fuente: Elaboración propia.

presado en frío a partir de materias primas vegetales. La Tabla 1 y 2, presenta las propiedades de la mezcla surfactante natural en estudio saponina y el solvente D - Limoneno [13] respectivamente.

Para este estudio se buscaron dos petróleos de referencia estándar, de acuerdo con los tipos de hidrocarburos de producción en Colombia, el Castilla Blend de 19.1° API y el South Blend de 28.6° API. También, se usó agua de mar sintética para el presente estudio. La disolución de agua de mar sintética se preparó disolviendo 34 g de sal marina en 1 L de agua destilada (es decir, con una salinidad de 34 ppt) y proporciona una lista de la composición iónica de la mezcla de sal marina.

4.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Las concentraciones de evaluación de la mezcla surfactante natural se determinaron mediante el índice de emulsificación ID24, para lo cual realizó un diseño factorial de cinco niveles de dos factores, dos réplicas para un total de 20 corridas, empleando el programa informático Minitab18 (ver Tabla 3).

Así pues, para la prueba de eficiencia de dispersión de hidrocarburos, una vez que fue verificado el cumplimiento de la distribución normal de los datos mediante la prueba de T test y la homogeneidad de varianzas por el método T test para muestras independientes, los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado. La evaluación de los datos fue procesada con el programa estadístico Statistica versión 9.

Tabla 3.

Diseño de experimentos ID24
CM - Control MSN (0 %, p/v), MSN 1 - MSN (3 %, p/v), MSN 2 - MSN (5 %, p/v), MSN 3 - MSN (7 %, p/v), MSN 4 - MSN (10 %, p/v), CB - Castilla Blend, SB - South Blend. R1 - réplica 1 del experimento, R2 - réplica 2 del experimento, E24 - índice de emulsificación a 24 horas, MSN - Mezcla Surfactante Natural.

Experimento	Niveles de tratamiento									
	CM		MSN 1		MSN 2		MSN 3		MSN 4	
Replicas	CB	SB	CB	SB	CB	SB	CB	SB	CB	SB
Parámetro de medición	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
n	E24	E24	E24	E24	E24	E24	E24	E24	E24	E24

Fuente: Elaboración propia

Para determinar el efecto de surfactante natural sobre los HTP, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos, un factor y una repetición por tratamiento.

4.3.1. Índice de emulsificación (E24)

La estabilidad de las emulsiones generadas por la mezcla surfactante natural se analizó por medio del índice de emulsificación E24, de acuerdo con la metodología descrita por Abouseoud et al. (2008). De este modo, un volumen determinado del surfactante (4 mL) se adicionó a un tubo de ensayo que contuvo un volumen también determinado (6 mL) de la sustancia a emulsificar (crudo de petróleo). Posteriormente, el contenido de los tubos fue agitado con la ayuda de un vórtex por 2 minutos y puesto en reposo por 24 horas. Finalmente, el índice de emulsificación (E24) se obtuvo de la división del tamaño en milímetros de la emulsión generada, entre el total de la altura en milímetros de la mezcla multiplicada por 100 (ver Ec. 7). Los ensayos de E24 fueron realizados empleando los crudos Castilla Blend y South Blend.

$$E24 = \frac{\text{Haltura de Emulsión (mm)}}{\text{haltura de mezcla (mm)}} * 100 \quad (1)$$

4.3.1 Evaluación de la eficiencia de dispersión (SFT)

La determinación de la eficiencia de dispersión de la mezcla surfactante natural se realizó por medio de la prueba Swirling Flask, utilizada por la Environmental Protection Agency (1994). Esta emplea un matraz Erlenmeyer modificado de 125 mL con boquilla lateral, para extraer las muestras de agua superficiales cerca del fondo del matraz sin alterar la capa superficial de aceite. A su vez, se agregó un volumen conocido de agua de mar y luego se adicionó 100µl de premezcla de hidrocarburo/mezcla dispersante natural. Se agitó a 150 rpm durante 20 minutos, luego se retiró una muestra en un embudo de separación adicionando cloruro de metileno (diclorometano-DCM). Posteriormente, se agitó y luego de 10 minutos de estabilización se retiró una muestra de agua para analizar el contenido de aceite por espectrofotometría de absorción UV-visible a longitudes de onda de 340, 370 y 400 nm. El procedimiento continuo como se detalla a continuación:

1) Las muestras se analizaron utilizando un

espectrofotómetro UV a 340, 370 y 400 nm de longitud de onda, y se determinó la cantidad de aceite como sigue:

$$C_x = (A_x) \times (RF_x) \times (VDCM) \times (V_{tw} / V_{ew}) \quad (2)$$

Donde:

C_x = Masa total del petróleo dispersado en remolino en la longitud de onda x ($x = 340, 370$ o 400 nm).

A_x = Absorción espectrofotométrica a la longitud de onda x .

RF_x = Factor de respuesta media a la longitud de onda x (determinado a partir de la Ec. 1).

$VDCM$ = Volumen final de extracto de DCM de la muestra de agua (20 mL).

V_{tw} = Volumen total de agua en un recipiente de matraz de remolino (120 mL).

V_{ew} = Volumen de agua extraída para el contenido de aceite dispersado (30 mL).

1. Se obtuvieron tres valores de concentración para el aceite en cada muestra de agua (340, 370 y 400 nm).

2. La media de tres valores estableció lo siguiente:

$$C_{prom} = (C_{340} + C_{370} + C_{400}) / 3 \quad (3)$$

1. Se determinó el rendimiento del dispersante (es decir, el porcentaje de aceite que está disperso, o EFF del inglés efficient) basado en la proporción de aceite dispersado en el sistema de ensayo al aceite total añadido al sistema, así:

$$EFF (\%) = (C_{mean} / C_{TOT}) \times 100 \quad (4)$$

Donde:

C_{mean} = Valor medio de la masa total de aceite dispersado en el matraz de turbulencia determinado por análisis espectrofotométrico.

C_{TOT} = Masa total de aceite inicialmente añadida al matraz experimental de turbulencia.

1. Se calculó EFF usando la Ec. 10 para experimentos acoplados con y sin dispersante. EFFc es la eficacia del control y representa la dispersión natural del aceite en el aparato de ensayo, y EFFd es el valor no corregido medido.

2. El rendimiento final de dispersante natural después de corregir la dispersión natural se calculó usando la Ec. 11.

$$EFFD = EFFd - EFFc \quad (5)$$

Donde:

EFFD = % de aceite dispersado solo por dispersante

EFFd = % de aceite dispersado con dispersante añadido

EFFc = % de aceite dispersado sin dispersante adicional.

1. Por último, el valor medio de efectividad del dispersante se calculó sumando los valores corregidos (EFFD) para cada una de las cuatro repeticiones, para cada aceite de prueba y dividiendo esta suma entre ocho.

En el montaje se utilizaron 4 canecas metálicas de 55 galones, a las cuales se adicionaron 20 galones de agua de mar natural. Asimismo, se aplicaron tres concentraciones diferentes de la mezcla surfactante y un control a concentración 0 %, sobre un volumen de 250 mL de hidrocarburo Castilla Blend (18.8° API). Por último, se agitó durante 5 minutos al día a 30 RPM con un taladro modificado.

El contenido de hidrocarburos totales se determinó mediante el método gravimétrico para la determinación de grasas y aceites en agua 5520D. APHA-AWWA-WEF. Esta prueba se llevó a cabo para ensayos a escala piloto, mediante el Laboratorio Ambiental y de Alimentos (LMB) de Barranquilla. Muestras de 1 litro fueron tomadas en frascos de vidrio boca ancha y luego fueron enviadas teniendo en cuenta los procedimientos técnicos.

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación de actividad emulsificante

Durante la evaluación fue posible observar valores máximos del índice de emulsificación E24 de 100 % para una concentración de 10 % (p/v) del surfactante sobre petróleo Castilla Blend, y un índice de emulsificación E24 de 100 % para una concentración de 5 % (p/v) sobre petróleo South Blend, mientras que la muestra control negativo a concentración del surfactante 0 % (p/v) no presentó emulsificación (ver Tabla 4).

En la tabla 4, se muestran los porcentajes del índice de emulsificación obtenidos de la mezcla surfactante natural para dos Pétroleos de referencia en Colombia: Castilla Blend (18.8 ° API) y South Blend (28.6 ° API). El comportamiento de la curva sugiere que para petróleos livianos se alcanzan emulsiones del 100 % con menores concentraciones del surfactante natural, mientras que para petróleos más pesados como el Castilla Blend es necesario una mayor concentración del surfactante, para así obtener mayores emulsiones.

Debido a la cercanía de los datos en los tratamientos en estudio, fue necesario analizar si, en efecto, existía diferencia significativa entre estos. Lo anterior, con el propósito de poder determinar la relación entre la concentración de la mezcla surfactante y el tipo de hidrocarburo de prueba sobre el índice de emulsificación. Para ello, fue necesario llevar a cabo un análisis de varianza y una comparación de efecto principales múltiples mediante un diagrama de Pareto de efectos estandarizados, empleando el programa informático Minitab (ver Tabla 5).

Tabla 4.

Efecto de la concentración del surfactante natural y los tipos de hidrocarburos de prueba sobre el índice de emulsificación IE24 (%).

Concentración del surfactante natural (p/v)	Índice de Emulsificación E24%	
	Petróleo Castilla Blend (18.8 ° API)	Petróleo South Blend (28.6° API)
0.0	0, 0	0, 0
3.0	75, 67	75, 75
5.0	79, 75	100, 100
7.0	89, 78	100, 100
10.0	97, 97	100, 100

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5.

Análisis del índice de emulsificación mediante análisis de varianza.
CS * TH - Concentración del surfactante * Tipo de hidrocarburo, CSN -
Concentración del surfactante natural

Fuente	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	26970.1	2996.67	298.18	0.000
Lineal	26576.2	5315.25	528.88	0.000
CSN	26143.8	6535.95	650.34	0.000
Tipo de hidrocarburo	432.4	432.45	43.03	0.000
Interacciones de 2 términos	393.8	98.45	9.80	0.002
CS * TH	393.8	98.45	9.80	0.002
Error	100.5	10.05		
Total	27070.6			

Fuente: Elaboración propia

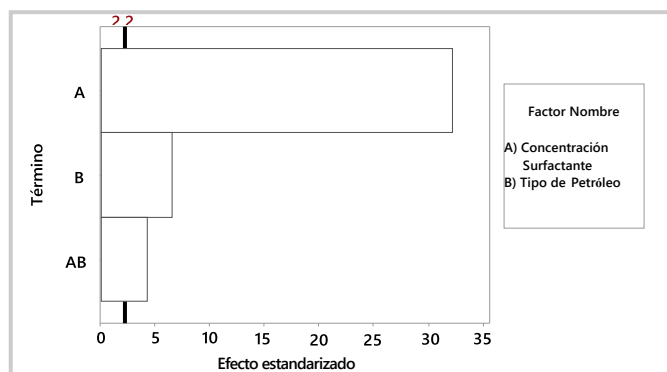


Figura 1. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para estabilidad de la emulsión.

Fuente: Elaboración propia

Ahora bien, se pudo corroborar que existen diferencias altamente significativas entre la concentración de surfactante y el tipo de hidrocarburo con respecto al índice de emulsificación, con valores ($p < 0.000$), a un nivel de confianza del ($p < 0.005$). Además, la interacción entre los dos, la concentración de surfactante y el tipo de petróleo también presenta efecto significativo con valor ($p < 0.002$). Esto puede apreciarse en el diagrama de Pareto de efectos estandarizados establecido en la Fig. 1. Este permite identificar en qué medida los componentes rigen el comportamiento de una variable, observando que el parámetro con mayor efecto es la concentración del surfactante, seguido por el tipo de hidrocarburo y en menor medida la interacción de ambos.

El índice de emulsificación es un método adecuado que posibilita evaluar la producción de surfactantes por ciertos microorganismos. La actividad emulsificante se correlaciona con la concentración de surfactante, aunque no siempre con su actividad superficial. Por ello, este método resulta útil para indicar la presencia de producción de surfactante en bacterias o productos de origen vegetal, con el cual se pudo determinar la actividad emulsificante del surfactante en estudio. La idoneidad de este método ha sido demostrada por medio de investigaciones donde fue posible determinar que *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus amyloliquefaciens* son productores de biosurfactantes y pueden aplicarse en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes [14].

Con respecto a la actividad emulsificante del surfactante natural

frente a los hidrocarburos empleados, debe señalarse que la concentración del surfactante se relaciona directamente con la formación de micelas en el medio, lo cual facilita la emergencia de los fenómenos de emulsificación y de unión a iones metálicos. Estudios realizados concuerdan con los resultados obtenidos, donde se analizó el comportamiento de una emulsión ante cambios en concentración para los emulgentes (Twen 80) y Lipófilo (Span 83). En ese orden de ideas, se encontró que, gracias al incremento en la concentración del emulgente, se reduce la estabilidad de la emulsión, pues la viscosidad de la película interfacial disminuye al aumentar la solubilidad de esta y hace que se rompan las gotas de aceite de manera fácil [15]. Además, la capacidad emulsionante de surfactantes de origen vegetal también ha sido demostrada en investigaciones sobre la lecitina de soja sobre hidrocarburos, encontrado, para concentraciones de 5 % en peso, valores de índice de emulsificación de 22 % [16].

En cuanto al segundo parámetro, tipo de crudo, se presenta también como un factor influyente en el índice de emulsificación del surfactante. “Esto se debe al efecto que provocan las fuerzas viscosas asociadas al crudo sobre las gotas de agua, actuando como inhibidor del proceso de drenaje-floculación” [17, p. 399]. Asimismo, la estabilidad de una emulsión se incrementa con la disminución de la polaridad y el aumento en la viscosidad de la fase oleosa. La viscosidad del aceite tiene gran efecto en el tamaño de las gotas de emulsión y en la estabilidad de estas, evidenciando un aumento en la viscosidad con el incremento en las cadenas de carbonos más largas, y una disminución con la presencia de cadenas más cortas [18].

Investigaciones del índice de emulsificación para biosurfactantes de naturaleza ramnolípida producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB25 sobre hidrocarburos, documentan valores de índices de emulsificación E24 de 53, 64, 62 y 84 % para petróleo crudo, petróleo diesel 2, gasolina y kerosene, respectivamente [19]. Similar a este estudio, los valores de índice de emulsificación para el surfactante de origen vegetal también mostraron una respuesta conforme cambió el tipo de hidrocarburo, conservando la misma concentración de surfactante. Ejemplo para una concentración de 5.0 (% p/v) un E24 de 79 y 100 % para hidrocarburo Castilla Blend (18.8 ° API) y South Blend (28.6 ° API) respectivamente. Esto último ofrece evidencia de la capacidad emulsificante de los surfactantes de origen natural sobre los hidrocarburos, y del efecto de la emulsificación sobre los tipos de hidrocarburos, presentando la reducción de la capacidad emulsificante, en tanto que disminuye la viscosidad de los hidrocarburos; algo similar a los resultados obtenidos en la presente investigación.

5.2 Eficiencia de dispersión

El resultado de los parámetros de calibración de estabilidad lineal del espectrofotómetro, absorbancias, RF y la media RF de los aceites, de la prueba de eficiencia de dispersión, para los crudos South Blend y Castilla Blend, se muestran en las Tablas 6 y 7, respectivamente. La concentración óptima de la mezcla surfactante para la prueba se tomó con base en los resultados del índice de emulsificación calculados anteriormente, esto es, (10 %, p/v) de surfactante para el crudo Castilla Blend y (5 %, p/v) para el crudo South Blend. Valores para los que se obtuvo mayores porcentajes de emulsiones de aceite/agua, los cuales se relacionan con las dosis de aplicación generalmente utilizadas en casos reales. Estudios informan valores del orden del 4 %, llegado a necesitar múltiples aplicaciones para lograr una efectividad suficiente [20].

Tabla 6. Calibración de estabilización lineal del espectrofotómetro con crudo South Blend.

CC – Concentración Crudo									
South Blend									
CC	Absorbancia			RF crudo (nm)			Media de RF crudo (%)		
(mg/ mL)	340 nm	370 nm	400 nm	340 nm	370 nm	400 nm	340 nm	370 nm	400 nm
4.00	1.853	1.109	0.720	2.159	3.607	5.556	11.46	0.278	0.910
2.00	1.070	0.562	0.359	1.869	3.559	5.571	3.511	1.056	0.642
1.00	0.535	0.278	0.178	1.869	3.597	5.618	3.511	0.000	0.196
0.50	0.270	0.138	0.088	1.852	3.623	5.682	4.388	0.723	1.338
0.10	0.038	0.018	0.010	2.632	5.556	10.00	35.88	54.46	78.35
0.05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Promedio RF crudo				0.447	0.756	1.136			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 7. Calibración de estabilización lineal del espectrofotómetro con crudo Castilla Blend.

CC – Concentración Crudo									
Castilla Blend									
CC	Absorbancia			RF crudo (nm)			Media de RF crudo (%)		
(mg/ mL)	340 nm	370 nm	400 nm	340 nm	370 nm	400 nm	340 nm	370 nm	400 nm
4.00	2.134	2.132	2.946	1.874	1.876	1.358	319.2	148.1	19.54
2.00	2.144	2.117	2.038	0.933	0.945	0.981	108.7	25.00	13.64
1.00	2.073	1.580	1.138	0.482	0.633	0.879	7.830	16.27	22.62
0.50	1.294	0.728	0.488	0.386	0.687	1.025	13.65	9.127	9.771
0.25	0.531	0.290	0.194	0.471	0.862	1.289	5.369	14.02	13.47
0.10	0.222	0.119	0.078	0.450	0.840	1.282	0.671	11.11	12.85
Promedio RF crudo				0.447	0.756	1.136			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Resultados de eficiencia de dispersión de a mezcla surfactante para los crudo Castilla Blend y South Blend.

Identificación	Petróleo de Referencia	EFFD
Surfactante natural, réplica 1	Crudo Castilla Blend	22.17 %
Surfactante natural, réplica 2	Crudo Castilla Blend	27.26 %
Surfactante natural, réplica 3	Crudo Castilla Blend	22.41 %
Surfactante natural, réplica 4	Crudo Castilla Blend	19.42 %
Promedio Surfactante natural	Promedio Curdo Castilla Blend	22.83 %
Surfactante natural, réplica 1	Crudo South Blend	48.87 %
Surfactante natural, réplica 2	Crudo South Blend	51.67 %
Surfactante natural, réplica 3	Crudo South Blend	51.16 %
Surfactante natural, réplica 4	Crudo South Blend	47.61 %
Promedio Surfactante natural	Promedio Crudo South Blend	49.82 %

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de eficiencia de dispersión para el surfactante se detallan en la Tabla 8. La prueba se realizó por cuadruplicado para cada hidrocarburo de prueba, encontrándose una efectividad de dispersante promedió 22.83 % para el Castilla Blend y 49.98 % para el crudo South Blend, y en términos generales, una efectividad dispersante promedio de 36.41 %.

En este punto, se comprobó que la mezcla surfactante dispersó los dos tipos de hidrocarburos. En estos resultados de eficiencia de dispersión hay evidencias estadísticas para aceptar el cumplimiento con los requisitos de homogeneidad de varianza y normalidad ($P < 0.05$) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados estadísticos T-tests. Grupo 1: Crudo Castilla Blend. Grupo 2: Crudo South Blend

Parámetro	Variable
Media Castilla Blend	2.281.500
Media South Blend	4.982.750
t-valor	-142.918
Grados de libertad	6
p	0.000007
Validez	4
Validez	4
Desviación estándar Castilla	3.259.044
Desviación estándar South	1.915.244

Fuente: Elaboración propia

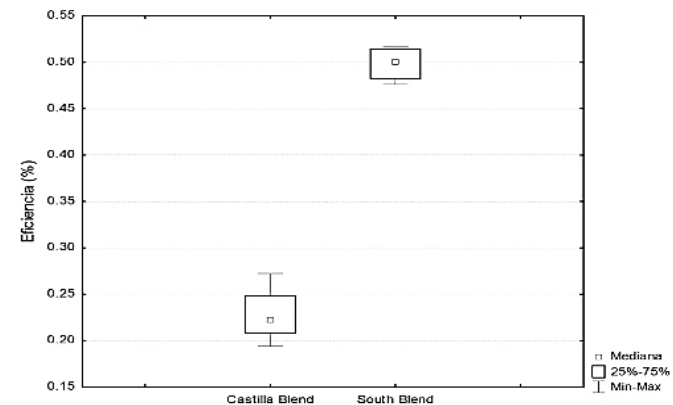


Figura 2. Eficiencia de dispersión del surfactante natural sobre los crudos Castilla Blend y South Blend.

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados exponen claramente la eficiencia de la mezcla surfactante natural sobre los crudos de prueba. La Fig. 2 muestra que para Castilla Blend se dispersó un 23 % del crudo total y para South Blend un 50 % del total, lo que revela una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) entre los dos crudos cuando se aplicó la prueba de T test para muestras independientes.

Los primeros resultados para la formulación surfactante natural, utilizando como solvente el d-limoneno, resultaron prometedores en términos de eficiencia de dispersión con un valor de 50 % en crudo South Blend, muy cercano en comparación con productos dispersantes comerciales como COREXIT® EC9500A, MARINE D-BLUE CLEAN™, SAFRON GOLD con valores de eficiencias reportados de 54, 55 y 53 % respectivamente en crudo sur de Luisiana, en condiciones de semejanza en crudo de prueba y método de prueba [21].

El análisis de los datos obtenidos en la presente investigación es posible explicarlo considerando la existencia de diferentes factores que pueden afectar los resultados como, por ejemplo, los tipos de petróleos y variaciones del método. Al respecto, Fingas et al. (1991) informaron que varios parámetros de la composición del petróleo pueden correlacionarse con la efectividad de los dispersantes, en pruebas realizadas con el dispersante corexit 9527. Ellos encontraron una fuerte correlación positiva entre la efectividad y la concentración de saturación del petróleo, así como unas correlaciones negativas entre la eficiencia y las concentraciones de los compuestos aromáticos como el asfalto, y una débil correlación positiva entre la viscosidad y la efectividad.

Se presume que estas observaciones fueron hechas a una salinidad constante similares a las condiciones del presente estudio. Adicional a ello, la eficiencia de dispersión para las formulaciones dispersantes depende fundamentalmente de las propiedades del petróleo (composición química y propiedades físicas) y de las condiciones ambientales. Como resultado, la efectividad disminuye conforme aumenta la viscosidad de los hidrocarburos [22].

Dicho lo anterior, es posible afirmar que la viscosidad inicial de cualquier petróleo brinda una indicación amplia del rendimiento probable de los dispersantes, con lo cual se espera obtener máximas eficiencias para los dispersantes siempre que se puedan aplicar antes de la meteorización del petróleo. Esto significa aplicarlos antes de que surjan cambios en las propiedades físicas y la composición de los hidrocarburos derramados, en tanto que dichas propiedades se transforman a medida en que se pierden sus componentes más volátiles por efecto de la evaporación y conforme el hidrocarburo incorpora gotas de agua formando una emulsión del tipo agua en hidrocarburo. También los movimientos de marea, ocasionadas por la acción de las olas, reducen el tamaño medio de las gotas de agua dentro del hidrocarburo. Esto hace que la viscosidad de la emulsión siga aumentando, pese a que el contenido de agua haya alcanzado un máximo, típicamente el 75 % del volumen [23].

El propósito general de estas pruebas consiste en comparar la efectividad relativa de los dispersantes. En dichos ensayos, se añaden los dispersantes al hidrocarburo en proporciones dispersante/hidrocarburo definidas y se aplica energía de mezcla mediante diferentes métodos, como flujo de aire, agitación, remolino, mezcla, etc. Los resultados de las pruebas están muy en función del nivel de la energía aplicada y de otros parámetros del ensayo. Estas pruebas son útiles para clasificar diferentes productos en términos de su efectividad, pero no predicen con exactitud qué ocurrirá cuando los dispersantes se apliquen en el mar [24].

5.3 Tasa de degradación de hidrocarburos totales del petróleo

La tasa de disminución de HTP se midió en seis intervalos de tiempo para el hidrocarburo Castilla Blend (18.8 ° API), a tres concentraciones distintas del surfactante (10 %, p/v) (15 %, p/v), (20 %, p/v) y un control (0 %, p/v). Estas se tomaron según los resultados obtenidos mediante el ID24, encontrándose una mayor actividad emulsificante para el crudo Castilla Blend a una concentración del (10%, p/v). A continuación, se muestran

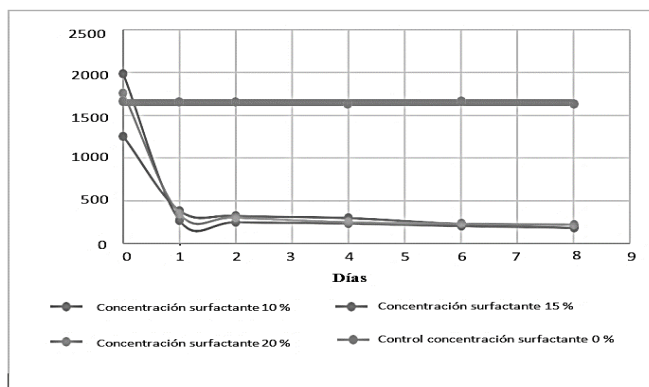


Figura 3. Disminución HTP vs. Tiempo
Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10.

Valores de k en diferentes intervalos de tiempo.

CS 1 - Concentración surfactante 0 % (29°), CS 2 - Concentración surfactante 10 % (29°), CS 3 - Concentración surfactante 15 % (29°), CS 4 - Concentración surfactante 20 % (29°).

Tratamiento	Vel de degradación (K) [mg * Dia-1]	Disminución de Concentración del contaminante (%)	HTP i (mg/L- Hc)	HTP f (mg/L- Hc)	Intervalo de tiempo (Días)
CS 1	0.0018	1.8	1664	1633	0-8
CS 2	2.01	86.6	1983.9	265.19	0-1
CS 2	0.05	31.7	265.19	180.92	1-8
CS 3	1.19	70	1251.06	379.76	0-1
CS 3	0.10	52	379.76	178.89	1-8
CS 4	2.45	80.5	1758	341.29	0-1
CS 4	0.06	36	341.29	217.59	1-8

Fuente: Elaboración propia

Tabla 11.

Vida media para las diferentes concentraciones de surfactante

Concentración Surfactante (% p/v)	Intervalo de tiempo (días)	Vida media (días)
0	0-8	368
10	0-1	0.34
10	1-8	13.86
15	0-1	0.58
15	1-8	6.93
20	0-1	0.28
20	1-8	11.55

Fuente: Elaboración propia

los resultados en la Fig. 3, en la cual se determinaron dos mecanismos de reacción marcados por el cambio de pendiente en la gráfica. Notándose en el primer intervalo de tiempo, una disminución promedio para los tres tratamientos del orden del 79 % de HTP. Luego de este intervalo de tiempo, la concentración de HTP disminuye en menor proporción hasta llegar alrededor del 88 % el día 8, y para el control no se evidenció disminución en los niveles de HTP.

Para determinar la tasa de remoción de los HTP, fue necesario calcular la pendiente de la Gráfica Ln [C/Co] vs tiempo en dos intervalos de tiempo para cada el tratamiento, dado que la cinética de remoción no es la misma en todo el proceso (ver Fig. 3) (Tabla 10).

Con estos valores fue posible determinar la vida media del contaminante mediante la Ec. 6. Por tanto, se alcanzaron dos valores de vida media para cada tratamiento, la mayor reducción de HTP en el primer intervalo de todos los tratamientos se obtuvo para una vida media de 0.28 días equivalentes a 8 horas, perteneciente a una concentración de surfactante del 20 %, indicando que la mitad del petróleo disminuye su concentración en 8 horas de 1758 ppm a 879 ppm. Para el segundo intervalo de tiempo de todos los tratamientos, la mayor reducción de HTP se obtuvo con una vida media de 7 días, para la concertación de prueba del surfactante del 15 %, en la cual disminuyó la mitad de la concentración de 379.76 ppm a 189.88 ppm en 7 días; y con respecto al control, se encontró un tiempo de 368 días, para consumir la mitad de los hidrocarburos presente en el agua. Los resultados de la vida media para cada concentración se detallan en la Tabla 11.

Los resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que los biosurfactantes son moléculas anfífilas que pueden estimular la disolución o la desorción, la solubilización o incluso la

emulsificación de contaminantes de hidrocarburos [25]. Hallazgos obtenidos por Wang et al. (2017) demostraron que las gotas de aceite con un tamaño grande pueden mantenerse estables en la región de la superficie. Sin embargo, las gotas de aceite de menor tamaño tienden a distribuirse en la columna de agua debido a procesos de emulsificación, lo cual explicaría la rápida caída en el primer día de tratamiento de los niveles promedio de HTP a un 79 % como consecuencia de la reducción de la concentración de hidrocarburos en la superficie del agua producto de la acción de dilución de la mezcla surfactante.

Por otro lado, estudios realizados para determinar los efectos de los solventes de origen vegetal, del aceite a base de pino y aceite esencial de naranja, en la biodegradación de hidrocarburos por microorganismos, muestran valores de biodegradación utilizando el aceite a base de pino y naranja del orden de 74 y 72 %, respectivamente [26]. De este modo, podría atribuirse que la dilución del hidrocarburo aumenta su biodisponibilidad para las bacterias nativas en el agua de mar, lo que se traduce en una alta reducción de HTP. Además, estudios reportan que los solventes a base vegetal como el D-Limoneno pueden actuar en forma de sustrato en el crecimiento de los organismos degradadores de hidrocarburos [10], lo cual conllevaría a un rápido incremento de la población microbiana degradadora de hidrocarburos, reflejándose en una a la tasa de reducción de HTP en los primeros intervalos de tiempo como los encontrados en esta prueba.

Luego del primer día de tratamiento, la tasa de reducción de HTP fue mucho menor hasta alcanzar un valor de 88 % el día 8. Este comportamiento puede atribuirse más a procesos degradativos influenciados por factores como, por ejemplo: solubilidad, puesto que los hidrocarburos de menor peso molecular son más solubles en agua que los hidrocarburos de alto peso molecular en cada clase de compuestos de petróleo [27]; y biodisponibilidad, dado que, de varias fracciones de los hidrocarburos, los microorganismos prefieren los C10-C25, por lo que son fácilmente biodegradables [28]. Allí, los alcanos de cadena más corta que tienen alta solubilidad en agua, resultan más tóxicos para los microorganismos degradadores del petróleo [29]. Igualmente, los alcanos de cadena larga C25-C40, al tener naturaleza hidrófoba, son difíciles de biodegradar debido a su escasa solubilidad en agua, lo que también afecta su biodisponibilidad [30]. En relación con lo anterior, el petróleo de prueba presenta una gravedad API de 19.1°, se sabe que esta clase de hidrocarburos contienen fracciones pesadas mayores de C18, por lo tanto, justificaría una menor solubilidad y biodisponibilidad del hidrocarburo como sustrato, reflejándose en una menor tasa de reducción de HTP, como la encontrada transcurrido el primer día de tratamiento.

6. Análisis de toxicidad

Se estudió la toxicidad de la mezcla surfactante, para lo cual se realizó una prueba de toxicidad CL50 de 96 horas sobre un tipo de microalga fitoplanctónica de la especie *Tretaselmis sp* [31], microorganismos que corresponden al primer eslabón de la cadena trófica marina estuarina. Las técnicas aplicadas en el bioensayo son las recomendadas por la EPA [32], el método estadístico aplicado a los resultados obtenidos fue el de Bliss [33]. Estos ensayos se llevaron a cabo por el Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (HRN) de la Universidad de Guayaquil, Ecuador informe de ensayo N° I/IRN041-18.

Los resultados indicaron que el surfactante obtuvo una concentración de 35.2 ppm, lo que sugiere que, ante la posibilidad de aplicarse en medio acuático, se deben adoptar las debidas precauciones para minimizar el riesgo ecotoxicológico, en proporciones menores a 35.2 mg/Litro de agua y para proteger los organismos de plancton y los demás componentes de la cadena trófica. Al ser una sustancia soluble en agua, debe considerarse la profundidad del área donde podría aplicarse, puesto que la deriva y la dispersión natural como la presente en mares contribuyen a disminuir las concentraciones iniciales en el medio acuático.

Al contrastar estos resultados con estudios, donde determinaron una escala de toxicidad de 1 a 10 ppm toxicidad moderada, de 11 a 30 ppm mediana toxicidad y de 31 a 60 ppm baja toxicidad en la evaluación de 60 bioensayos de toxicidad CL50 a 96 horas en los microorganismos *Tretaselmis sp*, se encontró que la mayoría se situó en la escala de toxicidad moderada [34]. Lo cual, en contraste con lo reportando en el presente estudio, y dadas las similitudes del bioensayo sobre los mismos organismos de prueba y tiempo de exposición, asocia al surfactante en estudio como de baja toxicidad según la escala en mención con una CL50 de 35,2 ppm, No obstante, cabe aclarar que la escala de toxicidad puede presentar variación de acuerdo con los criterios propios adoptados por cada investigador. Además, estudios han demostrado que los surfactantes naturales son biodegradables, biocompatibles y menos tóxicos; razón por la cual representan menos amenaza para el medioambiente [35].

7. Conclusiones

La prueba de índice de emulsificación permitió conocer un rango más preciso de la concentración de prueba del surfactante natural, por lo cual se pudo determinar una concentración de prueba, con respeto al grado API del hidrocarburo. Lo anterior posibilita hacer estimaciones de la actividad emulsificante para los dispersantes de hidrocarburos, ayudando en la eficiencia, optimizando costos y previniendo la implementación de concentraciones sobreestimadas de dispersantes en campo que pudieran llegar a causar impactos negativos en el medioambiente.

Así pues, la aplicación de la mezcla surfactante natural en petróleo crudo dio como resultado una mayor solubilidad de los petróleos en el agua de mar, y una vez que el aceite se dispersó y se diluyó lo suficiente, las gotas no se recuperaron favoreciendo a los procesos degradativos mostrando una reducción en los niveles de HTP en un 88 %. Este resultado es totalmente consistente con la hipótesis de que el papel del dispersante es facilitar la dispersión del aceite al reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua, de modo que se requiere menos energía para formar pequeñas gotas. Lo anterior, demostrando que las mezclas de surfactantes naturales de saponina utilizando como solvente D-limoneno pueden cumplir la función de un dispersante convencional.

La mayor eficiencia de dispersión del 50% del surfactante natural se presentó sobre el crudo de API intermedio, lo que indica que la capacidad de dispersión sobre los hidrocarburos se encuentra fuertemente relacionada con la composición química del petróleo. No obstante, la eficiencia de los dispersantes va a depender en gran medida del método de prueba y la composición química de las formulaciones, las cuales varían principalmente dependiendo del agente surfactante y solvente.

Bibliografía

- [1] Al-Majed, A., Adebayo, A. and Hossain, M., A sustainable approach to controlling oil spills. *J Environ. Manage*, 113, pp. 213-227, 2012. DOI: 10.1016/j.jenvman.2012.07.034
- [2] Gong, M., Zhao, X., Cai, Z., O'Reilly, S., Hao, X. and Zhao, D., A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Mar Pollut Bull*, 79(1-2), pp. 16-33, 2014. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.024
- [3] Nitschke, M. and Valadares, S., Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), pp. 252-259, 2007. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.01.002
- [4] Lebrero, R., Estrada, J., Muñoz, R. and Quijano, G., Toluene mass transfer characterization in a biotrickling filter. *Biochemical Engineering Journal*, 60, pp. 44-49, 2012. DOI: 10.1016/j.bej.2011.09.017
- [5] Piróllo, M., Mariano, A., Lovaglio, R., Costa, S., Walter, V., Hausmann, R. and Contiero, J., Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *J Appl. Microbiol*, 105(5), pp. 1484-1490, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03893.x
- [6] Janbandhu, A. and Fulekar, M., Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1-3), pp. 333-340, 2011. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.034
- [7] Rahman, P. and Gakpe, E., Production, characterisation and applications of biosurfactants-review. *Biotechnology*, 7(2), pp. 360-370, 2008. DOI: 10.3923/biotech.2008.360.370
- [8] Midori, A. y Coello, D., D-limoneno un monoterpene sustancial para la vida y su vinculación con el cannabis Midori. *Ciencia 2020*, pp. 117- 119, 2020. DOI: 10.13140/RG.2.2.33709.64482
- [9] Singh, B. and Sharma, R.A., Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, pp. 129-152, 2015. DOI: 10.1007/s13205-014-0220-2
- [10] Riojas, H., Gortáres, P., Mondaca, I. y Balderas, J., Sinergia en surfactantes para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Real Sociedad Española de Química*, [en línea]. 2011, pp. 243-249. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3754133.pdf>
- [11] Almeida, A., Costa, J., Carvalho, C.R. and Sousa, D., Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)- limonene epoxide and its anxiolytic-like action. *Braien Research*, 1148, pp. 56-62, 2012. DOI: 10.1016/j.braires.2012.01.070
- [12] Doran, P., Principios de ingeniería de los bioprocesos, Editorial Acribia, 1998.
- [13] Filipsson, F., Åseda, B. and Limonene, K., Concise International Chemical Assessment Document 5, World Health Organization, Geneva, [En línea], 1998. Available: <https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad05.pdf?ua=1>.
- [14] Becerra-Gutiérrez, L.K. y Horna-Acevedo, M.V., Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de canales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), pp. 23-31, 2016. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2016.01.03
- [15] Jiao, J. and Burgess, D.J., Rheology and stability of water-in oil in-water multiple emulsions containing Span 83 y Tween 80. *AAPS pharm Scientists.*, 5(1), pp. 1-12, 2003. DOI: 10.1208/ps050107
- [16] Jin, I., Wang, H., Jing, Y. and Liu, M., An efficient and environmental-friendly dispersant based on the synergy of amphiphilic surfactants for oil spill remediation. *Chemosphere*, 215, pp. 241-247, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.159
- [17] Martínez, E., Ramírez, F. y Acosta, L., Emulsificación de petróleo crudo para su transporte por oleoductos. *Ingeniería. Investigación y Tecnología*, [en línea]. 17(3), pp. 395-403, 2016. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-77432016000300395&script=sci_abstract&tlng=pt
- [18] Weiss, J. and Mushiolik, G., Factors affecting the droplet size of water-in-oil (w/o) and the oil globule size in water -in-oil-in-water emulsions (w/o/w). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 28(5), pp. 703-717, 2007. DOI: 10.1080/01932690701341819
- [19] Giraldo, D.J., Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), pp. 35-44, 2014. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2014000100005
- [20] Brandvik, P.J., Daling, P.S., Leirvik, F. and Krause, D.F., Interfacial tension between oil and seawater as a function of dispersant dosage. *Marine Pollution Bulletin*, 143, pp. 109-114, 2019. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.04.019
- [21] Product Schedule Manager NCP. U.S. Environmental Protection Agency. Julio 2020. [online]. Available at: <https://cutt.ly/rfAZYn6>.
- [22] Liu, Z. and Callies, U., Implications of using chemical dispersants to combat oil spills in the German Bight – Depiction by means of a Bayesian network. *Environmental Pollution*, 248, pp. 609-620, 2019. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.02.063
- [23] International Petroleum Industry Environmental Conservation Association. *Dipersantes y su papel en la respuesta a derrames de hidrocarburos*. Serie informe de IPIECA, Londres, 2001.
- [24] Aurand, D.V.A. Coelho, G. and Steen, A., Ten years of research by the U.S. oil industry to evaluate the ecological issues of dispersant use: an overview of the past decade. *International Oil Spill Conference Proceedings*, 2001, pp. 429-434. DOI: 10.7901/2169-3358-2001-1-429
- [25] Goswami, P. and Singh, H.D., Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol Bioeng*, 37(1), pp. 1-11, 1991. DOI: 10.1002/bit.260370103
- [26] Ojeda, M., Hernández, M., Domínguez, D., Pulido, A. y Hernández, G., Efecto del tipo de surfactantes en la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. 2008. [En línea]. Available: <https://n9.cl/uba9>.
- [27] Amodu, O., Ojumu, T. and Obed, S., Bioavailability of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons using renewable resources. In: *Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications*, Tech Open Sciences, 2013, pp. 171-194. DOI: 10.5772/54727
- [28] El-Tarabily, K., Total microbial activity and microbial composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. *J. Microbiol.*, 48(2), pp. 176-182, 2002. DOI: 10.1139/w01-140
- [29] Sihag, S., Pathak, H. and Jaroli, D., Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2(3), pp. 185-202, 2014.
- [30] Del'Arco, J. and De Franca, F., Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environmental Pollution*, 112(3), pp. 515-519, 2001. DOI: 10.1016/S0269-7491(00)00128-7
- [31] Guillard, R., *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*, culture of marine invertebrate animals. Plenum Press, New York, USA, 1975. DOI: 10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- [32] Environmental Protection Agency. *Mid-Atlantic risk assessment: risk-based concentration*. EPA (Environmental Protection Agency), United States. 2012. [online]. Available at: <https://cutt.ly/GfAZWac>.
- [33] Ittner-Bliss, C., *The method of probits*. Science, 1934, 38 P.
- [34] Villamar, F., Determinación de la toxicidad en dispersantes del petróleo mediante bioensayos para calular el LC50. *Acta Oceanográfica del Pacífico*, [en línea]. 12, pp. 147-154, 2004. Disponible en: <https://aquadocs.org/handle/1834/2319>
- [35] Molgaard, P., Chihaka, A., Lemmich, E., Furu, P., Windberg, C., Ingerslev, F. and Halling-Sorensen, B., Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3), pp. 248-255, 2000. DOI: 10.1006/rtp.2000.1390

D.E. Herazo-Navajas, es Ing. de Petróleos 2013, Sp. en Biotecnología 2017, y MSc. en Ciencias-Biotecnología (p) 2020, de la Universidad Nacional de Colombia. Medellín, de 2014 a 2015 trabajo para la empresa petrolera Emerald Energy, en 2017 trabajo en la creación del protocolo de aprobación de sustancias química y biológicas ante derrames de hidrocarburos para el ministerio de ambiente de Colombia, de 2018 a 2020, consultor en biorremediación para la empresa Petroambiental Ltda y tallerista en pedagogía regional sector hidrocarburos para la asociación colombiana de ingenieros de petróleos.
ORCID: 0000-0002-3449-4518

A. Romero-Hernandez, Ing. de Minas y Metalurgia de la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Dr. en Ingeniería Geológica del INPL, Francia. Se ha desempeñado como Director de Asistencia Técnica Minera del Ministerio de Minas y Energía, director de Minería de Ingeominas y del Centro de Investigación en Metalurgia Extractiva CIMEX. Profesor asociado de la Facultad de Minas de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Líder de ÍGNEA —Parque Tecnológico— y Director del Centro de Pensamiento Responsabilidad y Sostenibilidad de la Industria Minera de la Universidad Nacional de Colombia. (†: fallece el 20-abril-2021).
ORCID: 0000-0003-2674-7930