



INFORMES CIENTÍFICOS Y TÉCNICOS

**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
Y DE RECURSOS NATURALES**

**BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA
DEL ABSORBENTE OIL CONTROL**

Dr. Humberto Díaz Oviedo

Viña del Mar, 2016

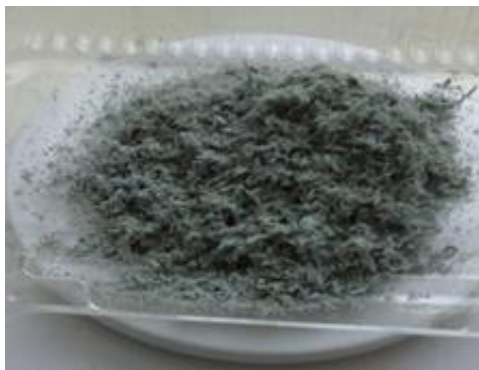
BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA DEL ABSORBENTE OIL CONTROL

TABLA DE CONTENIDO

I.	ANTECEDENTES.....	3
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	4
III.	RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA.....	8
IV.	CONCLUSIONES DE LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA.....	9
V.	RESPONSABILIDAD DE LOS ENSAYOS	9
VI.	BIBLIOGRAFÍA CITADA Y CONSULTADA	10

I. ANTECEDENTES

OIL CONTROL es un absorbente industrial para el derrame de hidrocarburos y ácidos. El producto es elaborado a partir de fibras orgánicas de colágeno (proteína de origen natural).



OIL CONTROL se presenta en estado sólido, color gris (**Fotografía 1**), textura fibrosa, inodoro, con una densidad de 0,15-0,20 g/cm³ y una humedad de entre 12 – 14%.

De acuerdo a su distribuidor, Comercializadora y Servicios de Ingeniería **Minerquim** Ltda., **OIL CONTROL** es un producto cuyos componentes resultan inofensivos para la salud. No es inflamable ni volátil, ni tampoco es clasificado como material peligroso para el transporte.

Fotografía 1. Oil Control vertido en recipiente.

Para su manipulación se recomienda el uso de ropa apropiada para prevenir el contacto prolongado con la piel. Se recomienda el uso de guantes; antiparras de seguridad protectoras si existe la posibilidad de exposición de los ojos y máscaras. El producto debe almacenarse, en lo posible, en lugares frescos, sin humedad y bajo techo. Se adjunta copia de la Hoja de Seguridad propuesta por el fabricante en **Anexo 1** y Hoja Técnica en **Anexo 2**.

Con el objeto de evaluar la toxicidad de este compuesto, se procedió a efectuar bioensayos de **toxicidad aguda** del producto **OIL CONTROL**.

El método de **Toxicidad Aguda** está basado en la determinación del cálculo de la Concentración Letal al 50% o LC₅₀ utilizando alguna especie tipo. La **única norma vigente en la actualidad en Chile** para evaluar la toxicidad aguda de productos químicos corresponde a la NCh 2083 Of. 1999 “Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera)”. No obstante lo anterior, dado que este producto se requiere aplicar en agua marina y corresponde a un **absorbente orgánico**, puede asimilarse a un dispersante y utilizarse para estos efectos como referencia el “Protocolo para la Determinación Gráfica de la Toxicidad Media Letal para Dispersantes Químicos para Combatir Derrames de Petróleo” propuesto por la IX Sesión de IMO (International Maritime Organization) y MEPC (Marine Environment Protection Committee) (Doc. MEPC IX/Inf.2) de la Organización Consultiva Marítima Intergubernamental, aprobado en la Resolución D.G.T.M. y M.M. ORDINARIO N°12600/184 VRS. Para tal efecto, el Laboratorio de Bioensayos y Biotecnología de la Universidad de Valparaíso ha estandarizado un Bioensayo de Toxicidad Aguda utilizando este Protocolo para la especie de “camarón de roca” *Rhynchocinetes typus*.

Cabe recordar que la **Concentración Letal al 50%** o LC₅₀ se define como la concentración del producto a la cual el 50% de los organismos utilizados en los ensayos

sobrevive en un tiempo determinado (24, 48 ó 96 horas). La concentración es ajustada preliminarmente por un primer ensayo. Estos ensayos preliminares sirven para ajustar el rango de concentraciones en donde se hallaría el valor de LC_{50} , mientras que las pruebas siguientes, finales, permiten establecer el punto final.

De acuerdo a la actual normativa vigente, el “**nivel de toxicidad**” se deriva del valor LC_{50} a las 96 h (LC_{50-96} h). No obstante lo anterior, también se efectuaron los bioensayos para determinar el valor LC_{50} a las 48 h (LC_{50-48} h).

Adicional a lo anterior, se efectuaron ensayos para determinar la **Efectividad** del producto, lo cual se detalla a continuación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Los ensayos fueron efectuados de acuerdo a lo establecido y recomendado por las normativas internacionales de APHA (1989), la normativa nacional NCh426/2 y el “Protocolo para la Determinación Gráfica de la Toxicidad Media Letal para Dispersantes Químicos para Combatir Derrames de Petróleo” (2005) aprobado por la Resolución D.G.T.M. y M.M. ORDINARIO N°12600/184 VRS. A continuación se detalla el procedimiento.

- **Almacenamiento de las Muestras**
Las muestras del **OIL CONTROL** fueron proporcionadas por el cliente. Éstas fueron guardadas en contenedores sellados a temperatura ambiente hasta su uso. Antes de comenzar el bioensayo las muestras fueron ambientadas a una temperatura de 20° C.
- **Equipamiento**
Las pruebas de toxicidad se efectuaron en acuarios de 10 litros. Cada una de los acuarios fueron bombeados con difusores, asegurando la buena oxigenación y distribución uniforme de este gas a través de toda el acuario antes de comenzar los ensayos.
Durante las pruebas y previo a ellas, la temperatura del agua se mantuvo a 20° C.
- **Reactivos**
Se utilizaron todos los reactivos necesarios de calidad p.a. (grado analítico). Como agua de prueba y agua de cultivo se utilizó agua de mar extraída desde el litoral aledaño a la Concesión Marítima de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso. El agua es pasada a través de un sistema de filtros (cartuchos) para eliminación de partículas y contaminantes.

- **Organismos de Prueba y Número de Organismos**

En 6 acuarios separados de 20 litros se introdujeron especímenes adultos del camarón de roca *Rhynchocinetes typus* (Crustacea, Decapada – Milne-Edwards, 1837), capturados en el sector litoral de la Concesión Marítima de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de



Fotografía 2. Detalle del camarón de roca *Rhynchocinetes typus*.

Valparaíso. En cada acuario fueron introducidos 10 ejemplares de 60 a 70 cm (**Fotografía 2**). Los animales fueron previamente aclimatados a condiciones de laboratorio.

Durante los bioensayos los organismos dejaron de alimentarse y se mantuvieron sin aireación y en oscuridad, a una temperatura de 20° C.

- **Volumen de Líquido y Concentraciones de Producto**

En los Ensayos Preliminares de toxicidad aguda del producto, no se agregaron otros materiales al agua. El producto fue adicionado en cada acuario a **concentraciones geométricas** crecientes desde 1,0 ppm (mg/L) a 10.000 ppm (mg/L), más el acuario Control (sin producto). Este último se preparó utilizando agua de dilución en igual volumen al de las soluciones de prueba, inoculando en éste igual número de organismos (10).

Esto de acuerdo a lo establecido y recomendado por APHA (1989) y USEPA (1993).

El agua en cada acuario fue aireada por 96 horas mediante una bomba de membrana y un difusor, el que permitió agitar el agua, airearla y producir una corriente suficiente para homogeneizar cualquier material inoxidable contenido en las partículas del absorbente.

Se vigiló el comportamiento de los individuos a las 48 y 96 horas, considerando las variables actitud de natación y movimientos de apéndices en las cámaras branquiales. Se mantuvieron las condiciones antes y durante el período de ensayo. Los animales no fueron alimentados durante los bioensayos.

Los Ensayos Definitivos se realizaron para determinar el porcentaje de organismos muertos para las diferentes concentraciones de la muestra y su correspondiente LC₅₀ a las 48 y 96 horas. Este corresponde a la estimación de la concentración del producto que inmoviliza al 50% de los organismos en 48 y 96 horas, expresada en porcentaje de muestra, mg/L o partes por millón (ppm).

En los ensayos definitivos se deben utilizar las concentraciones que en el ensayo preliminar presentaron entre 0% (o cercano a este porcentaje) y 100% de mortalidad (o cercano a este porcentaje). Dentro de este intervalo, se ensayan diferentes concentraciones de la muestra en prueba, definiendo las que se entregan en este Informe Técnico.

Dado que, como se verá, no se presentaron mortalidades en los ensayos preliminares, se volvieron a repetir los ensayos preliminares en estos ensayos definitivos, utilizando concentraciones de entre 1,0 a 10.000 ppm. Para cada

concentración se inocularon 10 ejemplares. Luego se incubaron por 48 y 96 h a 20° C y se contabilizaron los organismos sobrevivientes. Finalmente se registró la concentración de oxígeno disuelto en los acuarios de menor concentración de muestra.

Como en los ensayos preliminares, se vigiló el comportamiento de los individuos considerando las variables actitud de natación y movimientos de apéndices en las cámaras branquiales. Los animales no fueron alimentados durante los bioensayos.

- **Determinación del LC₅₀**

Para la determinación del LC₅₀, dado los resultados obtenidos, se utilizaría el diagrama de decisión de la **Figura 1**, utilizando el método del Probit. Para facilitar los cálculos, se utilizaría el *software* suministrado por la *US Environmental Protection Agency* (USEPA): *Probit Analysis Program*, versión 1.5. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores *m*-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos cuantales, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión. No obstante, dado que no hubo mortalidades, no fue necesario el uso de esta herramienta.

- **Evaluación de la Toxicidad**

El nivel de toxicidad del producto se deriva del valor de LC₅₀ 48 y 96 h en referencia a la siguiente tabla:

Concentración (LC ₅₀ – 48 y 96 h)	Nivel de Toxicidad
<1,0 ppm	Altamente Tóxico
1 – 10 ppm	Tóxico
10 – 100 ppm	Ligeramente Tóxico
100 – 1.000 ppm	Virtualmente No Tóxico
> 1.000 ppm	Inocuo

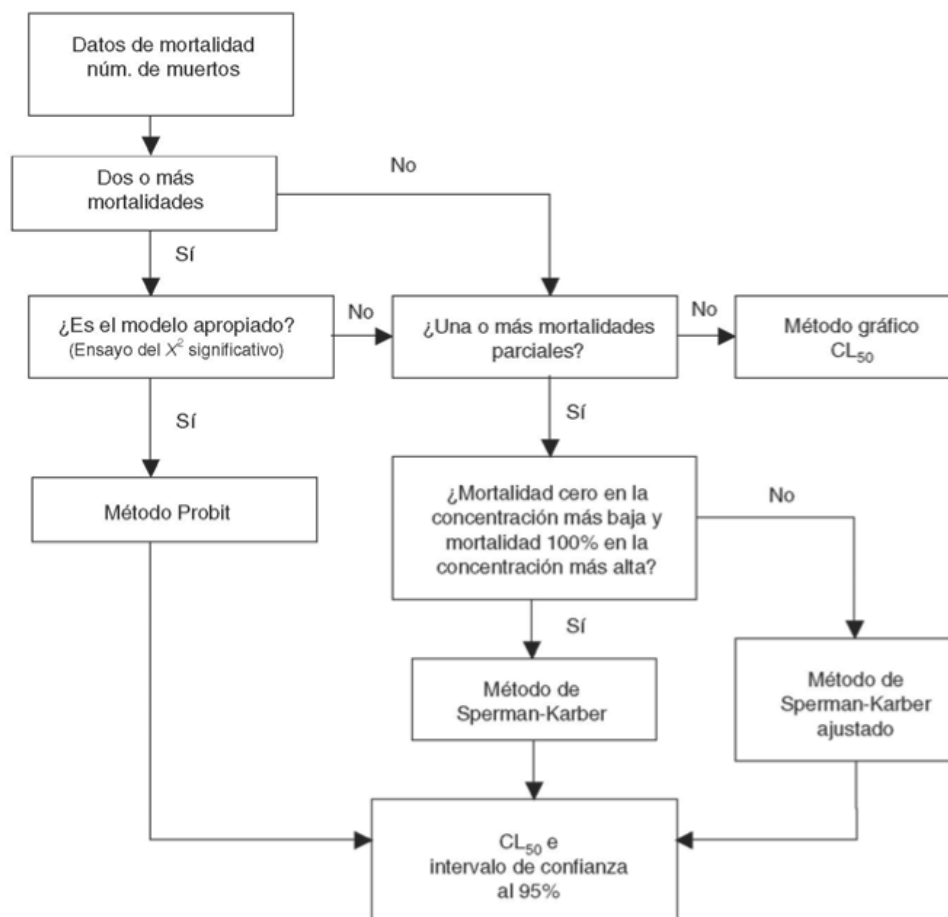


Figura 1. Árbol de decisión para determinar método a utilizar en el cálculo del LC₅₀.

II.2 TEST DE EFICIENCIA DEL OIL CONTROL

Para determinar la eficiencia de absorción de **OIL CONTROL**, se utilizó la norma ASTM F726-06 “Standard Test Method for Sorbent Performance of Adsorbents”, considerando el producto como Tipo II (*Oil sorbent sweeps are recommended for use over a large area for control, collection and pickup of oil*; “barredores absorbentes de aceite recomendados para su uso en una amplia zona para el control, colecta y recogida de aceite”).

Para esto se utilizó un petróleo crudo nacional, según muestras cedidas a la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso por la Refinería de Petróleo de la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP) – Concón, de viscosidad cinemática 2,80 cSt a 40° C, punto de inflamación 80° C y densidad de 0,8504 g/cm³. Se utilizó 30 mL del producto, adicionando absorbente hasta su saturación, esto es, cuando no quedaba hidrocarburo en los recipientes utilizados.

III. RESULTADOS DE LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA

III.1 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

No se detectaron mortalidades en ninguno de los acuarios y las concentraciones utilizadas de los especímenes en las 96 horas de efectuado los bioensayos.

Por lo anterior, el OIL CONTROL puede ser considerado INOCUO.

De estas experiencias se puede aseverar que el retiro oportuno del producto ensayado con el **OIL CONTROL** puede minimizar la toxicidad propia del petróleo en organismos marinos.

III.2 TEST DE EFICIENCIA DEL OIL CONTROL

Se realizaron experiencias de aplicación del **OIL CONTROL** y petróleo en razones crecientes hasta lograr la saturación del producto. Se buscó, por tanto, aquella relación que asegurara un excedente mínimo de petróleo en el agua con el fin de determinar la capacidad máxima de absorción expresada como **Razón de Absorción**, equivalente en peso en gramos del material dividido por el volumen de petróleo adsorbido (**Tabla 1**) (razón p/v).

De lo anterior se puede deducir que en condiciones de laboratorio se logra una capacidad de absorción promedio en razón 1:2,43 (p/v) con respecto al peso del material absorbente. Lo anterior indica que un kilogramo de CONTROL OIL es capaz de absorber en promedio 2,43 litros del hidrocarburo ensayado.

El **CONTROL OIL** aplicado según las instrucciones del proveedor y a la vista de los resultados de laboratorio, forma una placa flotante en el agua producto de la mezcla del material absorbente y del petróleo en el agua. Se sugiere una agitación leve para asegurar que el **OIL CONTROL** tome contacto íntimo con la mancha de petróleo.

Tabla 1
Evaluación de la efectividad del **OIL CONTROL**.

Réplica	CONTROL OIL (g) a	Petróleo Crudo Retenido (mL) b	RAZÓN DE ABSORCIÓN (a/b) (g/mL)
1	16,8	30	1:1,78
1	17,5	30	1:1,71
1	16,0	30	1:1,87
1	14,6	30	1:2,05
Promedio	16,7	30	1:1,85

El petróleo derramado y absorbido presenta una cohesión suficiente para facilitar su manejo y remoción manual o mecánica (**Fotografía 3**). Se sugiere una remoción mecánica que permita levantar la masa aglomerada del **OIL CONTROL**.



Fotografía 3. Control Oil más fuel 6.

Las placas formadas se adhieren entre sí sin dejar petróleo libre flotante por lo menos hasta la relación 1:1,85 (p/v) promedio.

IV. CONCLUSIONES DE LOS BIOENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA Y TEST DE EFICIENCIA

Los estudios antes detallados permiten indicar que:

- Los bioensayos de toxicidad aguda utilizando el camarón de roca *R. typus* para el **OIL CONTROL** permiten concluir que el producto es **INOCUO** de acuerdo a los resultados de los bioensayos efectuados a las 96 horas de incubación.
- El **OIL CONTROL** posee una capacidad de absorción promedio en razón **1:1,85** (p/v) con respecto al peso del material absorbente.

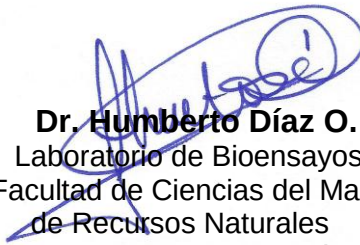
V. RESPONSABILIDAD DE LOS ENSAYOS

Los ensayos y pruebas de laboratorio fueron realizados en el Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales entre los días 14 y 17 de noviembre de 2016, bajo la dirección del profesor Dr. Humberto Díaz Oviedo (PhD. Cs. Ingeniería m. Biotecnología) y la ejecución del Sr. Luis Rodríguez Siclari, Ayudante de Laboratorio, quien además estuvo a cargo del acondicionamiento de los especímenes en la sala de acuarios de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Naturales para los ensayos de toxicidad.

Se entrega el presente informe a petición del interesado para ser presentado a quien corresponda.

VI. BIBLIOGRAFÍA CITADA Y CONSULTADA

- APHA (American Public Health Association).** 1989. Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. Washington. DC. Part 8000.
- NCh 2083 Of.1999.** Aguas - Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea. Cladocera). Norma Chilena Oficial NCh 2083. Of 1999. Instituto Nacional de Normalización. INN-Chile. (Decreto N° 152).
- NCh 426/2.** Agua grado reactivo para análisis – Especificaciones – Parte 2: Análisis físico, químico y microbiológico de agua potable, aguas crudas y aguas residuales. Instituto Nacional de Normalización. INN-Chile.
- OMI/MEPC.** 2005. Protocolo para la Determinación Gráfica de la Toxicidad Media Letal para Dispersantes Químicos para Combatir Derrames de Petróleo. IX Sesión de OMI/MEPC (Doc. MEPC IX/Inf.2) de la Organización Consultiva Marítima Intergubernamental. Aprobado en la Resolución D.G.T.M. y M.M. ORDINARIO N°12600/184 VRS.



Dr. Humberto Díaz O.
Laboratorio de Bioensayos
Facultad de Ciencias del Mar y
de Recursos Naturales
Universidad de Valparaíso

Viña del Mar, 28 de noviembre de 2016