



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO COMBINADO DE UN BIOPRODUCTO
DE ORIGEN MICROBIANO Y OTRO DE ORIGEN VEGETAL
SOBRE ACEITE CON POTENCIAL APLICACIÓN EN LA
RECUPERACION DE CRUDO**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

ROSARIO ADRIANA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Director de tesis: Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo

Junio 2013



Este trabajo fue realizado dentro de las actividades de la Línea de Investigación Recuperación Mejorada de Hidrocarburos Vía Microbiana, dentro del Programa de Becas para la Formación y desarrollo de Capital Humano, en las instalaciones del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la dirección de la Dra. Teresa Guadalupe Roldán Carrillo.

Cuando el todo es más que la suma de sus partes

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) por permitirme el uso de sus instalaciones, equipos y materiales para el desarrollo del presente trabajo.

Al grupo de trabajo del área de biotecnología del IMP, por su apoyo y asesoramiento en el transcurso de mi estancia: Dra. Patricia Olgún y Dra. Gladys Castorena.

A la Dra. Teresa Roldán, por su asesoría, confianza, enseñanza y motivación, lo cual también ha sido clave para que lograra esta meta.

Al personal del laboratorio de microbiología, por su apoyo en mis actividades: Dr. Diego Zaragoza, Teresa Martínez, Miguel Ángel Pacheco y Gustavo Navarrete.

A mis compañeros de trabajo del IMP, agradezco su apoyo, convivencia y amistad que me brindaron: Vicky, Ángeles, Leobardo, Rosita, Rosa M., Néstor, Miguel y Magali.

A mis amigos que he encontrado durante mi vida universitaria y profesional, los quiero y gracias por todos los momentos que hemos compartido, así como consejos de tipo personal y profesional: Guadalupe Carrillo, Karina Georgina, Susan Nichte, Erika Sauco, Claudia Pascualli, Rogelio Cruz, Ricardo Velázquez, Martín García, Lucero Vargas y Alberto Cabrales.

A Ricardo Posadas por coincidir y compartir esta etapa de nuestras vidas, gracias por todas tus palabras que me han motivado y enriquecido.

A mis padres, por la familia que tengo y que ustedes construyeron. Mamá gracias por todo lo que me has dado, te quiero mucho. Lo que he logrado y soy, te lo debo a ti. Gracias por confiar en mí, por todo tu cariño y porque aún sin importar lo que sucede día a día estás conmigo, apoyándome.

Un agradecimiento muy especial merecen mis hermanos Raquel, Alfredo y Noemi por todo su apoyo, comprensión y cariño. Ustedes también han sido una pieza importante en mi vida y me han ayudado a concretar todos mis logros, los quiero mucho.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Petróleo.....	5
1.2 Tecnologías de recuperación.....	5
1.2.1 Recuperación primaria y secundaria.....	6
1.2.2 Recuperación terciaria.....	7
1.3 Surfactantes.....	8
1.3.1 Estructura y forma micelar.....	9
1.3.2 Concentración micelar crítica (CMC)	10
1.3.3 Clasificación de surfactantes.....	11
1.3.4 Actividad de los surfactantes.....	12
1.3.5 Surfactantes en la industria petrolera.....	14
1.4 Bioproductos.....	17
1.4.1 Biosurfactantes.....	18
1.4.2 Biodisolventes.....	19
1.4.3 Terpenos.....	19
1.4.3.1 D-Limoneno.....	20
2. ANTECEDENTES.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares.....	28
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
7. METODOLOGÍA.....	31
7.1 Selección del bioproducto de origen microbiano (BS).....	31
7.2 Producción del biosurfactante.....	31
7.2.1 Reactivación del microorganismo productor de biosurfactante.....	31
7.2.2 Caracterización microscópica y macroscópica del microorganismo seleccionado.....	32
7.2.3 Conservación del microorganismo seleccionado.....	32
7.2.4 Producción de biosurfactante.....	32
7.2.5 Verificación de la actividad surfactante del bioproducto.....	34
7.3 Selección del bioproducto de origen vegetal (BV)	34
7.3.1 Evaluación del efecto tensoactivo del bioproducto BV.....	35
7.4 Preparación de mezclas con los bioproductos.....	36
7.5 Efecto de los bioproductos sobre un hidrocarburo.....	36

7.5.1 Prueba de desplazamiento de crudo en placa de vidrio.....	36
7.5.2 Recuperación de crudo en un medio poroso.....	37
7.5.3 Efecto de los bioproductos sobre la viscosidad de un crudo.....	38
7.6 Técnicas analíticas.....	40
7.6.1 Preparación de las muestras.....	40
7.6.2 Densidad óptica.....	40
7.6.2 Cuantificación de proteínas.....	41
7.6.3 Dispersión de aceite.....	41
7.6.4 Tensión superficial (TS)	42
7.6.5 Tensión interfacial.....	42
7.6.6 Concentración micelar crítica (CMC)	43
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
8.1 Selección y evaluación preliminar de la cepa productora del bioproducto de origen microbiano (BS)	44
8.2 Evaluación de la actividad tensoactiva del bioproducto de origen vegetal (BV)	48
8.3 Mezclas de bioproductos.....	53
8.3.1 Comportamiento de los bioproductos para integrarse como mezcla..	54
8.3.2 Efecto de los bioproductos BS y BV sobre dispersión de aceite (DA) y tensión superficial (TS) e interfacial (TI).....	55
8.4 Efecto de los bioproductos sobre crudo.....	59
8.4.1 Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre el desplazamiento de crudo en placa de vidrio.....	59
8.4.2 Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre la recuperación en crudo.....	62
8.4.3.Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre la viscosidad de dos crudo.....	66
9. CONCLUSIONES.....	71
10. RECOMENDACIONES.....	73
11. GLOSARIO.....	75
12. REFERENCIAS.....	77
13. ANEXOS.....	89

Índice de Figuras

Figura 1.1. Molécula anfifílica	8
Figura 1.2. Micela normal y micela inversa	9
Figura 1.3. Representación gráfica de la CMC y comportamiento del surfactante con respecto al aumento de la concentración.	11
Figura 1.4. Estructura química de terpenos, isopreno y limoneno	20
Figura 6.1. Diagrama experimental	30
Figura 7.1. Liofilizadora LABCONCO	33
Figura 7.2. Prueba de desplazamiento de crudo	37
Figura 7.3. Sistemas de recuperación de crudo en un medio poroso.....	38
Figura 7.4. Sistemas de crudo con bioproductos para determinación del efecto sobre la viscosidad	39
Figura 7.5. Reómetro Antón Paar	39
Figura 7.6. Tensiómetro DuNouy.....	42
Figura 8.1 Tinción de Gram de la cepa IMP-T observada en el microscopio óptico Nikon (100X).	45
Figura 8.2. Bioproducto BS de la cepa IMP-T liofilizado.....	47
Figura 8.3. Concentración micelar crítica del bioproducto BS	48
Figura 8.4. Determinación de la TS y CMC para el bioproducto BV	49
Figura 8.5. Dispersión de aceite del bioproducto de origen vegetal (BV).	49
Figura 8.6. Dispersión de aceite del bioproducto BV y otros solventes.....	51
Figura 8.7. Dispersión de aceite del bioproducto BV diluido en agua destilada.....	52
Figura 8.8. Comportamiento del bioproducto BS y del bioproducto BV como mezcla.	54
Figura 8.9. Efecto de los bioproducto BS y BV con respecto a la dispersión de aceite.	56
Figura 8.10. Efecto de los bioproductos BS y BV con respecto a la tensión superficial	57
Figura 8.11. Efecto de los bioproductos BS y BV y su mezcla sobre el desplazamiento de crudo previamente en contacto directo con el crudo	61
Figura 8.12. Recuperación de los bioproductos en un medio poroso a 70°C.....	63
Figura 8.13. Bioproductos observados en el microscopio en contraste de fases (100x)	65
Figura 8.14. Efecto de los bioproductos BS y BV sobre la viscosidad en crudo de 18° API	68
Figura 8.15. Efecto de los bioproductos BS y BV sobre la viscosidad en crudo de 15° API	69

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación de petróleo de acuerdo al American Petroleum Institute.	5
Tabla 1.2. Aplicaciones de los surfactantes en la industria petrolera.....	15
Tabla 2.1. Mezclas de surfactantes y otras sustancias, utilizadas en procesos EOR.....	24
Tabla 2.2. Aplicaciones de d-limoneno en mezclas con surfactantes	26
Tabla 7.1. Propiedades físicas y químicas del bioproducto BV	35
Tabla 8.1 Caracterización macroscópica de la cepa IMP-T	45
Tabla 8.2 Crecimiento microbiano de la cepa IMP-T y actividad tensoactiva del bioproducto BS	46
Tabla 8.3. Valores de TI para las mezclas de bioproductos BS y BV con mejores resultados en dispersión de aceite.....	58
Tabla 8.4. Evaluación del efecto de los bioproductos y su mezcla sobre el desplazamiento de crudo	60
Tabla 8.5. Evaluación de las mezclas de bioproductos BS y BV en contacto directo con crudo	62
Tabla 8.6. Evaluación de los bioproductos BS y BV en un sistema de recuperación de crudo	63
Tabla 8.7. Tamaños de las micelas de los bioproductos BS y BV observados en el microscopio en contraste de fases 100X	66
Tabla 8.8. Comparación de la TS, TI, CMC y disminución de la viscosidad con respecto al bioproducto BS	67
Tabla A.1 Medio mineral para la producción de biosurfactante	89

Abreviaturas

° API	Densidad en grados API
° C	Grados centígrados
% Rec	Porcentaje de recuperación
μ	Velocidad de crecimiento
μL	Microlitro
μm	Micrometro
API	American Petroleum Institute
BS	Bioproducto de origen microbiano (biosurfactante)
BV	Bioproducto de origen vegetal (biosolvente)
cm	Centímetros
CMC	Concentración micelar crítica
DA	Dispersión de aceite
EOR	Recuperación mejorada de hidrocarburos
g/L	Gramos por litro
h	Horas
L	Litro
mg/L	Miligramos por litro
mL	Mililitro
mN/m	Milínewton por metro
mPa * s	Milipascales por segundo
s	Segundo
TI	Tensión interfacial
TS	Tensión superficial

RESUMEN

Los bioproductos son una alternativa a los productos sintetizados químicamente, debido a que pueden ser igualmente eficientes en aplicación y con algunas ventajas como su biodegradabilidad, baja o nula toxicidad y por lo tanto más amigables con el medio ambiente. Estos productos pueden ser producidos como metabolitos primarios o secundarios de plantas o microorganismos utilizando recursos naturales o residuos agroindustriales. Dentro de este tipo de productos se encuentran los biosurfactantes y biosolventes, los cuales pueden tener potencial aplicación en la industria petrolera, en especial en los procesos de recuperación mejorada de hidrocarburos (EOR) por la actividad surfactante que pueden presentar, reduciendo la tensión interfacial en los yacimientos petroleros y modificando la viscosidad del aceite crudo.

El objetivo general de este proyecto fue evaluar el efecto combinado de un bioproducto de origen vegetal (biosolvente, BV) y otro de origen microbiano (biosurfactante, BS) sobre la recuperación y/o movilidad de crudo. El bioproducto BS fue producido con la cepa IMP-T. Mientras que el bioproducto BV corresponde a un monoterpeno abundante en la naturaleza y que puede ser obtenido a partir de residuos agroindustriales.

En la primera etapa de este proyecto se llevó a cabo la verificación de la pureza, crecimiento y producción del bioproducto BS con la cepa IMP-T. Para evaluar la producción de BS se utilizaron las pruebas de dispersión de aceite (DA), tensión superficial (TS) y concentración micelar (CMC). Mediante estas mismas pruebas se evaluó la actividad tensoactiva del bioproducto BV.

En la segunda etapa, con los bioproductos se prepararon mezclas a diferentes concentraciones, a las cuales se les evaluó su actividad tensoactiva mediante DA, TS y tensión interfacial (TI).

La tercera etapa consistió en evaluar el efecto de los bioproductos sobre crudo, para esto se realizaron pruebas de desplazamiento de crudo a las mezclas con mejor efecto tensoactivo, lo que permitió determinar las 2 mejores mezclas de los bioproductos y posteriormente fueron evaluadas en un sistema de recuperación de crudo a 30, 50 y 70°C.

Por último, a la mezcla con mejor resultado en recuperación de crudo se le determinó su efecto sobre la viscosidad de dos crudos (18 y 15° API).

El bioproducto BS mostró una disminución de la TS de 28 mN/m, DA de 7 cm, una CMC de 350 mg/L y un rendimiento de 18 g/L. Estos resultados corroboraron lo obtenido en trabajos previos.

El bioproducto BV evaluado directamente y adicionado en agua presentó actividad tensoactiva. Como producto puro tuvo una TS de 28 mN/m y provocó dispersiones de aceite de 9.4 a 14 cm con volúmenes de 2 a 25 µL. Adicionado en agua, el bioproducto BV incrementó la dispersión de aceite de 0.3 (correspondiente al agua) a 1.5 cm, y disminuyó la TS de 72 a 50 mN/m, con una CMC de 16,490 mg/L.

En la actividad tensoactiva de los bioproductos combinados se observó que la TS no fue un parámetro contundente para determinar su posible efecto sobre crudo. Mientras que

las pruebas de DA y TI permitieron observar la influencia que los bioproductos pueden tener sobre crudo. Algunas mezclas de bioproductos incrementaron los halos de dispersión hasta 3.97 cm más grande que los dos bioproductos solos. Con las mezclas que tuvieron un efecto positivo de DA, se evaluó la TI observando disminuciones de 2 a 21.5 unidades de TI con respecto al bioproducto BS, con una disminución mínima de TI de 4 mN/m.

Las pruebas de movilidad (desplazamiento de crudo en placa de vidrio) sirvieron para determinar más claramente que mezclas de bioproductos generaban un efecto positivo sobre el crudo. Las mejores mezclas de bioproductos, es decir, el bioproducto BV (2,102.5 mg/L) con dos concentraciones diferentes de BS (1,440 y 18,000 mg/L), tuvieron desplazamientos de crudo de 18° API, 5 veces más grande que el bioproducto BS solo. Mientras que el desplazamiento de crudo de 15° API, con las mismas mezclas tuvo un incremento del 30 -50 %.

En recuperación de crudo, la mejor relación de bioproductos fue con 18,000 mg/L BS y 2,102.5 mg/L BV, con la que se obtuvo la mayor recuperación (90%) a 70° C, observándose que el efecto de los bioproductos fue afectado por la temperatura, ya que a 30° C no se obtuvo recuperación y en 50° C fue menor que a 70° C.

La recuperación de 90 % en la mezcla puede ser atribuida a la acción de ambos productos, o bien, al efecto sumado de ellos, porque el bioproducto BS recuperó 80.3 % y el BV 10.2 %.

El efecto de la mejor relación de bioproductos sobre la viscosidad de un crudo de 15° API, tuvo el mismo valor que la del bioproducto BS, por lo que el efecto fue atribuido a este último bioproducto y no a la mezcla. En cambio, la misma mezcla aplicada sobre un crudo de 18° API, disminuyó un 52.7% la viscosidad del crudo original, comparado con un 37.5% que disminuyó el bioproducto BS y un 31.9% el bioproducto BV.

Con los resultados obtenidos en este proyecto se confirma que la combinación de los dos bioproductos seleccionados puede mejorar el efecto generado sobre crudo y es posible aumentar el porcentaje de recuperación del mismo, sin embargo es importante considerar que el efecto generado sobre crudo dependerá de las características propias del crudo y/o del yacimiento.

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una fuente importante de energía y de productos para las industrias y la vida diaria (Louvado *et al.*, 2010). Lo que implica una alta demanda de hidrocarburos originando la disminución y agotamiento de las reservas petroleras.

Aunque existen varias tecnologías de extracción de petróleo que pueden ser aplicadas para incrementar la recuperación de crudo, más del 60 % queda atrapado en el yacimiento y la mayor parte de éste corresponde a crudo pesado y/o extrapesado, difícil de extraer (Sun *et al.*, 2011). El empleo de tecnologías avanzadas conocidas como recuperación terciaria o recuperación mejorada de hidrocarburos (EOR, por sus siglas en inglés) hacen posible incrementar el factor de recuperación (Sen, 2008).

Dentro de las tecnologías EOR se encuentran los procesos térmicos, procesos de inyección de gases, procesos químicos y biológicos (Amarnath, 1999; Kristensen, 2009). Entre los procesos químicos que han recibido atención y estudio intensivo en las últimas décadas está el uso de químicos con surfactantes, utilizados en dilución o mezclas (Yadali, 2009), por ejemplo se ha utilizado inyección de microemulsiones miscibles, inyección de vapor con surfactantes-espumas e inyección de surfactantes-polímeros inmiscibles con o sin alcali (Salager, 2005).

En otras aplicaciones de los surfactantes en la industria petrolera, se ha observado que incorporados en mezclas con otros surfactantes o sustancias como sales minerales, polímeros, aceites o solventes, pueden mejorar la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, por efecto de la sinergia que se genera entre los componentes de dicha mezcla (Riojas *et al.*, 2011c). Por ejemplo, mezclas de surfactante con D-limoneno han mostrado mejorar la remoción de hidrocarburo y mejorar el rendimiento del lavado del suelo (Riojas *et al.*, 2011a), esto se debe a que el efecto del surfactante es mejorado porque el solvente ayuda a la disolución del contaminante hidrófobo en la fase acuosa.

En otros trabajos se han evaluado mezclas de surfactante con solventes como proceso de recuperación de hidrocarburos, donde han logrado obtener tensiones interfaciales menores a 0.1 mN/m y una recuperación terciaria de crudo del 15 % (Wan *et al.*, 2012),

los resultados obtenidos sugieren la factibilidad que este tipo de mezclas pueden lograr como proceso de EOR

Los surfactantes pueden ser sintetizados química o biológicamente, a estos últimos se les domina biosurfactantes, los cuales pueden ser tan eficaces como los químicos. En ciertas aplicaciones los biosurfactantes tienen ventajas con respecto a los químicos como alta especificidad y la mayoría de estos son productos biodegradables y no tóxicos (Singh *et al.*, 2007).

Los biosurfactantes pueden ser producidos de manera *ex situ* y posteriormente inyectados al yacimiento, o bien, de manera *in situ* por microorganismos autóctonos o inyectados, estimulados por la adición de nutrientes (Gudiña *et al.*, 2012). Los biosurfactantes son útiles para la recuperación de hidrocarburos debido a que tienen la capacidad de mejorar algunas propiedades de los aceites, disminuir la tensión superficial e interfacial y reducir la viscosidad, haciéndolos más fluidos (Batista *et al.*, 2006; Salehizadeh y Mahammadizad, 2009).

Por otro lado, la utilización de los solventes también puede ayudar a movilizar el crudo en los yacimientos, ya que provocan:

- Reducción de viscosidad por difusión
- Transformando el crudo en uno más ligero
- Reducción de la tensión interfacial
- Miscibilidad y mezcla de crudo y gas (Munroe *et al.*, 2007)

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se pretende evaluar el efecto combinado de dos bioproductos, uno de origen vegetal (biodisolvente) y otro de origen microbiano (biosurfactante) con la finalidad de determinar si entre estos dos componentes se puede producir sinergia en el efecto ocasionado sobre el crudo con repercusión en un incremento o mejora de la recuperación o fluidez de un crudo, además de obtener un producto amigable con el ambiente.

1.1 Petróleo

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y heterocompuestos con origen en la descomposición de la materia orgánica a través de largos periodos de tiempo. Entre sus componentes están los hidrocarburos alifáticos, aromáticos, asfaltenos y resinas (Bautista *et al.*, 2011). El petróleo también posee otros componentes como el azufre, nitrógeno, oxígeno y otros constituyentes metálicos en baja proporción (Acuña *et al.*, 2010). Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión, como es el caso de los asfaltenos.

La industria petrolera clasifica a los hidrocarburos líquidos de acuerdo con su densidad API (parámetro internacional del American Petroleum Institute) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de petróleo de acuerdo al American Petroleum Institute.

Tipo de crudo	Densidad	
	g/cm ³	API
Extrapesado	> 1.0	10.0
Pesado	1.0 - 0.92	10.0 - 22.3
Mediano	0.92 - 0.87	22.3 - 31.1
Ligero	0.87 - 0.83	31.1 - 39
Superligero	< 0.83	> 39

1.2 Tecnologías de recuperación

Existen tres tecnologías de recuperación de crudo: primaria, secundaria y terciaria, que son aplicadas de acuerdo a las características del crudo y del yacimiento, por lo que no siempre son consecutivas (CNH, 2011).

La recuperación de petróleo depende principalmente de las propiedades de las interfases de crudo-agua-roca, así como de las fuerzas capilares, ángulo de contacto, mojabilidad,

fuerzas viscosas y la tensión interfacial, que se encuentran relacionadas con un número adimensional llamado número capilar (N_{ca}) (Ec. 1.1). El número capilar es considerado un parámetro que mide la movilización del crudo y depende de las características del yacimiento y tipo de aceite (Bognolo, 1999; Kumar, 2012).

$$N_{ca} = \frac{\mu_w v_w}{\sigma_{ow}} \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde:

μ_w = viscosidad del agua

v_w = flujo volumétrico del fluido

σ_{ow} = tensión interfacial agua-aceite

Después de la inyección de agua como método de recuperación secundario, cuando la recuperación de crudo cesa, el número capilar típico es de 10^{-6} . Para poder recuperar cantidades significativas de crudo, el número capilar debe incrementarse 3 ó 4 órdenes de magnitud (Flores, 2009; Norman y Trombetta, 2007), lo más cercano posible a 10^{-2} (Salager 2005).

1.2.1 Recuperación primaria y secundaria

La recuperación primaria del petróleo aprovecha la energía natural, es decir, la presión del propio yacimiento para conducir el crudo a través de la red de poros en la roca, por lo que esta recuperación depende de las propiedades de la roca del yacimiento, de los fluidos y heterogeneidades geológicas (Romero, 2012). La recuperación secundaria tiene lugar cuando la presión del yacimiento tiende a caer y se vuelve insuficiente para forzar que el petróleo salga a la superficie. En esta etapa se inyectan líquidos externos (agua o gases inmiscibles) para mantener la presión y desplazar el crudo del yacimiento (Al-Sulaimani *et al.*, 2011).

Durante la recuperación primaria generalmente se produce de 5-20% de las reservas totales de crudo del pozo, mientras que con la recuperación secundaria se alcanza valores de 30 a 40% de crudo extraído recuperado (Salager, 2005; Sen, 2008).

1.2.2 Recuperación terciaria

La recuperación terciaria o EOR es una opción para poder extraer crudo remanente que queda en los poros de la roca del yacimiento, después de la aplicación de procesos de recuperación primaria y/o secundaria, o inclusive, de aquellos yacimientos que por sus características es difícil su extracción. Estos métodos consisten en la inyección de sustancias o procesos que modifican las propiedades de la roca y los hidrocarburos para aumentar la permeabilidad de la roca y facilitar la movilidad del crudo (CNH, 2011). La recuperación terciaria puede lograrse mediante procesos térmicos, inyección de gases, químicos y/o biológicos.

Los *procesos térmicos* consisten en suministrar calor al yacimiento, principalmente a través de vapor para reducir la viscosidad del crudo. Entre los procesos térmicos se encuentra la inyección de fluidos calientes (agua), vapor y combustión *in situ* (Qadir *et al.*, 2011).

En los *procesos de inyección de gases*, pueden utilizarse gases miscibles o inmiscibles, como el gas natural, gases enriquecidos con etano, propano o butano), CO₂, nitrógeno y gases de combustión (Colina, 2009).

Los *procesos químicos*, consisten principalmente en la inyección química de polímeros, tensoactivos, álcalis o combinaciones de éstos, como álcali-polímeros (AP), álcali-surfactante-polímero (ASP) y surfactante-polímero (SP). Los álcalis y surfactantes inyectados pueden reducir la tensión interfacial entre el agua y el crudo, mientras que los polímeros provocan que la solución acuosa sea más viscosa (Abdalla y Tan, 2012; Alvarado y Manrique, 2010).

Los *procesos biológicos*, también son conocidos como recuperación mejorada de hidrocarburos vía microbiana (MEOR por sus siglas en inglés, Microbial Enhanced Oil Recovery). En estos procesos se emplean microorganismos o sus bioproductos para la recuperación de crudo residual como son los biopolímeros, gases, ácidos, disolventes, biomasa y biosurfactantes (Bryant y Lockhart, 2002; Rashedi *et al.*, 2012). Estos últimos han llamado la atención, debido a sus ventajas con respecto a los surfactantes químicos, como baja toxicidad, biodegradabilidad y mejor compatibilidad con el medio

ambiente, Además, los biosurfactantes pueden ser competitivos económicamente, ya que pueden ser sintetizados a partir de fuentes renovables y tener actividad a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Khopade *et al.*,2012)

1.3 Surfactantes

Los surfactantes, también llamados tensioactivos, son moléculas anfifílicas (Fig. 1.1) con una proporción hidrofílica (polar) y otra hidrofóbica (no polar) que pueden ser sintetizados de manera química o biológica (Jiménez *et al*, 2010). La actividad de los tensioactivos puede ser indicada mediante parámetros como tensión superficial (TS) e interfacial (TI) y concentración micelar crítica (CMC, Sección 1.3.2) (Raiger y López, 2009; Salager, 2002).

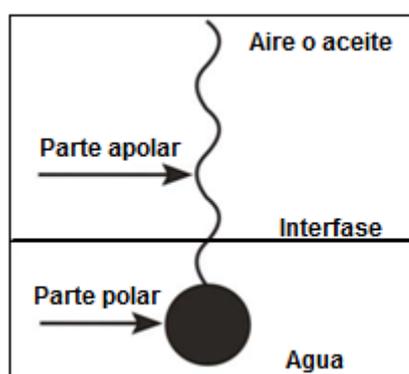


Figura 1.1. Molécula anfifílica.

Los surfactantes pueden orientarse en diferentes direcciones dependiendo de su concentración, composición química y de la naturaleza del medio en el que se encuentren. Los usos y cualidades de los surfactantes provienen de dos propiedades fundamentales: la capacidad de adsorberse a las interfases y su tendencia a asociarse (Ávila *et al.*, 2003). Estas propiedades hacen que los surfactantes sean capaces de reducir la tensión superficial e interfacial y formar microemulsiones donde los hidrocarburos pueden solubilizarse en agua o el agua en hidrocarburos, característica que los hace versátiles en aplicaciones industriales como detergentes, emulsificantes, espumas, dispersantes, entre otros (Desai y Banat, 1997).

1.3.1 Estructura y forma micelar

Los surfactantes tienden a asociarse y esto ocurre cuando se acumulan, iniciando por adsorberse en las interfases disponibles, luego su concentración aumenta hasta que se forman las primeras micelas (por arriba de la CMC) (Riojas *et al.*, 2011).

Una micela es un conglomerado dinámico de moléculas de surfactante (monómeros), en la cual se satisface su doble afinidad (polar y no polar) (Ávila *et al.*, 2003). Las micelas se forman y estabilizan por un equilibrio intermolecular (Rangel *et al.*, 2005), que puede ser explicado mediante el efecto hidrófobo y las fuerzas entre las regiones polares (interacciones hidrofóbicas).

El efecto hidrófobo es un fenómeno que compensa una entropía termodinámicamente desfavorable debida a los enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre las moléculas polares y no polares. Las moléculas del agua fuerzan a las moléculas del hidrófobo a agruparse y ocupar el mínimo espacio. Este fenómeno es conocido como el efecto hidrofóbico (Bhairi *et al.*, 2007).

Existen dos tipos de micelas (Fig. 1.2), la micela normal donde los grupos hidrofílicos (cabezas) de la molécula de surfactante están en contacto con la fase polar, mientras que las porciones hidrofóbicas (colas) se localizan en el centro de la micela, lejos del ambiente polar. Contrario a esto, en la micela inversa los grupos hidrofílicos de la molécula están contraídos hacia dentro de la micela en una fase no polar (Tyowua *et al.*, 2012).

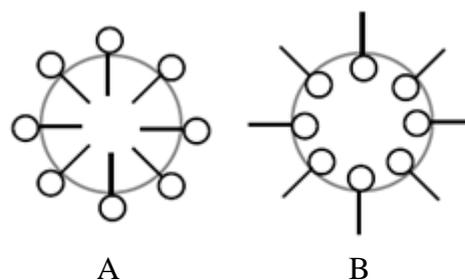


Figura 1.2. Micela normal (A) y micela inversa (B).

El número de monómeros que forman una micela (número de agregación) determina la geometría y tamaño de la misma. Además, cambios en la temperatura, pH, concentración de surfactante, aditivos en la fase líquida (como un alcohol) y grupos estructurales pueden causar cambios en el tamaño, forma, y número de agregación de las micelas (Ávila *et al.*, 2003; Douglas, 2006; Sagar *et al.*, 2007).

1.3.2 Concentración micelar crítica (CMC)

La concentración micelar crítica (CMC), es un parámetro característico de los surfactantes que se define como la concentración en la que se alcanza la mínima tensión superficial y por arriba de este valor el surfactante forma micelas espontáneamente (Fig. 1.2) (Jiménez *et al.*, 2010). Otras propiedades físicas con las que se puede determinar la CMC son: conductividad eléctrica, presión osmótica, tensión superficial e índice de refracción (Muhammad y Sakhawat, 2008; Schramm *et al.*, 2003).

La CMC se determina graficando la propiedad física (tensión superficial) contra concentración del surfactante (Fig. 1.2). El comportamiento del surfactante es primero posicionarse como monómeros en la interfase y conforme se aumenta su concentración la tensión superficial disminuye hasta mantenerse constante, al llegar a la mínima tensión el surfactante forma micelas espontáneamente y es en este punto donde se localiza la CMC.

Por arriba del valor de la CMC, las micelas pueden deformarse para producir conglomerados micelares en forma de geles, cristales líquidos y microemulsiones (Ávila *et al.*, 2003). El valor de la CMC depende de la naturaleza de la molécula del surfactante y es afectado por cambios de temperatura y presencia de electrolitos (Riojas *et al.*, 2011).

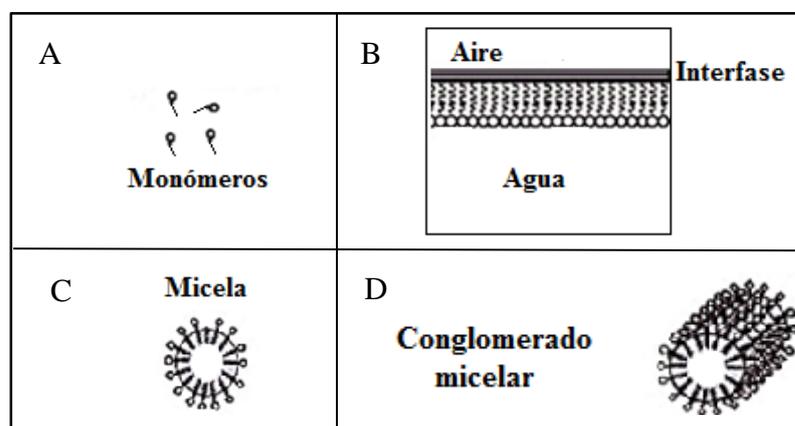
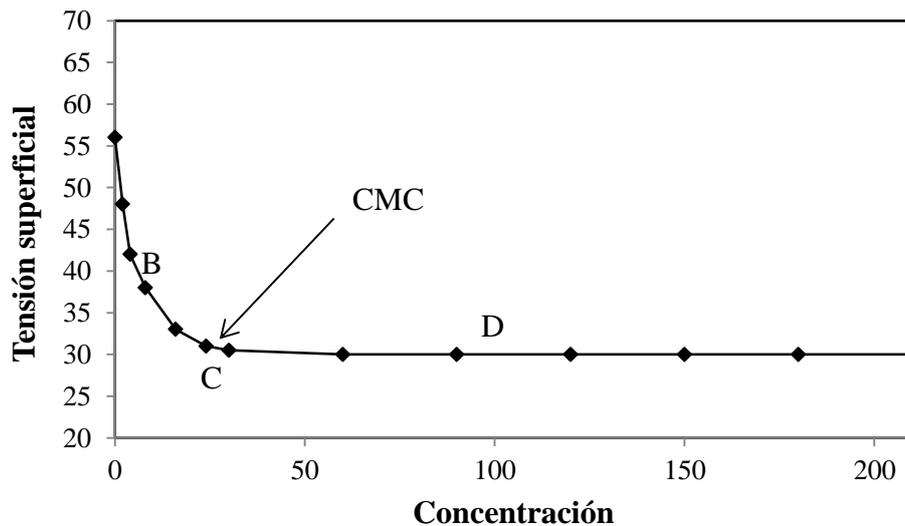


Figura 1.2. Representación gráfica de la CMC y comportamiento del surfactante con respecto al aumento de la concentración. A) Moléculas de surfactante (monómeros). B) Monómeros colocados en la interfase. C) CMC (los monómeros se asocian para formar micelas). D) Conglomerados micelares.

1.3.3 Clasificación de surfactantes

La clasificación de los surfactantes es de acuerdo a la manera en que se disocian en el agua, los cuales pueden ser iónicos, no iónicos y anfóteros (Cantarero, 2010).

- Surfactantes iónicos son aquellos con fuerte afinidad al agua, se clasifican en catiónicos y aniónicos. Los surfactantes catiónicos tienen el grupo hidrofílico cargado positivamente, en general, son compuestos cuaternarios de amonio. Los aniónicos están cargados negativamente el grupo hidrofílico, contiene grupos como sulfatos o sulfanatos de sodio (Mishra *et al.*, 2009).

- Surfactantes no iónicos, son aquellos que no generan iones y no se ionizan en solución acuosa, poseen grupos hidrófilos como alcohol, fenol, éter o amida. El grupo hidrófobo es generalmente un radical alquilo o alquil benceno y a veces tienen una estructura de origen natural como un ácido graso (Salager, 2002).
- Surfactantes anfóteros, estos pueden ionizarse en medio acuoso originando surfactantes aniónicos o catiónicos y se clasifican en anfóteros o n-alquil betaínas. Los primeros en medio básico son aniónicos y en medio ácido son catiónicos, por lo que son sensibles al cambio de pH, mientras que los segundos no poseen protones hidrolizables, adquieren la naturaleza catiónica en medios fuertemente ácidos y no son sensibles a la dureza del agua ni al valor de pH (Sustersick, 2004).

1.3.4 Actividad de los surfactantes

La actividad de los surfactantes está relacionada con su capacidad de adsorción y auto-asociación debida a su estructura química y al medio en el que se encuentren disueltos. Las actividades que pueden presentar los surfactantes y que definen su aplicación de acuerdo a los requerimientos del proceso en las industrias son:

- Actividad surfactante. La acción surfactante está relacionada directamente con el cambio de tensión en la interfase que un agente surfactante produce (Aguilera *et al.*, 2002). Los surfactantes son empleados en procesos de galvanizado como inhibidores de corrosión, al reducir la tensión superficial puede modificar el tamaño de cristales del metal depositado sobre la placa metálica e incluso mejora la apariencia de la misma, mientras más reduzca la tensión superficial mejores serán los resultados (Malik *et al.*, 2011).
- Actividad emulsificante. Los surfactantes intervienen de dos maneras en la formación de emulsiones; reducen la tensión superficial entre los líquidos inmiscibles; por otro lado, forman una película interfacial entre el líquido disperso (fase interna) y el medio continuo (fase externa), estabilizando la

mezcla, es decir, evitando la separación de los líquidos inmiscibles. La importancia de estos productos radica en el uso simultáneo de sustancias hidrosolubles y liposolubles con diferentes funciones en el proceso (Miñana y Goncalves, 2011). En la industria farmacéutica se aprovecha esta actividad para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos lipofílicos, como los ácidos grasos (Tan *et al.*, 2007).

- Actividad solubilizante. La acción solubilizante está condicionada por la CMC, es decir, por la formación de micelas. La importancia de esta estructura reside en que es posible solubilizar en su interior determinados compuestos que no serían solubles en el solvente en que se encuentran (Marfisi, 2005). Por ejemplo, el percloroetileno (contaminante órgano-clorado más reportado en aguas subterráneas) es removido al aumentar su solubilización en agua mediante el uso del surfactante Tween 80 (Moreno *et al.*, 2011)
- Actividad humidificante. Consiste en el desplazamiento de un fluido en contacto con una superficie, por otro fluido; este proceso implica la participación de al menos tres fases (Sunayana, 2010). En horticultura, los surfactantes al ser aplicados en plantas pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, sin alterar las características físicas del sustrato, con respecto al agua se puede mejorar la infiltración o filtración en suelo, evitar su evaporación y aumentar la eficiencia en su uso en la agricultura (Guillén y Urrestarazu, 2012).
- Actividad espumante. La formación de espuma está relacionada con la reducción de la tensión superficial y la formación de una película de surfactantes absorbidos en la superficie de las burbujas de gas disperso. Esta actividad es principalmente observada en productos de limpieza de uso personal y de lavanderías, la espuma permite remover la suciedad (Schramm *et al.*, 2003).
- Actividad dispersante. Es utilizada para la preparación de dispersiones con sólidos finamente divididos en un líquido. La inestabilidad de una suspensión puede manifestarse por la sedimentación, aglomeración del sólido, floculación y por recristalización. En las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmetóloga

esta actividad permite fijar uno o varios ingrediente activos en un medio que lo hace disponible para su uso o consumo (Bajaj *et al.*, 2011; Blevé *et al.*, 2011)

1.3.5 Surfactantes en la industria petrolera

La aplicación de surfactantes en la industria del petróleo ha sido diversa y tiene gran importancia práctica en varias áreas como recuperación mejorada de petróleo, en procesos de corrosión, limpieza de derrames de petróleos, fluidificación del bitumen, emulsiones asfálticas y deshidratación crudo (Tabla 1.2). Todos estos procesos implican fenómenos interfaciales e interacciones químicas de superficie (Alonso *et al.*, 2009; Kanicky *et al.*, 2001, Schramm *et al.*, 2003).

Tabla 1.2. Aplicaciones de los surfactantes en la industria petrolera.

Proceso	Efecto
Lodo de perforación	Empleado como dispersante y emulsionante para estabilizar el lodo de perforación que es una mezcla compleja formada a partir de agua, material rocoso, arcilla y sales de metales pesados.
EOR	Utilizados para movilizar el crudo remanente en yacimientos maduros o que por las características propias del crudo o yacimiento resulta difícil su extracción. Los surfactantes diluidos o en mezcla pueden movilizar el crudo mediante el cambio de propiedades como tensión superficial e interfacial o viscosidad.
Corrosión	Se pueden utilizar como inhibidores de corrosión para el cuidado de piezas metálicas, disminuyen principalmente la humectabilidad del agua, salmuera y movilidad de iones en la superficie, así como las posibles interacciones químicas de agentes oxidantes y propagación de puentes conductores entre el ánodo y el cátodo.
Limpieza de derrames petroleros	En zonas marinas, soluciones con surfactantes se utilizan de dos maneras, primero las soluciones son adicionadas con la finalidad de disminuir la tensión superficial para que el crudo se contraiga y sea más fácil su recolección. Este proceso no suele ser suficiente y aún permanece crudo, por lo que se añade otra solución de surfactante que actúa como dispersante para facilitar la degradación del crudo. En suelos contaminados por hidrocarburos, los surfactantes solos o en mezclas son eficaces en la eliminación de componentes oleosos cambiando el estado de humectación de la superficie y desorción de los contaminantes durante el lavado del mismo.
Fluidización de bitumen	El bitumen es un hidrocarburo que se produce naturalmente en una fase semi-sólida o sólida de alta viscosidad. Para reducir su viscosidad, los surfactantes forman emulsiones aceite en agua, lo que aumenta la fluidez del mismo.

Tabla 1.2. Aplicaciones de los surfactantes en la industria petrolera (continuación).

Proceso	Efecto
Emulsiones asfálticas	Los surfactantes se adicionan para formar emulsiones de aceite en agua (asfalto dispersado en una fase continua de salmuera). El empleo de estas soluciones facilita el proceso de pavimentación en carreteras al fijar más fácil el asfalto al suelo, mejorando con ello su resistencia.
Separación aceite/agua y deshidratación de crudo	Algunos procesos suelen ser afectados por la presencia de emulsiones, debido principalmente a la cantidad de agua. El uso de surfactantes como des-emulsificantes se considera una alternativa para favorecer la separación de cada una de las fases.

Referencia: Kanicky *et al.*, 2001; Schramm *et al.*, 2003.

1.4 Bioproductos

Los bioproductos son compuestos hechos con algún componente de materiales biológicos o renovables. El prefijo “bio” se refiere a los insumos derivados de fuentes biológicas como los provenientes de microorganismos, la agricultura y / o elaboración de alimentos (Thimmanagari *et al.*, 2010). Uno de los bioproductos disponibles son los aceites vegetales o animales, es decir, grasas, que pueden ser transformadas y/o empleadas como biocarburantes, biosolventes, biodetergentes, biolubricantes, bioplásticos o biomateriales con diversas aplicaciones (Marechal *et al.*, 2010).

Los bioproductos suelen ser clasificados de la siguiente manera:

- Bioenergéticos: combustibles líquidos, biomasa sólida para la combustión y combustible gaseoso.
- Biomateriales: bioplásticos, espumas biológicas, biocompuestos fabricados a partir de la agricultura como telas y biofibras.
- Bioquímicos:
 - Tipo industrial: ácidos grasos, aceites vegetales, resinas, lubricantes, solventes, pinturas, biosurfactantes y biopolímeros.
 - Tipo farmacéutico: enzimas, anticuerpos, vacunas y medicamentos.
 - Tipo cosmético, jabones, cremas y lociones.

Actualmente los bioproductos son una alternativa a los recursos fósiles o aquellos sintetizados químicamente debido a que pueden ser igualmente eficientes en aplicación y ser obtenidos a partir de residuos industriales de tipo biológico. Las emisiones contaminantes para el medio ambiente, tanto para el aire, agua y tierra, que se asocia con la fabricación de los bioproductos son reducidas. Además la toxicidad y los impactos en la salud humana y la seguridad son menores o nulos con el uso de este tipo de productos (Paster *et al.*, 2004).

En la industria petrolera, los bioproductos solos o en mezcla (por ejemplo: microorganismos y sus metabolitos, biopolímeros, biosolventes y biomasa) han sido utilizados en áreas como biorremediación y lavado de suelos, recuperación mejorada de hidrocarburos y limpieza de tanques de almacenamiento debido a tienen la capacidad de

degradar y /o modificar las propiedades del crudo (Rashedi *et al.*, 2012; Riojas *et al.*, 2010).

1.4.1 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas sintetizadas por microorganismos (Dehghan *et al.*, 2010), estas moléculas poseen una o varias partes lipofílicas e hidrofílicas, la parte lipofílica puede ser una proteína o un péptido con proporción hidrocarbonada de alto peso molecular principalmente un ácido graso (de 10 a 18 carbonos), mientras que la parte hidrofílica puede ser algún éster, hidróxido, fosfato o grupo carboxílico (Bognolo, 1999).

De acuerdo a su estructura química y origen microbiano, los biosurfactantes se pueden clasificar en 5 grupos: (1) fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos naturales, (2) glicolípidos, (3) péptidos, (4) biosurfactantes poliméricos y (5) biosurfactantes particulares (componentes de la pared celular) (Singh, 2012).

La producción de biosurfactantes se puede ver influenciada por el tipo y condiciones de medio de cultivo de los microorganismos que lo producen (Amezcuca *et al.*, 2007). La fuente de carbono induce o reprime la síntesis del biosurfactante, por ejemplo, una fuente de carbono inmiscible en agua como aceites vegetales y ácidos grasos han mostrado mejorar los rendimientos de glicolípidos (Maqsood y Jamal, 2011). El nitrógeno puede ser un elemento clave en la regulación de la síntesis de biosurfactante, de igual manera se puede deber a la limitación o presencia de cationes multivalentes como magnesio, calcio, potasio, sodio y elementos trazas. Condiciones de operación como temperatura, agitación y disponibilidad de oxígeno afectan el crecimiento y actividad microbiana, por lo tanto la producción de biosurfactantes (Batista *et al.*, 2006; Cameotra *et al.*, 1998).

Una de las principales características de los biosurfactantes que los hace aplicables en EOR es que tienen la capacidad de localizarse en sistemas inmiscibles líquido/líquido (agua-aceite), sólido/líquido (roca-agua o roca-aceite) y gas/líquido, con ello pueden actuar aumentando la permeabilidad de la roca del yacimiento, reducir la viscosidad, la

tensión superficial e interfacial del aceite, modificar la solubilidad de los componentes aumentando la movilidad del crudo, además suelen presentar actividad emulsificante (Batista *et al.*, 2011; Bognolo, 1999; Hong, 2011; Perfumo *et al.*, 2008).

1.4.2 Biodisolventes

En general los solventes son compuestos orgánicos volátiles utilizados de manera individual o en combinación con otros agentes sin sufrir cambio químico para disolver materias primas, productos, materiales o bien se utilicen como agentes de limpieza para disolver impurezas, como medios de dispersión, agentes tensoactivos, plastificantes y modificadores de la viscosidad (SEDEMA, 2008).

Los biosolventes, son materias primas de origen biológico, microbiano, vegetal o bien, obtenidos a partir de fuentes renovables. Dentro de éstos se encuentran los terpenos, que pueden ser una alternativa al uso de solventes clásicos (orgánicos o químicos) pues se consideran productos amigables con el ambiente debido a su biodegradabilidad y baja o nula toxicidad (Dejoye *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2011).

Los terpenos se han utilizado como agentes de limpieza para remover petróleo por su alta eficiencia. Estos actúan principalmente removiendo el petróleo por afinidad y estimulando la biodegradación del petróleo por microorganismos locales (Bravo y Ovando, 2008). Un ejemplo de estos compuestos es el D-limoneno, el cual además puede llegar a producir un efecto sinérgico cuando se mezcla con surfactantes para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Riojas *et al.*, 2011a).

1.4.3 Terpenos

Los terpenos son compuestos formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el isopreno (Fig. 1.4). Aunque la inmensa mayoría de los terpenos son compuestos específicos del reino vegetal (metabolitos secundarios), también pueden encontrarse en los animales (Bokanka, 2006).

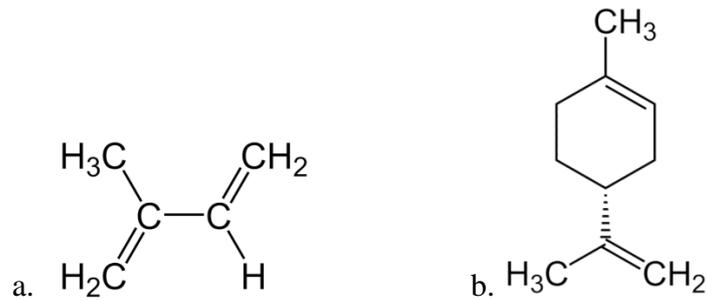


Figura 1.4. Estructura química de terpenos, isopreno (a) y limoneno (b).

Los terpenos se pueden clasificar con base en la cantidad de isoprenos presentes en la molécula, van desde los hemiterpenos que comprenden cinco carbonos (un isopreno), hasta aquellos de varios o miles unidades como los monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40) (Agostini *et al.*, 2012).

Algunas empresas se dedican a la transformación de los terpenos debido a que es un producto abundante y de poca utilidad. Los aceites esenciales están compuestos hasta un 90% de terpenos (mono y sesquiterpenos), el resto corresponde a una fracción oxigenada (la de mayor interés industrial) y una fracción no volátil (Montiel, 1985).

Los terpenos son considerados disolventes naturales con propiedades técnicas y químicas extraordinarias, que representan una alternativa óptima a los disolventes derivados del petróleo en diferentes aplicaciones industriales (Dejoye *et al.*, 2012). Las industrias farmacéutica y alimenticia han explotado los terpenos por sus potencialidades y efectividad en los medicamentos y como saborizantes. Además, son utilizados en la formulación de insecticidas, cosméticos, limpiadores, agentes antialérgicos y disolventes, inclusive terpenos como el cumeno, limoneno, carvona y pineno han tenido aplicación en estudios de biorremediación (Zwenger y Basu, 2008).

1.4.3.1 D-Limoneno

El d-limoneno (Fig. 1.4) es un monoterpene biodegradable de baja toxicidad presente en residuos agrícolas, procedentes principalmente de cáscaras de cítricos, separado de los aceites por un proceso de deterpenación. El limoneno puede ser considerado económico debido a que se encuentra distribuido en al menos 300 especies vegetales, pudiendo

lograr su obtención a partir de subproductos generados de la industria de jugos de cítricos (Castellanos *et al.*, 2007; Dejoye *et al.*, 2012).

El creciente interés del limoneno ha surgido por sus cualidades de limpiador, desengrasante y dispersante (Riojas *et al.*, 2011). Este producto es empleado como disolvente de resinas, pigmentos, tintas, pinturas y en la fabricación de adhesivos (Lladró, 2011).

2. ANTECEDENTES

El petróleo remanente en yacimientos después de la recuperación primaria y secundaria queda atrapado en los medios porosos debido a las fuerzas superficiales e interfaciales (fuerzas capilares), fuerzas de viscosidad y heterogeneidades del yacimiento, por lo que se puede considerar una eficiencia de recuperación baja de estos procesos (Abdalla y Tan, 2012). Una alternativa para incrementar el porcentaje de recuperación es mediante el uso de procesos de recuperación mejorada de petróleo, entre ellos, la inyección de surfactantes debido a la actividad de superficie que presentan, pues han demostrado ser eficaces al reducir la tensión interfacial y movilizar el petróleo remanente, aumentando la cantidad de producción de crudo. La inyección de surfactantes ha sido aplicada con éxito en el campo de Illinois donde fue posible recuperar un 60% del crudo residual y en Oklahoma se recuperó un tercio del crudo que aún permanecía en el yacimiento (Wan y Soo, 2012).

Algunas mezclas de surfactantes con otras sustancias como los solventes pueden generar sinergias (Riojas *et al.*, 2011) El uso de estas mezclas en un proceso de recuperación de crudo puede tener 3 finalidades: 1) obtener propiedades en la mezcla, que no poseen por si solos los componentes y aprovechar cada una de sus propiedades individuales, 2) mejorar alguna propiedad de los componentes, y 3) obtener una propiedad nueva, distinta a la de los componentes puros (Antón, 1993).

En procesos de recuperación mejorada (EOR, por sus siglas en inglés) se han evaluado y aplicado mezclas con surfactantes y solventes, álcalis, polímeros, ácidos o emulsiones con agua y aceite, obtenido buenos resultados en recuperación de crudo (Tabla 2.1).

En la industria química, se busca sustituir los productos sintetizados químicamente por bioproductos, que pueden ser igualmente eficientes y ser generados a partir de residuos agroindustriales y forestales (Monreal, 2008). La implementación de procesos biotecnológicos y/o bioproductos en la industria petrolera, permite disminuir la contaminación, remoción biológica de azufre y metales por enzimas o bacterias, así como la transformación de asfaltenos en crudos más ligeros (Batista *et al.*, 2011). Por lo

tanto, los surfactantes químicos pueden ser sustituidos por biosurfactantes en los procesos EOR.

En algunos trabajos proponen adicionar solventes aromáticos como los monoterpenos en formulaciones agua-aceite-surfactantes, debido a su afinidad por los asfaltenos (Salager *et al.*, 2009). El monoterpeno que puede ser empleado en estos procesos es el d-limoneno, debido a que es el monoterpeno más abundante en la naturaleza y que representa más de 90% de aceite de cáscara de naranja (Lemos y Pastore, 2007).

El d-limoneno es un solvente biodegradable, seguro y eficaz para disolver hidrocarburos pesados de petróleo (Carvel y Cartwright, 2005). Como solvente ha sido utilizado en mezclas con surfactantes con diferentes usos industriales (Tabla 2.2.), en disolución de hidrocarburos se ha empleado en biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y en limpieza de tanques de almacenamiento.

Tabla 2.1. Mezclas de surfactantes y otras sustancias, utilizadas en procesos EOR.

Tipo de mezcla	Componentes	Descripción	Resultado	Referencia
Surfactante polimérico- alcalí	Polímero de sulfonato de metil éster (sulfonato de metil éster de sodio con acrilamida)	El surfactante es elaborado a partir de aceite de Jatropha, que es una materia prima barata, natural y renovable. La mezcla actúa reduciendo la tensión interfacial y manteniendo la viscosidad.	TI<0.1mN/m 16% Rec.	Abdalla y Tan, 2012
Surfactante catiónico y aniónico	DDAB (bromuro de diodecildimetilamonio) y SLS (lignosulfato de sodio)	Los surfactantes solos llegan a recuperar entre el 16.8 y 36.8% de crudo. Generan sinergia al reducir la TI debido a que su acción mejora en las interfases líquido-líquido y líquido-sólido.	TI<0.1mN/m. 46.45% Rec.	Gogoi, 2010
Emulsiones	<u>Nanoemulsión</u> Surfactante (Tergitol 15-S-7, Tergitol 15-S-9 ó Tergitol 15-S-12), aceite mineral y NaCl.	Las soluciones tienen un tamaño de gota de la fase dispersa de 23 a 500 nm, lo que permite que penetren los componentes fácilmente en medios porosos y así mejorando su efecto sobre el crudo.	Reducción de permeabilidad desde 5 hasta 0.025. 25% Rec.	Mandal y Bera, 2012
	<u>Microemulsión</u> Dodecilsulfato de sodio (SDS), propanol, pentano y cloruro de sodio	En la preparación requieren un mínimo consumo de energía, las soluciones tienen un tamaño de gota de la fase dispersa menor de 100nm. Las soluciones actúan tanto en la fase acuosa como en la oleosa.	20% de recuperación hasta salinidades del 9%	Kumar <i>et al.</i> , 2012

%Rec.: porcentaje de recuperación de crudo; TI: tensión interfacial

Tabla 2.1 Mezclas con surfactantes en procesos EOR (continuación).

Tipo de mezcla	Componentes	Descripción	Resultado	Referencia
Surfactantes-solventes	<u>Surfactante(s)-alcano</u> Surfactante(s) (Aerosol TR, Aerosol OT, Arquad 2C, Arquad 2HT , C16AS ó C16TMAC) y alcano (decano, dodecano ó tetradecano)	De acuerdo al carácter hidrofóbo de los surfactantes solos o combinados, se alcanzan TI bajas o ultrabajas (<0.01 mN/m), con las que se puede recuperar o movilizar crudo de yacimientos.	En algunas mezclas se alcanzan valores de TI de magnitud de 10^{-3} mN/m	Rosen, 2005
	<u>Surfactante- alcohol</u> Polisorbato 20 con alcohol (propanol, butanol, hexanol u octanol)	Los alcoholes pueden generar una fase intermedia de microemulsión, y por tanto reducir la TI<0.01 mN/m. El surfactante (polisorbato 20) al ser de tipo no iónico tiene la ventaja de no ser afectado por la temperatura ni la salinidad.	TI<0.05 mN/m 15% Rec. con la mezcla de octanol.	Wan <i>et al.</i> , 2012
Álcali-surfactante-polímero (ASP)	Metaborato de sodio, sulfato de polioxietilen-polieoxipropileno-nonilfenol-éter y poliacrilamida hidroxilada.	La TI es reducida debido a un efecto sinérgico entre los componentes.	TI<0.01mN/m % Rec. 25.8 a 32.6 %.	Chen <i>et al.</i> , 2013
Alcali-surfactante (AS)	Metaborato de sodio y sulfato de polioxietilen-polieoxipropileno-nonilfenol-éter.		TI<0.01 mN/m 11.5-18.8%.Rec.	

TI: tensión interfacial,, %Rec.: porcentaje de recuperación de crudo

Tabla 2.2. Aplicaciones de d-limoneno en mezclas con surfactantes.

Industria	D-limoneno mezclado con		Descripción	Referencia
	Surfactante	Otras sustancias		
Alimentos	Tween 80	Agua	Facilita la solubilización de ingredientes en medio acuoso.	Leser <i>et al.</i> , 2009
	Tween 60	Etanol, agua y propilenglicol	La microemulsión se utiliza como vehículo de licopeno (suplemento alimenticio)	Spernath <i>et al.</i> , 2002
Biorremediación de suelos contaminados	Hostapur SAS (sal sódica de sulfonato de alcano secundario)	Agua, n-butanol y tolueno	Inyección de nutrientes y extracción de contaminantes mediante solubilización.	Haegel <i>et al.</i> , 2009
	Surfacpol 760 o Tween 80	Agua	Facilita desorción y remoción de hidrocarburos, además aumenta la biodisponibilidad y degradación de hidrocarburos por microorganismos.	Riojas <i>et al.</i> , 2010
Limpieza	Cola@Mulse SBC	Agua e isopropanol	Facilita el proceso de limpieza por la adición de d-limoneno como solvente.	Colonial Chemical, Inc., 2006
	Surfactantes aniónicos, noiónicos o mezclas de ambos	Agua y propilenglicol		Matta, 2005
Pesticidas	APSA-80 y Silwet L-77	Agua	Facilita que el d-limoneno actúe como pesticida.	Hollingsworth, 2005

3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de existir diversos métodos para la recuperación de crudo en yacimientos, el factor de recuperación continúa siendo bajo (cercano al 50%), por lo que se sigue investigando sobre la aplicación de nuevas o mejores tecnologías, como es el caso de las mezclas de surfactantes con otros componentes que permitan mejorar la recuperación de crudo.

En procesos de la industria petrolera como EOR y biorremediación, se han reportado mezclas de surfactantes con polímeros, alcoholes, solventes y aceites, entre otros. El interés de estas mezclas en EOR, radica en su capacidad de reducir la tensión interfacial a valores menores de 0.01 mN/m que permiten aumentar el número capilar por lo menos 3 ó 4 unidades y obtener así, una recuperación significativa de crudo.

Por otra parte el continuo avance en procesos biotecnológicos permite su empleo en casi cualquier área, por tratarse de procesos sustentables. Bioproductos generados a partir de estos procesos pueden ser producidos empleando subproductos o residuos de diferentes industrias, sin tener que comprometer los recursos de futuras generaciones. Los bioproductos son compuestos biodegradables de baja o nula toxicidad, considerados amigables con el ambiente al disminuir los daños por contaminación.

El empleo de bioproductos como los biosurfactantes ha sido de interés en la industria petrolera, ya que al igual que los surfactantes químicos pueden reducir la tensión superficial e interfacial y presentar actividad emulsificante y dispersante, además de ser estables a elevadas condiciones de temperatura, pH y salinidad. Por otro lado, los biosolventes también son de interés para la industria petrolera, ya que al ser miscibles en crudos pueden diluir, solubilizar, dispersar y disminuir su viscosidad.

De acuerdo a lo anterior se pretende que al combinar un biosurfactante, de origen microbiano con un biosolvente (bioproducto de origen vegetal) se pueda generar un efecto sinérgico sobre crudo al aumentar la eficiencia en su recuperación y/o mejorar su movilidad.

4. HIPÓTESIS

La combinación de dos bioproductos: uno de origen vegetal y otro de origen microbiano produce una mayor eficiencia en la recuperación y/o movilidad de crudo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto combinado de un bioproducto de origen vegetal y otro de origen microbiano en la recuperación y /o movilidad de crudo.

5.2 Objetivos particulares

- Seleccionar un microorganismo productor de biosurfactante (BS)
- Producir un biosurfactante a partir del microorganismo
- Seleccionar un bioproducto de origen vegetal (BV)
- Determinar el efecto tensoactivo del bioproducto vegetal
- Determinar la relación de los bioproductos de diferente origen en una mezcla con mayor efecto tensoactivo
- Evaluar el efecto de los bioproductos de manera individual y combinados sobre crudo.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 6.1 se muestra la estrategia experimental utilizada en este trabajo. La primera etapa de la experimentación fue realizada en dos partes de acuerdo a cada uno de los bioproductos seleccionados:

- 1) Selección, verificación de la pureza y actividad del microorganismo productor de BS, para posteriormente realizar la producción de BS.
- 2) Selección y determinación de la actividad tensoactiva del bioproducto vegetal (BV).

Con los bioproductos seleccionados se prepararon mezclas a diferentes concentraciones, a éstas se les evaluó su actividad tensoactiva mediante pruebas de dispersión de aceite, tensión superficial e interfacial.

Posteriormente se evaluó el efecto de las mezclas con mayor actividad tensoactiva sobre crudo mediante una prueba de movilidad (desplazamiento de crudo en placa de vidrio), lo que permitió determinar las 2 mejores mezclas de los bioproductos.

La mezcla de bioproductos fue evaluada en un sistema de recuperación de crudo (medio poroso impregnado de crudo) a diferentes temperaturas (30, 50 y 70 °C).

Por último, se determinó el efecto de la mezcla de bioproductos sobre la viscosidad de un crudo.

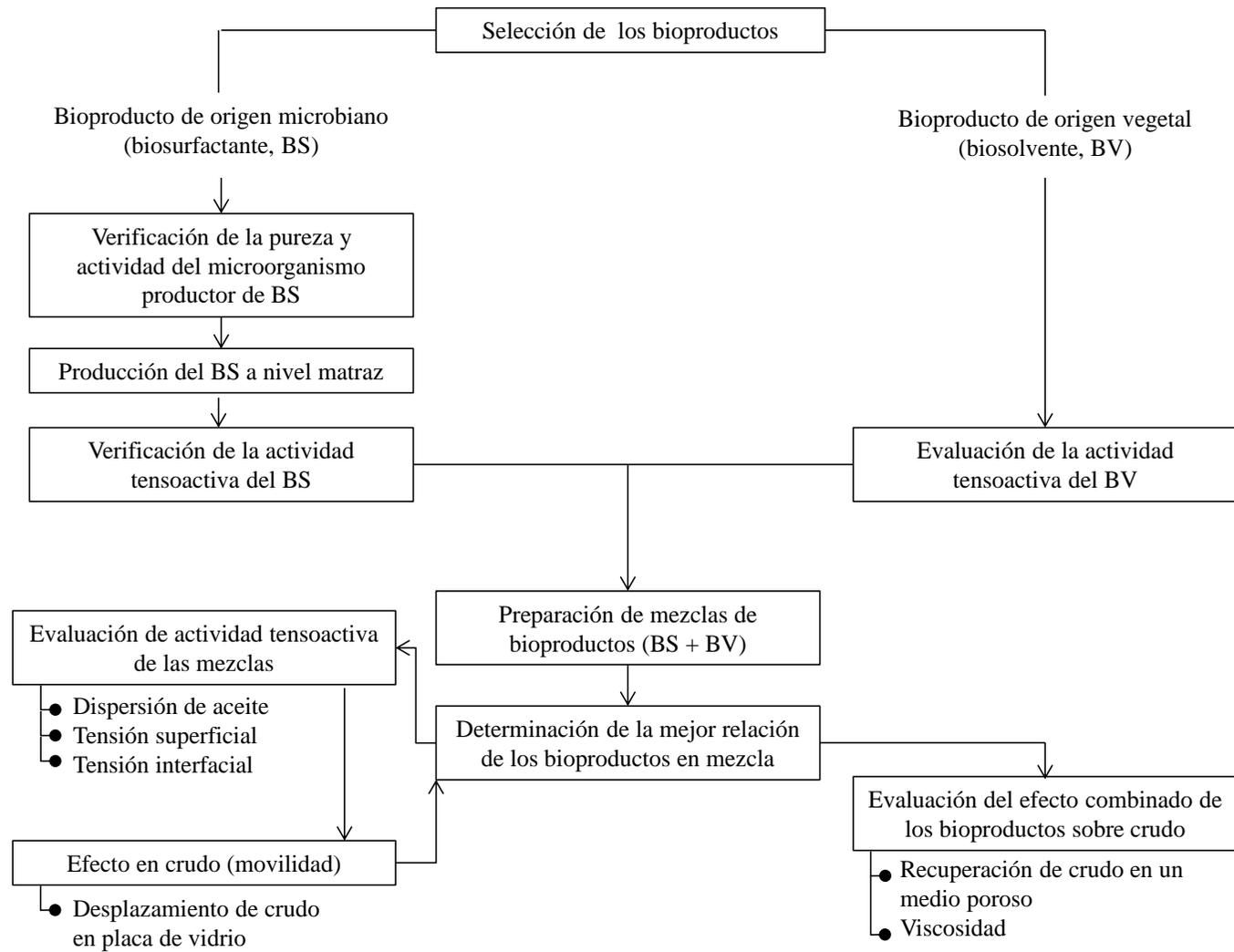


Figura 6.1. Diagrama experimental.

7. METODOLOGÍA

7.1 Selección del bioproducto de origen microbiano (BS)

El bioproducto de origen microbiano (BS) utilizado en este trabajo, se trata de un biosurfactante producido por la cepa IMP-T. Este microorganismo fue seleccionado de acuerdo a trabajos previos realizados sobre producción de biosurfactantes en el área de Biotecnología del IMP (Contreras, 2012; Daniel, 2011).

7.2 Producción del biosurfactante

Antes de llevar a cabo la producción del biosurfactante (BS), la cepa IMP-T aislada de un sitio contaminado con hidrocarburos fue reactivada, caracterizada macro y microscópicamente, evaluada en cuanto a su crecimiento y actividad tensoactiva y conservada.

7.2.1 Reactivación del microorganismo productor de biosurfactante

A partir del microorganismo conservado a -70°C con glicerol en viales criogénicos, se procedió a su reactivación en medio líquido con caldo nutritivo, para la adaptación del microorganismo. Lo anterior se realizó en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo en condiciones estériles, incubados con el microorganismo durante 24 h a 30°C y agitación de 115 rpm.

A este cultivo se le realizó su caracterización macro y microscópica (sección 7.2.2). Posteriormente se hizo una nueva resiembra en matraces de 250 mL con medio de cultivo específico para la producción de biosurfactante (Contreras, 2012), también fue incubado durante 24 h a las mismas condiciones que con caldo nutritivo. Posteriormente se realizó un pase más de la cepa en las mismas condiciones que el anterior.

Del último pase se tomaron 10 mL para verificar la actividad tensoactiva del biosurfactante mediante la prueba de dispersión de aceite y tensión superficial. Este último pase se resguardo en refrigeración como inóculo para la producción de biosurfactante.

7.2.2 Caracterización microscópica y macroscópica del microorganismo seleccionado

Esta caracterización se llevó a cabo para verificar la pureza del microorganismo productor de biosurfactante. La caracterización microscópica y macroscópica del microorganismo, se realizó mediante la siembra por estría en caja Petri con medio sólido conteniendo agar nutritivo, incubadas 24 h a 30° C. Las colonias formadas se observaron macroscópicamente con respecto a su forma, color, tamaño, elevación y consistencia. Para la caracterización microscópica se realizó una tinción de Gram de una de las colonias y se observó en el microscopio óptico Nikon E-800 con el objetivo 100X.

7.2.3 Conservación del microorganismo seleccionado

Para tener disponible y viable al microorganismo durante el desarrollo de este proyecto, se conservó con glicerol en congelación a -70° C a una concentración del 27 %. Lo anterior se realizó, colocando 1 mL del cultivo del microorganismo productor de biosurfactante en un vial criogénico adicionado con 0.5 mL de glicerol al 80%, posteriormente se agitó en vortex y se colocó en un congelador a -70° C.

7.2.4 Producción de biosurfactante

El biosurfactante (BS) fue producido con la cepa IMP-T en medio mineral con aceite de soya como sustrato (Anexo A.1). La producción de biosurfactante del microorganismo previamente seleccionado, se llevó a cabo inoculando matraces de 250 mL con 100 mL de

medio de cultivo en condiciones estériles con 1.4 mL del inóculo descrito en la sección 7.2.1. Los matraces fueron incubados a 30° C, 115 rpm durante 72 h. Durante la etapa de incubación de estos sistemas, se tomaron muestras de 10 mL del medio de cultivo para evaluar el crecimiento y producción de biosurfactante cada 24 h (sección 7.2.5).

Para facilitar el empleo del bioproducto BS durante el desarrollo del proyecto se requirió producir y conservar aproximadamente 40 g de este bioproducto. La conservación se realizó mediante la liofilización del sobrenadante libre de células (medio de cultivo separado como se indica en la sección 7.5.1) . Este proceso permitió purificar parcialmente el biosurfactante al retirar la cantidad de agua presente en el mismo.

El proceso de liofilización es un proceso a condiciones de vacío que se realiza para separar por sublimación el agua sin alterar la estructura molecular de la sustancia. 100 mL del sobrenadante producido fueron vertidos en cada uno de los recipientes para la liofilizadora, congelados a -70° C y conectados al equipo de liofilización LABCONCO (Fig. 7.1).

El bioproducto como polvo seco se guardó en un recipiente con tapa y limpio. Posteriormente se evaluó su concentración micelar crítica (CMC) para verificar que correspondiera al obtenido por Daniel (2012).



Figura 7.1. Liofilizadora LABCONCO.

7.2.5 Verificación de la actividad surfactante del bioproducto

Se verificó la producción de biosurfactante mediante la comparación de los valores obtenidos con los reportados previamente para el microorganismo seleccionado. Para ello se realizó una evaluación del crecimiento del microorganismo y la producción del BS en periodos de muestreos de 24 h durante 72 h. En cada periodo de muestreo se prepararon 4 matraces (un control y tres réplicas con inóculo), incubados conforme la sección 7.2.1.

Para evaluar el crecimiento y producción de biosurfactante, la muestra se preparó de acuerdo a la sección 7.6.1. El crecimiento del microorganismo se evaluó mediante las pruebas de densidad óptica y proteínas, mientras que para evaluar la producción de biosurfactante, al sobrenadante libre de células se le midió tensión superficial y dispersión de aceite.

7.3 Selección del bioproducto de origen vegetal (BV)

Después de realizar una revisión bibliográfica sobre bioproductos de origen vegetal, se seleccionó del bioproducto D-limoneno denominado en este trabajo como BV. Es un bioproducto abundante en la naturaleza, debido a que puede ser obtenido principalmente de aceites vegetales generados a partir de productos o residuos agroindustriales y forestales. Algunas de las propiedades físicas y químicas del bioproducto BV se presentan en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Propiedades físicas y químicas del bioproducto BV.

Propiedad	Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136.24 g/mol
Estado físico	Líquido
Color/olor	Incoloro/cítrico
Punto de ebullición	178° C
Densidad a 20° C	0.84 g/cm ³
Presión de vapor a 20°C	2.1 Pa
Solubilidad en agua a 20°C	Muy poco soluble en agua (Solubilidad máxima: 13.8 mg/L)

7.3.1 Evaluación del efecto tensoactivo del bioproducto BV

El bioproducto BV fue evaluado en cuanto a su actividad tensoactiva mediante pruebas de dispersión de aceite, tensión superficial e interfacial:

- Dispersión de aceite: la prueba se realizó de dos maneras
 - 1) De acuerdo a la técnica descrita en la sección 7.6.4 pero modificando el volumen de muestra a evaluar, en este caso utilizando el bioproducto BV directamente. Se utilizaron volúmenes desde 2-25 µL.
 - 2) Las dispersiones se realizaron con el bioproducto BV adicionado en agua a diferentes concentraciones.
- Tensión superficial: la prueba se realizó conforme la sección 7.6.5 con el bioproducto BV puro y adicionado en agua a diferentes concentraciones.
- Tensión interfacial (TI): se determinó el valor de TI entre el agua y el bioproducto BV, donde el agua es la fase pesada y el bioproducto BV la fase ligera. La técnica se describe en la sección 7.6.6.

7.4 Preparación de mezclas con los bioproductos

Para elaborar las mezclas entre los bioproductos BS y BV, se tomaron en cuenta sus características, ya que BS es soluble en agua y BV es poco soluble. Primero se realizó la disolución de BS en agua destilada a diferentes concentraciones, posteriormente se añadió una cantidad de bioproducto BV y se agitó en vortex durante 2 minutos. Cada una de estas mezclas fue evaluada en cuanto a actividad tensoactiva mediante dispersión de aceite y tensión superficial. Con los mejores resultados de estas pruebas, se midió además la tensión interfacial para determinar la relación óptima de los bioproductos.

7.5 Efecto de los bioproductos sobre un hidrocarburo

El efecto de los bioproductos BS y BV y sus mezclas sobre aceite se evaluó de tres maneras:

- 1) Desplazamiento de crudo en placa de vidrio
- 2) Recuperación de crudo en un medio poroso
- 3) Efecto de los bioproductos sobre la viscosidad de un crudo

7.5.1 Prueba de desplazamiento de crudo en placa de vidrio

Esta prueba se llevó a cabo en una placa de vidrio de 20 x 20 cm, donde se colocaron gotas (250 μ L) de hidrocarburo de 18° API como se muestra en la figura 7.2. Cada gota de aceite fue mezclada con 20 μ L del bioproducto o mezcla correspondiente. Después de mezclar, la placa se levantó a 90° durante 2 min, transcurrido ese tiempo fue medido el desplazamiento del crudo. Las pruebas se realizaron por triplicado, empleando controles como agua, crudo y las concentraciones individuales para cada uno de los bioproductos con respecto a la mezcla de ambos.



Figura 7.2. Prueba de desplazamiento de crudo

De las mezclas que dieron mejor resultado al desplazamiento de crudo, se les volvió a evaluar su efecto, pero ahora con un crudo más pesado (15° API), siendo colocado previamente este crudo en contacto directo con el bioproducto o mezcla en una relación 1:1. En un vial de vidrio de 5 mL, se colocó 1 g de crudo pesado y 1 g de mezcla o bioproducto. Los viales se agitaron en vortex durante 5 min y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 24 h. Después de este tiempo se tomaron 250 μ L del crudo, que se colocaron en la placa de vidrio, la cual se colocó a 90° y después de 10 min se midió el desplazamiento

7.5.2 Recuperación de crudo en un medio poroso

Para determinar la mejor relación de los bioproductos y su efecto sobre crudo, a las dos mezclas con mejores resultados en las pruebas anteriores, junto con sus respectivos controles, se le evaluó la recuperación de crudo en un medio poroso utilizando arena Ottawa. En esta prueba se utilizaron sistemas granulados con porosidad de 41.44% impregnados con crudo de 15° API (Fig, 7.3).



Figura 7.3. Sistemas de recuperación de crudo en un medio poroso.

Cada uno de los sistemas de recuperación (24) fueron preparados en viales de vidrio de 40 mL, que contenían 12 g de arena sílica Ottawa de malla 40-50 (297-420 μm), previamente lavada con agua y tolueno y secada a 70° C durante 3 días. La arena fue impregnada con 3 mL de crudo de 18° API bajo condiciones de vacío.

A cada sistema se añadió 10 mL de mezcla y posteriormente fueron incubados a 150 rpm a 30, 50 y 70° C. Después de 6 días de incubación se midió el volumen recuperado de crudo. Los sistemas con mezclas de bioproductos fueron preparados por duplicado, los controles que se utilizaron fue agua y los bioproductos preparados de manera individual a las concentraciones de la mezcla a evaluada.

7.5.3 Efecto de los bioproductos sobre la viscosidad de un crudo

La eficiencia de los procesos de recuperación ha sido atribuida entre otros parámetros a la reducción de la viscosidad del crudo (Soudmand *et al.*, 2007), es por esto que se evaluó el efecto de los bioproductos sobre la viscosidad de dos crudos con densidad de 18 y 15° API. La evaluación se realizó en frascos serológicos de 125 mL, donde se colocó crudo adicionado con bioproducto o mezcla en una relación 1:1 (40 g de cada uno) (Fig. 7.4), posteriormente fueron agitados por 5 min en vortex e incubados sin agitación a 70° C durante 48 h. Las mediciones se realizaron por duplicado, los controles empleados fueron

agua y las concentraciones de los bioproductos individuales con respecto a la mezcla de ambos.



Figura 7.4. Sistemas de crudo con bioproductos para determinación del efecto sobre la viscosidad.

Después de 48 h a los sistemas se les separó el agua y posteriormente se midió la viscosidad en el reómetro Antón Paar (Fig. 7.5), con el método de doble GAP para 5 mL de crudo de 18° API y de doble cilindros para 20 mL de crudo de 15° API. Las viscosidades fueron medidas a 70 y 30° C con velocidades de corte de 1 a 500 seg^{-1} .



Figura 7.5. Reómetro Antón Paar.

7.6 Técnicas analíticas

7.6.1 Preparación de las muestras

El biosurfactante producido por el microorganismo es excretado extracelularmente, por lo que para obtenerlo fue necesario separar el sobrenadante (líquido) de la biomasa (sólido). Esto se realizó mediante la centrifugación del cultivo a 10,000 rpm a 4° C durante 10 min.

Después de centrifugar se separó el sobrenadante de la biomasa por decantación. Esta última se lavó dos veces con solución salina estéril al 0.85% y por último se reconstituyó con solución salina al volumen inicial. Los análisis realizados para evaluar el crecimiento del microorganismo se llevaron a cabo a partir de la biomasa en solución salina, mediante densidad óptica y cuantificación de proteínas.

La evaluación de la producción de biosurfactante, se realizó determinando la actividad tensoactiva del sobrenadante libre de células con las técnicas de dispersión de aceite, tensión superficial e interfacial. La determinación de la concentración micelar crítica se llevó a cabo para el bioproducto BV y el bioproducto liofilizado BS (Fig. 7.5.6).

7.6.2 Densidad óptica

La determinación de la densidad óptica permite evaluar el crecimiento microbiano mediante la turbidez, por lo que para cuantificar su valor se midió la absorbancia de la biomasa suspendida en solución salina al 0.85% en el espectrofotómetro HACH UV/Vis a una longitud de onda de 620 nm.

7.6.2 Cuantificación de proteínas

La evaluación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Bradford (1976), que consiste en la unión del colorante azul de Coomassie G-250 a las proteínas. Para la determinación se tomaron 300 μL de la biomasa resuspendida en solución salina al 0.85% y con esta muestra se llevó a cabo una hidrólisis con NaOH (0.1 N) y calentamiento a ebullición por 1 hora. A 0.5 mL de la muestra hidrolizada se le adicionaron 0.5 mL del reactivo de Coomassie. Esta mezcla de reacción se leyó en un espectrofotómetro HACH de UV/Vis a una longitud de onda de 620 nm.

7.6.3 Dispersión de aceite

El método de dispersión de aceite permite evaluar fácil y rápidamente si un microorganismo es potencialmente productor de biosurfactante (Morikawa *et al.*, 2000) evaluando su efecto sobre una superficie agua-crudo (Cardoso *et al.*, 2010).

El método consistió en colocar 50 mL de agua destilada en una caja Petri, posteriormente se adicionaron 20 μL de crudo Maya en la superficie del agua. Una vez que el crudo cubrió toda la superficie se adicionaron 25 μL del sobrenadante libre de células o sustancia a evaluar con un ángulo de aplicación de 45° y después de 1 min se midió el diámetro del halo de dispersión formado.

7.6.4 Tensión superficial (TS)

La tensión superficial se determinó mediante el método del anillo utilizando un tensiómetro DuNouy, Modelo 70545. Este método consistió en colocar un anillo (de composición platino-iridio y geometría precisa) sobre la superficie del líquido, que al ser levantado se cuantifica la fuerza requerida para separar el anillo de la superficie del líquido (Antón, 2005). Esta fuerza es directamente proporcional a la tensión superficial de la sustancia. El control utilizado fue agua destilada, con un valor de TS reportado en la literatura de 72 mN/m a 25°C.

7.6.5 Tensión interfacial

La tensión interfacial consiste en determinar la fuerza necesaria para romper la interfase entre dos líquidos. Esta se determinó también empleando el tensiómetro DuNouy, Modelo 70545 (Fig. 7.6) y 14 mL de hexadecano como fase ligera. El control de la tensión interfacial que se utilizó fue agua destilada-hexadecano, cuyo valor corresponde a 48 mN/m.



Figura 7.6. Tensiómetro DuNouy

7.6.6 Concentración micelar crítica (CMC)

La concentración micelar crítica (CMC) se determinó a los dos bioproductos (BS y BV). El bioproducto liofilizado BS fue previamente secado a 50°C. La determinación se realizó preparando soluciones con diferentes concentraciones de cada uno de los bioproductos en agua destilada. A cada concentración se le determinó la tensión superficial. Con los valores de TS obtenidos se construyó la gráfica de concentración de bioproducto vs tensión superficial y sobre ésta se determinó el punto donde la tensión superficial llega a su mínimo valor y aunque se incremente la concentración del bioproducto ya no cambia. Este punto corresponde a la CMC del bioproducto.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Selección y evaluación preliminar de la cepa productora del bioproducto de origen microbiano (BS)

La cepa IMP-T fue seleccionada como microorganismo capaz de producir un bioproducto de origen microbiano (BS) con actividad tensoactiva, debido a que el biosurfactante que produce ha mostrado tener potencial aplicación en EOR (Martínez, 2011; García, 2012). Este microorganismo fue reactivado y cultivado para verificar que se encontrará en condiciones óptimas de pureza y actividad.

La cepa IMP-T es un microorganismo aislado de un sitio contaminado por hidrocarburos de Veracruz, México a una temperatura de 30° C. Este microorganismo fue reportado por Roldán *et al.* (2011) como productor de biosurfactante.

La caracterización macroscópica y microscópica de la cepa IMP-T se realizó para verificar su pureza. El análisis macroscópico como color, tamaño y forma que determinan la morfología colonial de la cepa IMP-T se muestra en la tabla 8.1. En la caracterización microscópica, la cepa IMP-T resultó Gram negativa, en forma de bacilos pequeños (cocobacilos) y se observó pura (Fig. 8.1). Las características observadas corresponden a las mismas reportadas en otros trabajos para este microorganismo (Daniel, 2012).

Tabla 8.1 Caracterización macroscópica de la cepa IMP-T

Morfología colonial	
Tamaño	4-5mm
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Color	Crema
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Viscosa
Luz reflejada	Brillante

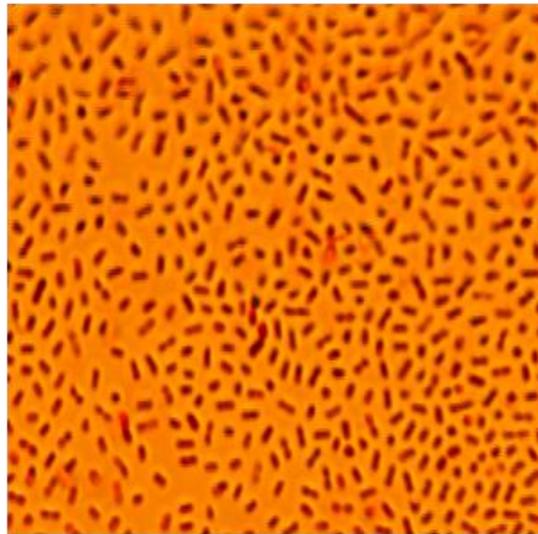


Figura 8.1 Tinción de Gram de la cepa IMP-T observada en el microscopio óptico Nikon (100X).

8.1.1 Verificación del crecimiento y producción de BS por la cepa IMP-T

La cepa IMP-T fue reactivada y crecida a las condiciones reportadas por Contreras (2012) utilizando un medio mineral y aceite de soya como sustrato (Anexo A.1) para la producción del bioproducto BS (biosurfactante).

Los resultados obtenidos (Tabla 8.2) fueron similares a los de Daniel (2012), quien reportó que el biosurfactante producido por esta misma cepa, producía halos de dispersión de 7 cm y una tensión superficial de 26.7 mN/m. La tensión superficial obtenida durante la verificación de la cepa IMP-T fue mayor por 1.3 unidades, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. También se determinó la tensión a que son parámetros importantes de un surfactante.

Tabla 8.2 Crecimiento microbiano de la cepa IMP-T y actividad tensoactiva del bioproducto BS.

Tiempo [h]	Crecimiento microbiano		Actividad tensoactiva	
	Densidad óptica [Abs]	Proteína [mg/L]	Tensión superficial [mN/m]	Dispersión de aceite [cm]
0	0.010	69.75	57.90	0.23
24	1.049	431.17	34.83	3.77
48	1.307	681.33	31.93	5.48
72	1.474	727.32	28.35	7.05

En cuanto a la tensión interfacial (TI), el bioproducto BS disminuyó la TI del hexadecano-agua de 48 a 9 mN/m, valor parecido a los reportado por Daniel (2012) de 9.5 mN/m para esta cepa. En otros trabajos con otros microorganismos también han obtenido valores similares de TI. Araujo *et al.* (2008) evaluaron la producción de biosurfactante utilizando

diferentes cepas, las de mejor respuesta fueron las cepas MI9 y MI10 logrando una tensión interfacial de 8.5 y 9.5 mN/m.

La TI desempeña un papel fundamental en la recuperación de crudo, ya que los surfactantes tienden a posicionarse en las interfases (crudo-agua) para satisfacer su doble polaridad, esto permite que puedan actuar reduciendo la TI y en consecuencia, se puede aumentar el número capilar, ocasionando con ello la liberación y movilización del crudo, debido a que las fuerzas capilares en el yacimiento son disminuidas (Al-Mjeni *et al.*, 2011; McInerney, 2004; Mosayeb y Abedini, 2012).

El rendimiento del biosurfactante se determinó con base en la cantidad del bioproducto crudo (sin purificar) obtenido después de la liofilización (Fig. 8.2), el cual fue de 18 g/L. Empleando el mismo tipo de cepa y sacarosa como fuente de carbono Ayanwu y Okolo (2010) obtuvieron 2.7 g/L de biosurfactante puro, el rendimiento del bioproducto BS crudo fue aproximadamente 6 veces más que éste.



Figura 8.2. Bioproducto BS de la cepa IMP-T liofilizado.

El bioproducto BS (liofilizado) presentó una CMC de 350 mg/L con una TS de 28 mN/m (Fig. 8.3), valores muy similares a los obtenidos por Daniel (2012) con una CMC de 300 mg/L y TS de 26.7 mN/m. Lo anterior indica que el bioproducto BS liofilizado conserva las mismas propiedades y características demostradas en trabajos previos (Contreras, 2012; Daniel, 2012; García, 2012). Estos valores comparados con las CMC's de 250 y 380 mg/L

reportadas por Gudiña *et al.* (2010) y Chandran *et al.* (2010), muestran que se trata de un biosurfactante con buenas propiedades, razón por lo que este bioproducto fue seleccionado para mezclarlo con el bioproducto de origen vegetal (BV).

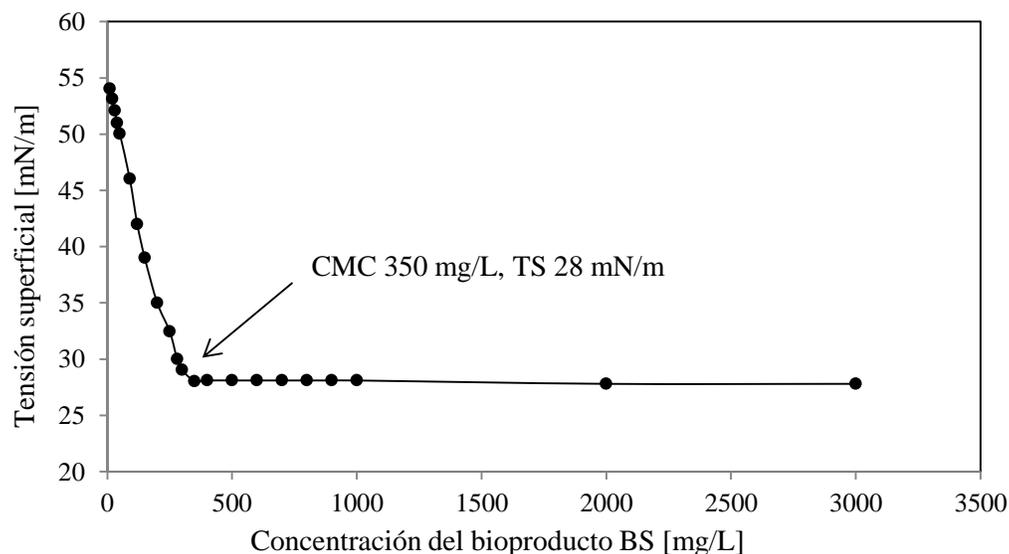


Figura 8.3. Concentración micelar crítica del bioproducto BS.

8.2 Evaluación de la actividad tensoactiva del bioproducto de origen vegetal (BV)

La evaluación del efecto tensoactivo del bioproducto BV se llevó a cabo mediante la medición de la tensión superficial y dispersión de aceite, utilizando el bioproducto directamente y agregado en agua destilada en diferentes cantidades.

La tensión superficial medida directamente al bioproducto BV fue de 28 mN/m, que es parecida a otros solventes como el hexadecano y eicosano de 28.12 y 27.62 mN/m, respectivamente (Rolo *et al.*, 2002).

La tensión superficial del agua fue reducida con el bioproducto BV de 72 a 50 mN/m a una concentración de 16,490 mg/L, que fue el punto en donde alcanzó la CMC (Fig.8.4).

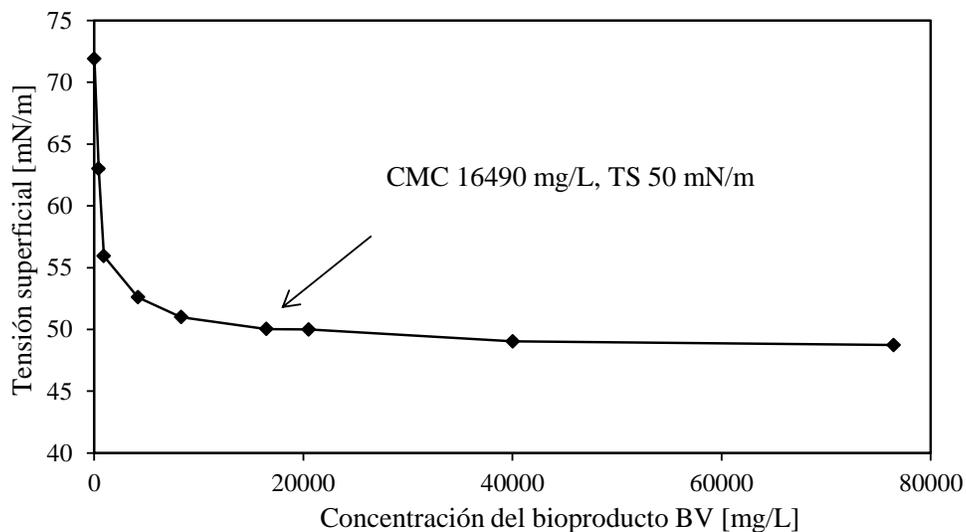


Figura 8.4. Determinación de la TS y CMC para el bioproducto BV.

La evaluación del bioproducto BV puro sobre la dispersión de aceite se realizó con volúmenes de 2 a 25 μL , los halos de dispersión obtenidos fueron de 9.6 hasta 14 cm (Fig.8.5), lo que permitió observar que al emplear una cantidad baja desde 3 μL fue posible obtener una buena dispersión de aceite sin necesidad de utilizar una mayor cantidad de este bioproducto.

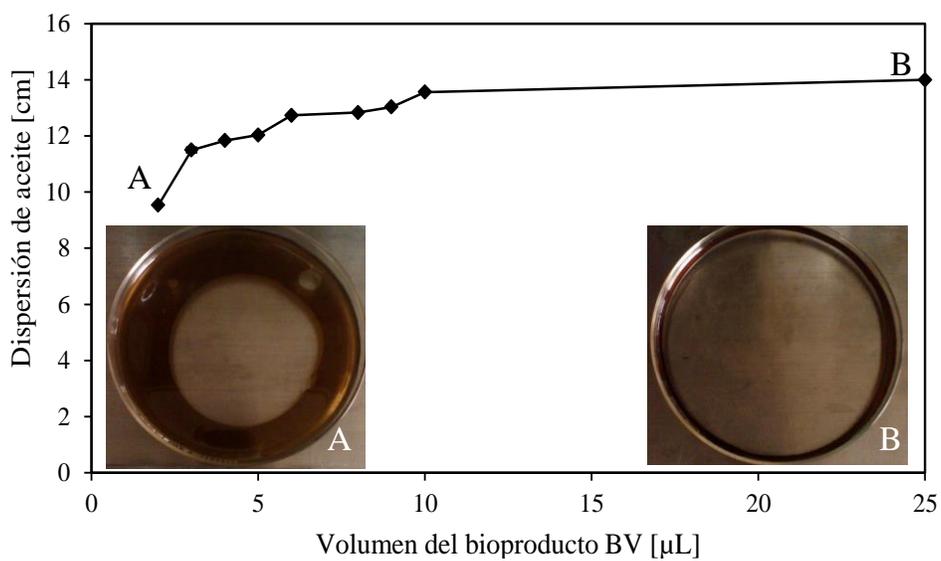


Figura 8.5. Dispersión de aceite del bioproducto de origen vegetal (BV).

Considerando que el bioproducto BV es un solvente, se utilizaron otros solventes polares (etanol, butanol y pentanol) y no polares (pentano, hexano y tolueno) para evaluar la dispersión de aceite y comparar su efecto con el bioproducto BV. Con 25 μL de solvente, los mejores resultados se obtuvieron con el bioproducto BV (Fig. 8.6), al formar halos de dispersión bien definidos de 14 cm. Además se observó que el bioproducto BV tuvo un comportamiento similar al que provoca el bioproducto BS (biosurfactante), es decir, el halo formado se va incrementando de tamaño sin deformarse y una vez que alcanza su máximo diámetro, se mantiene estable en forma y tamaño.

Los alcanos como pentano y hexano al ser adicionados sobre el crudo, se disuelven primero en el crudo y después de 1 min se forman halos bien definidos de 1 cm. El tolueno (hidrocarburo aromático) se quedó sobre la superficie del crudo y después de un minuto se observó que se integró parcialmente en el crudo. Lo anterior, probablemente se deba a que el tolueno tiene mayor afinidad por el crudo que por el agua. Los alcoholes como etanol, butanol y pentanol se solubilizan tanto en el agua como en el crudo, por lo que tienden a integrarse en ambos componentes, se observó que al ser adicionados desplazan el crudo sobre la superficie del agua pero inmediatamente vuelven a cubrir al agua. De acuerdo a la cantidad de carbonos en su molécula el desplazamiento fue mayor con más número de carbonos.

De acuerdo a lo anterior, el bioproducto BV presenta ventajas con respecto de otros solventes por su capacidad de solubilizarse por ser una sustancia no polar y dispersar el crudo, lo cual favorecería la movilización de crudo en yacimientos. Además se trata de un producto que no es sintetizado químicamente, lo que reduce su daño al medio ambiente por ser un producto biodegradable.

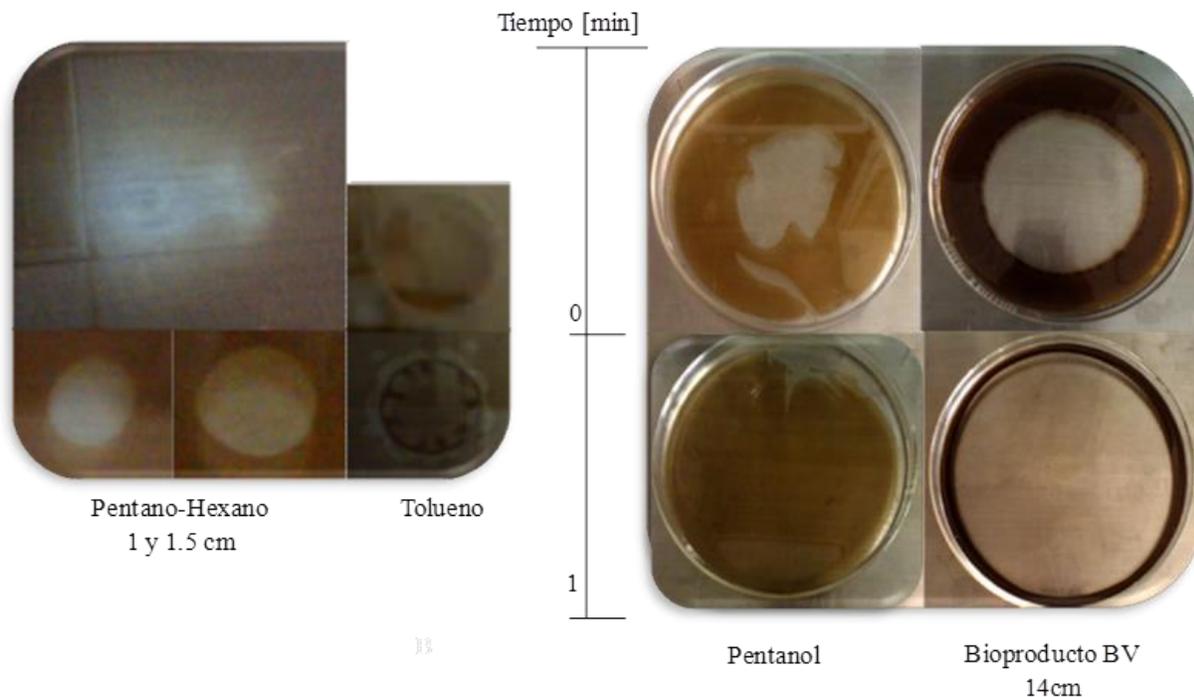


Figura 8.6. Dispersión de aceite del bioproducto BV y otros solventes

Algunos datos reportados para el bioproducto BV consideran su solubilidad en agua como nula o con un valor muy bajo de 13 mg/L (OIT, 2001), a esta concentración dio una dispersión de aceite de 0.9 cm, que comparada con la del agua de 0.3 cm es mayor, y ligeramente menor a 1.1 cm reportado por Roldán *et al.* (2011) para un biosurfactante producido por *Serratia marcescens* con sacarosa como fuente de carbono.

En la prueba de dispersión de aceite a concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50 % del bioproducto BV en agua se obtuvieron halos de dispersión de 1.5, 2, 3, 4 y 8.5 cm, respectivamente. Se observó que conforme se aumenta la cantidad de bioproducto en agua los halos tienden a deformarse o a reducirse después de un tiempo, esto se debe a que el bioproducto no es totalmente soluble en agua a estas concentraciones y está actuando como solvente al solubilizarse en el crudo.

Considerando lo anterior, es decir, que el bioproducto BV al 10% formó halos de dispersión más definidos y estables, se realizaron otras determinaciones menores a este porcentaje, las

cuales fueron medidas después de 24 h (Fig. 8.7). Con estos resultados se alcanzó una dispersión de aceite de 1.5 cm, lo que indica que a partir de una concentración de 10,382.7 mg/L (aproximadamente 1% de bioproducto BS), ya no hay variación significativa en el halo de dispersión producido, aunque aumente la cantidad de bioproducto. Al volver a evaluar esta última concentración y medir inmediatamente la dispersión, se obtuvieron halos de 3 cm, pero después de 2 min disminuyeron a 1.5 cm. Lo cual se atribuye a una solubilización del bioproducto BV en crudo, debido a su afinidad por este componente que es una sustancia no polar.

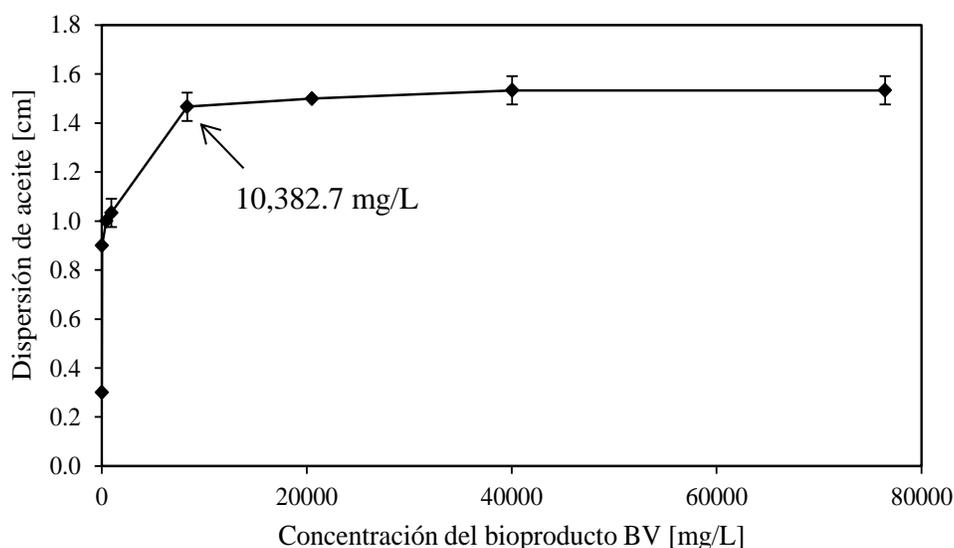


Figura 8.7. Dispersión de aceite del bioproducto BV diluido en agua destilada

Con los resultados obtenidos de tensión superficial y dispersión de aceite se observó que el bioproducto BV evaluado directamente y adicionado en agua presenta actividad surfactante, ya que puede aumentar la dispersión de aceite y disminuir la tensión superficial.

Otro parámetro que se midió, fue la tensión interfacial entre el bioproducto BV y agua. La TI obtenida para entre estas sustancias fue de 12 mN/m, que es un valor menor al reportado

para otros solventes como tolueno y cloroformo, 31.6 y 36.1 mN/m, respectivamente (Drelich *et al.*, 2002).

8.3 Mezclas de bioproductos

Los bioproductos que se seleccionaron presentaron diferentes comportamientos, así que se consideró los siguientes puntos para formar la mezcla:

- El bioproducto de origen microbiano (BS) es miscible en agua, mientras que el bioproducto de origen vegetal (BV) su solubilidad es muy baja.
- Se requiere que ambos bioproductos estén disueltos en agua para facilitar su aplicación en recuperación de crudo en pozo.
- Algunos tensoactivos tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial cuando se añaden al agua, ambos bioproductos presentaron actividad tensoactiva.
- La integración de los bioproductos BS y BV en agua se consideró que podía ser lograda por el biosurfactante (BS), debido a que se trata una molécula anfifílica, es decir, que en su estructura posee una parte polar y otra no polar.
- Debido a que los biosurfactantes pueden localizarse en las interfases agua/aceite pueden presentar actividad emulsificante. Daniel (2012) reporta la actividad emulsificante del bioproducto (BS) de 71.1%. Esta actividad también es precisamente la que podría facilitar la integración de los bioproductos BS y BV en una mezcla. Debido a que la emulsificación es un proceso que permite mezclar dos fases inmiscibles (como los bioproductos seleccionados), para ello, algunas veces se requiere energía o bien, otras sustancias (surfactantes, co-surfactantes o alcoholes, entre otros) (Salager, 1999)
- Las micelas que se forman en agua por el biosurfactante son de tipo normal, esta consideración se debe a que existe una mayor cantidad de la fase acuosa (conteniendo al bioproducto BS) que de la oleosa (bioproducto BV). De acuerdo a esto se esperaría que el bioproducto BV quede atrapado por el bioproducto BS y por

tanto, sea integrado en agua, considerando que esto es una emulsión, sería del tipo aceite en agua (Hernández, 2004).

8.3.1 Comportamiento de los bioproductos para integrarse como mezcla

El biosurfactante (bioproducto BS) en forma de monómeros (Fig. 8.8A) se depositan de acuerdo a su polaridad en las interfases gas/líquido, líquido/líquido y sólido/líquido, lo cual permite la disminución de la tensión superficial e interfacial. Cuando la cantidad de monómeros es alta, tienden a autoasociarse para formar micelas (Fig. 8.8B), las cuales son consecuencia de dos efectos el hidrofóbico y los puentes de hidrógeno. Al adicionar un componente no polar como el bioproducto BV en una solución micelar preparada a partir del bioproducto BS en agua, se esperaría que las micelas normales formadas (cuando la concentración sea mayor a la de la CMC) atraigan a su interior al bioproducto BV como consecuencia de la adición de energía (agitación) (Fig. 8.8C). De esta manera quedaría disperso el bioproducto BV en agua (Fig. 8.8D), obteniéndose una mezcla con mejores o diferentes características a las de los componentes puros.

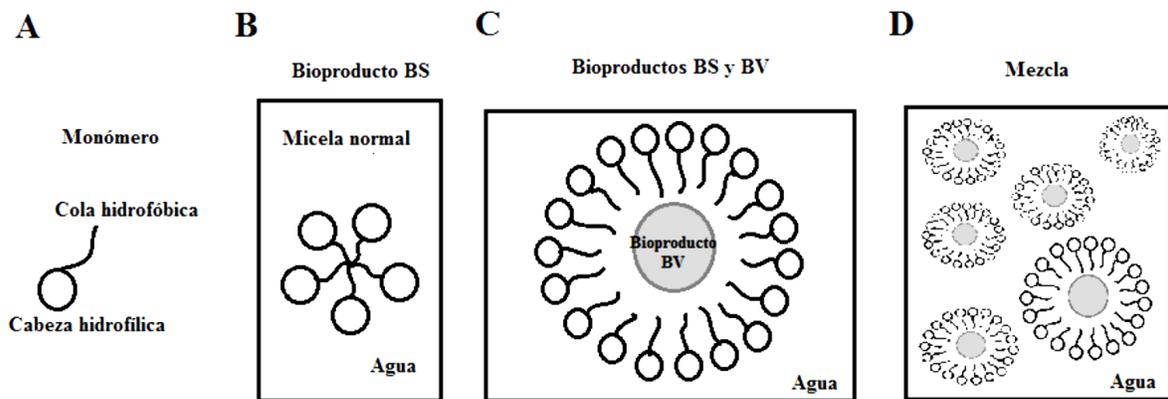


Figura 8.8. Comportamiento del bioproducto BS y del bioproducto BV como mezcla. A) Monómero, estructura anfifílica. B) Micela normal formada por el bioproducto BS en agua. C) Integración en una micela del bioproducto BV en agua debida al bioproducto BS. D) Bioproducto BS y BV en mezcla.

8.3.2 Efecto de los bioproductos BS y BV sobre dispersión de aceite (DA) y tensión superficial (TS) e interfacial (TI)

Los bioproductos BS y BV evaluados mediante dispersión de aceite (DA) no mostraron una tendencia al ser adicionados en solución (Fig. 8.9A) con respecto al incremento de uno o ambos bioproductos, pero se observó que en algunas mezclas de los bioproductos los halos de dispersión son mayores que los generados por ambos bioproductos de manera individual. En la concentración de 18,000 mg/L de bioproducto BS con 4,205 y 8,140 mg/L de BV, la forma de los halos de dispersión de aceite no estuvieron bien definidos y se reducían conforme el tiempo. Este efecto lo generó el bioproducto BV, ya que este mismo comportamiento se observó en la evaluación de la actividad tensoactiva del bioproducto BV (sección 8.2), el cual como biosolvente actúa dispersando el crudo ocasionando halos no definidos en forma y solubilizándose al reducirlos.

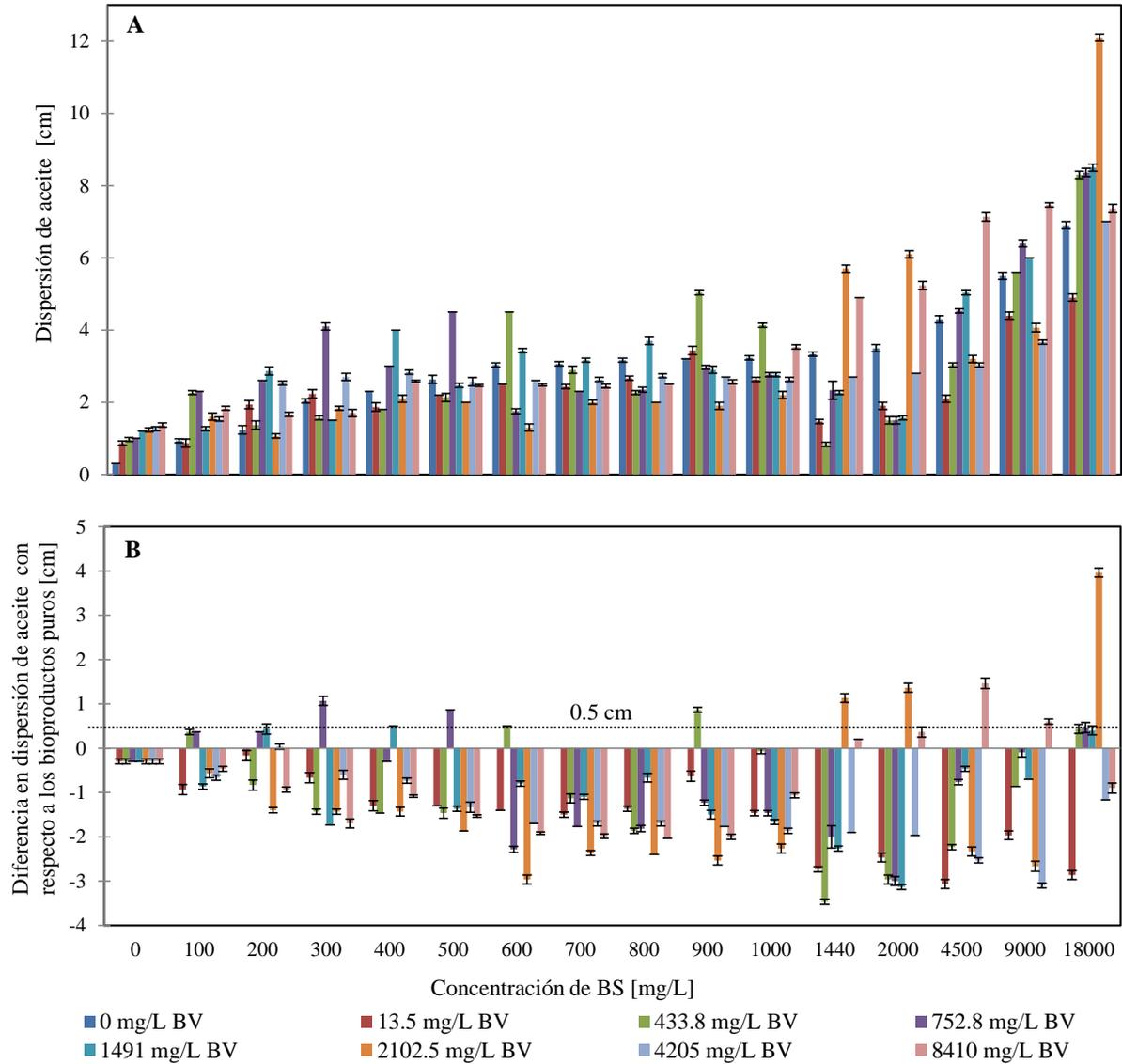


Figura 8.9. Efecto de los bioproducto BS y BV con respecto a la dispersión de aceite. A) Dispersión de aceite de los bioproductos BS + BV. B) Diferencia en dispersión de aceite con respecto a los bioproductos solos.

Para observar que mezclas de BS y BV daban un mejor resultado en dispersión de aceite, al halo formado por la mezcla se le restó el halo formado a la misma concentración de cada uno de los bioproductos individuales (Fig. 8.9B). La mezcla con mayor incremento (3.97 cm) fue la de 18,000 mg/L de BS con 2,102.5 mg/L de BV. La DA es una prueba rápida para evaluar la actividad de un surfactante, por lo que con base en una diferencia mayor de

0.5 cm, se seleccionaron las mezclas de los bioproductos para ser evaluadas en las siguientes pruebas y determinar si hay algún otro efecto.

La medición de la tensión superficial para cada una de las mezclas BS-BV (Fig. 8.10), no indicó ser una prueba determinante para seleccionar que mezclas tenían el mejor efecto en el crudo, pues en la mayoría de las mezclas hubo un incremento de TS y la disminución se observó sólo en aquellas que no tuvieron bioproducto BS y en 3 mezclas con 100 mg/L de este componente, reduciendo solo 2.5 y 4 unidades la TS. Aun cuando en casi todas las mezclas de bioproductos mantuvieron o aumentaron el valor de la TS, la TS con respecto al agua sigue siendo disminuida por lo menos 24 unidades.

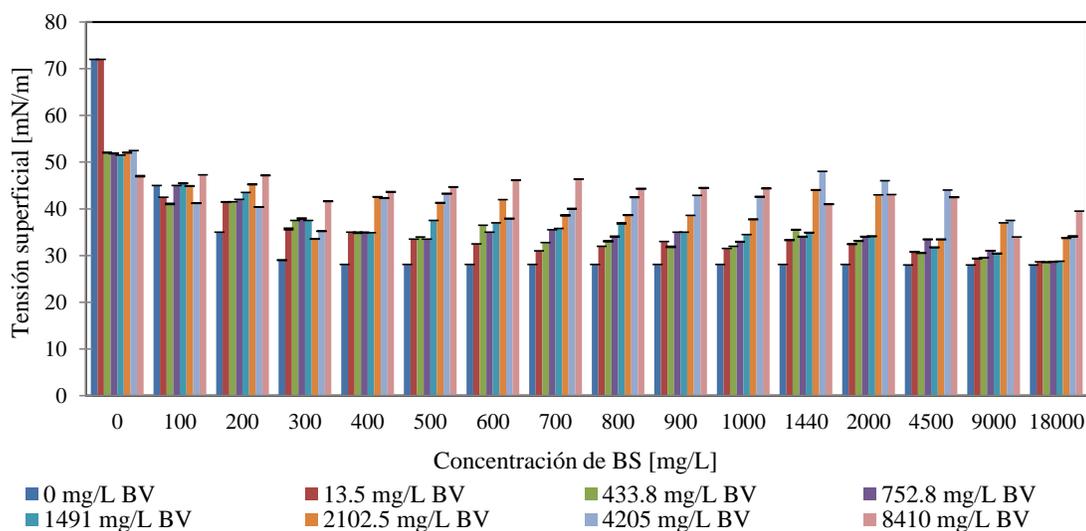


Figura 8.10. Efecto de los bioproductos BS y BV con respecto a la tensión superficial

Con las pruebas de dispersión de aceite y TS, se observó que no necesariamente el comportamiento en ambas pruebas está relacionado. En los trabajos de Daniel (2012) y García (2012), observaron que el biosurfactante producido por la cepa IMP-T tenía una relación indirecta entre la dispersión de aceite y la tensión superficial, ya que la dispersión iba en aumento y la TS disminuía a lo largo del cultivo.

Otro parámetro importante para evaluar la actividad tensoactiva de los bioproductos y su mezcla fue la tensión interfacial (TI). Considerando los resultados de dispersión de aceite, se evaluó la TI solo de aquellas muestras que tuvieron una diferencia de dispersión de aceite > 0.5 cm con respecto al control. Los resultados de la evaluación de TI se muestran en la Tabla 8.3.

Tabla 8.3. Valores de TI para las mezclas de bioproductos BS y BV con mejores resultados en dispersión de aceite

Mezclas		Tensión interfacial (TI) en mN/m		
BS [mg/L]	BV [mg/L]	BS	Mezcla (BS+BV)	Diferencia*
0	0	-	48**	-
300	752.8	35	31	4
400	1,491	35	29	6
500	752.8	32	26	6
600	433.8	32	27	5
900	433.8	25	23	2
1,440	2,102.5	35	14	21
2,000	2,102.5	35	13.5	21.5
4,500	8,410	32	18	14
9,000	8,410	29.8	14	15.8
18,000	2,102.5	9	4	5

*El valor de TI con hexadecano para el bioproducto BV en agua destilada es mayor de 40 por lo que se consideró de referencia la TI del bioproducto BS. ** TI del hexadecano-agua.

Los mejores resultados en dispersión de aceite mostraron disminución de la TI en todas las mezclas con respecto al bioproducto BS, teniendo las de mayor diferencia en las concentraciones de 1,440 mg/L y 2,000 mg/L de BS con 2,102.5 mg/L de BV, y con la concentración de 18,000 mg/L de BS con la misma cantidad de BV reduce la TI hasta 4 mN/m. Lo anterior indica que la mejor concentración de BV en la mezcla fue de 2,102.5 mg/L, ya que con esta concentración y el bioproducto BS se logró disminuir la TI en un

44.4%. Estos resultados son favorables debido a que la disminución de TI puede generar un efecto positivo en la recuperación de crudo (Soudmand-asli *et al.*, 2007) porque se incrementa el número capilar.

8.4. Efecto de los bioproductos sobre crudo

Las pruebas para evaluar el efecto de los bioproductos o sus mezclas sobre crudo, se realizaron con la finalidad de determinar si los bioproductos generan algún incremento en la movilidad (desplazamiento de crudo en placa de vidrio), aumento en la recuperación en un medio poroso y/o una disminución de la viscosidad del crudo.

8.4.1 Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre el desplazamiento de crudo en placa de vidrio

El desplazamiento de crudo en placa de vidrio permitió observar la movilidad que genera la adición de una mezcla o sustancia sobre un crudo (Tabla 8.4). En 5 de las mezclas de bioproductos evaluadas sobre un crudo de 18° API, se obtuvo un incremento de la movilidad del crudo, con respecto al generado por el bioproducto BS. El mayor desplazamiento de aceite (más de 10 cm) se obtuvo con las mezclas de 1,440 y 18,000 mg/L de BS, adicionadas con 2,102.5 mg/L de BV. En esta prueba se observó que el efecto fue mayor cuando los bioproductos se encontraban juntos en la mezcla, que de manera individual.

Tabla 8.4. Evaluación del efecto de los bioproductos y su mezcla sobre el desplazamiento de crudo.

Mezcla		Desplazamiento de crudo en placa de vidrio [cm]			
BS [mg/L]	BV [mg/L]	BS	BV	Mezcla (BS+BV)	Diferencia*
0	0	-	-	0.70	-
300	752.8	1.4	0.73	1.53	0.13
400	1,491	1.57	0.73	1.33	-0.24
500	752.8	1.6	0.73	1.5	-0.1
600	433.8	1.67	0.70	1.57	-0.1
1,440	2,102.5	1.8	0.75	13.27	11.47
2,000	2,102.5	1.9	0.75	1.13	-0.77
4,500	8,410	1.81	0.8	1.8	-0.01
9,000	8,410	2	0.8	2.1	0.1
18,000	2,102.5	2.23	0.75	13.3	11.07

* La diferencia fue determinada con base en el desplazamiento de crudo con el bioproducto BS y con respecto a la mezcla, debido a que los desplazamientos de crudo del bioproducto BV es similar al del agua.

Otra prueba de desplazamiento se realizó con crudo más pesado (15° API) y colocando previamente en contacto directo el crudo con los bioproductos solos y combinados (Fig. 8.11). Después de 24 h los desplazamientos obtenidos se muestran en la tabla 8.5.

Las mezclas con los bioproductos BS y BV lograron un desplazamiento de 30-50 % más grande que el que se llevó a cabo con el crudo original. Estas mezclas incrementaron el desplazamiento, comparado con el provocado por los bioproductos de manera individual. También se observó que con 1,440 mg/L y 18,000 mg/L de BS el desplazamiento de aceite fue igual a pesar de tener una diferencia de 10 veces su concentración. Sin embargo, con la presencia del bioproducto BV (2,102.5 mg/L) el efecto de BS a una concentración de 18,000 mg/L favoreció el desplazamiento en un 17%, comparado con la mezcla de BV y BS a 1,440 mg/L. Esto indica que el efecto de los bioproductos como mezcla fue mayor que el ocasionado de manera individual, lo que implica que la mezcla puede tener una potencial aplicación en la movilización de crudos. Por lo que surge el interés de seguir probando

estas mezclas como ha sido reportado en otros trabajos (Nguyen y Sabatini, 2012; Salager *et al.*, 2009; Mandal y Bera, 2012) donde han evaluado la utilización de mezclas de surfactantes o biosurfactantes con otras sustancias (terpenos, solventes) para incrementar el efecto que pueden tener por si solos los componentes en un proceso, obteniéndose mejores resultados.

Los bioproductos mostraron un efecto positivo en la movilización de crudo, esto puede ser debido a alguno(s) de los mecanismos de movilización-desplazamiento como la disminución de la tensión interfacial, solubilización, ensachamiento del crudo y/o emulsificación (Salager, 2005). Además los biosurfactantes y los biosolventes pueden mejorar las propiedades reológicas del crudo, entre ellas la viscosidad (Ilias *et al.*, 1999; Jacobs y Ryder, 2006), logrando con ello que el crudo sea desplazado con mayor facilidad dentro del yacimiento y en tuberías (Banat *et al.*, 2000; Kitamoto *et al.*, 2002).



Figura 8.11. Efecto de los bioproductos BS y BV y su mezcla sobre el desplazamiento de crudo previamente en contacto directo con el crudo.

Tabla 8.5. Evaluación de las mezclas de bioproductos BS y BV en contacto directo con crudo

Sustancia o mezcla	Desplazamiento de crudo placa de vidrio [cm]
Agua	2.1
Crudo	1
BV (2,102.5 mg/L)	2.6
BS (1,440 mg/L)	3.1
BS (1,440 mg/L)+ BV (2,102.5 mg/L)	4
BS (1,8000 mg/L)	3.1
BS (1,8000 mg/L) + BV (2,102.5 mg/L)	4.7

8.4.2 Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre la recuperación en crudo

El efecto de los bioproductos sobre medio poroso impregnado con crudo de 18°API, para la evaluación de la liberación del mismo se muestra en la tabla 8.6. El bioproducto BS utilizado a dos concentraciones (1,440 y 18,000 mg/L) tuvo efecto positivo sobre la recuperación de crudo, aunque fue mayor el efecto a la concentración mayor. Mientras que el bioproducto BV (2,102.5 mg/L) tuvo un efecto menor en la liberación de crudo y solo a 70° C. En cuanto a la mezcla de los bioproductos BS y BV, en ambas mezclas hubo recuperación de aceite, pero fue mayor con una concentración de BS de 18,000 mg/L a 70° C. Comparadas las mezclas con los bioproductos individuales, se puede observar que hubo un efecto significativo de la combinación de éstos, incrementando la recuperación de crudo hasta un 10% con respecto al bioproducto BS a 70° C (Fig. 8.12). Esta recuperación fue alcanzada con la mezcla de BS de 18,000 mg/L y de BV 2,102.5 mg/L, por lo que esta mezcla se consideró la mejor.

El mejor sistema de recuperación de aceite fue con la mezcla de bioproductos BS + BV, que provocó una liberación de aceite del 90%, lo cual también concuerda con que la mezcla

alcanzó el mayor efecto en dispersión de aceite (12.10 cm), menor tensión interfacial (4 mN/m) y mayor desplazamiento de crudo (11.3 y 4.7 cm).

Tabla 8.6. Evaluación de los bioproductos BS y BV en un sistema de recuperación de crudo.

Sustancia o mezcla	Recuperación de crudo [%]		
	Temperatura		
	30	50	70
Agua	0	0	0.15
BV (2,102.5 mg/L)	0	0	10.15
BS (1,440 mg/L)	0	0.54	13.29
BS (1,440 mg/L)+ BV (2,102.5 mg/L)	0	2.15	24.36
BS (18,000 mg/L)	0	5.84	80.26
BS (18,000 mg/L) + BV (2,102.5 mg/L)	0	14.52	90.04

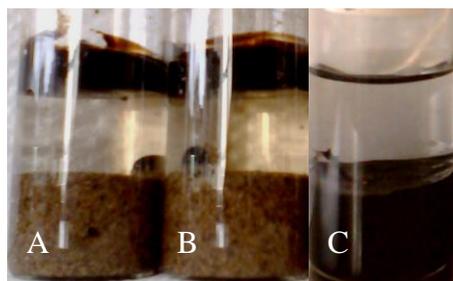


Figura 8.12. Recuperación de los bioproductos en un medio poroso a 70°C. A) BS (18,000 mg/L). B) BS (18,000 mg/L) + BV (2,102.5 mg/L). C) Agua.

En algunos trabajos han evaluado la recuperación de aceite utilizando mezclas de surfactantes con solventes pero de tipo químico, obteniendo resultados promisorios (Kumar *et al.*, 2012; Mandal y Bera, 2012; Rosen, 2005; Wan *et al.*, 2012). En otros trabajos se han utilizado biosurfactantes para la recuperación de aceite (Abtahi *et al.*, 2003; Makkar y Cameotra, 1997). Sin embargo, no existen trabajos en donde se utilicen mezclas de

surfactantes y solventes de origen biológico, aunque hay otros trabajos que muestran que el empleo de estos bioproductos en mezclas pueden tener potencial aplicación en diferentes áreas, como es la industria petrolera (Fracchia *et al.*, 2012; Nguyen y Sabatini, 2011).

La recuperación de aceite de 90%, lograda por la mejor mezcla de bioproductos (BS+BV) fue parecida a la obtenida por Mandal y Bera (2012) de 85.7%, quienes utilizaron una nanoemulsión de un surfactante y un solvente de origen químico, donde un 23.3 % de la recuperación fue debida a la nanoemulsión. En este proyecto, el 10.9% de recuperación adicional debido a la mezcla de los bioproductos BS y BV fue atribuido al bioproducto BV. Esta recuperación de aceite fue similar a la provocada con biosurfactantes producidos por bacilos de 8.5 al 13.7% (Suthar *et al.*, 2008).

La observación microscópica de los bioproductos y su mezcla, muestra que en cada uno de ellos se formaron micelas de diferente cantidad, apariencia y tamaño (Fig. 8.13). Para el bioproducto BS en solución a una concentración de 18,000 mg/L, las micelas formadas fueron de diámetros menores de 2 μm (Tabla 8.7) y brillantes, lo cual se debe al sustrato remanente (aceite de soya) que pudiera estar reflejando la luz, el cual que fue integrado en la fase acuosa por el bioproducto BS (biosurfactante). El bioproducto BV (2,102.5 mg/L) también formó micelas brillantes, solo que con un contorno más definido y un 20.8 % de las micelas formadas fueron mayores de 2 μm .

Los bioproductos BS y BV en mezcla, formaron micelas de diferente tamaño, cantidad y apariencia que las formadas por los bioproductos solos. Hay una mayor cantidad de micelas, en su mayoría menores a 5 μm , en apariencia oscuras y con contornos brillantes, esto se debe probablemente a la integración del bioproducto BV ocasionada por el bioproducto BS (biosurfactante), que pudiera estar encapsulándolo y por esta razón las micelas no son totalmente brillantes, y solo emiten luz en su contorno. En los otros dos tamaños (5-10 y >10 μm) algunas micelas se parecen a las observadas con el bioproducto BV (micelas brillantes con contorno definido) y otras pueden tratarse probablemente del sustrato (aceite de soya) o bien, una mezcla de estos dos por ser productos no polares y por lo tanto son afines entre ellos.

La forma, apariencia y cantidad de los bioproductos en mezcla probablemente influyó en la recuperación de crudo, debido a una mejor homogeneidad de los mismos en agua y que pudiera estar mejorando con la temperatura.

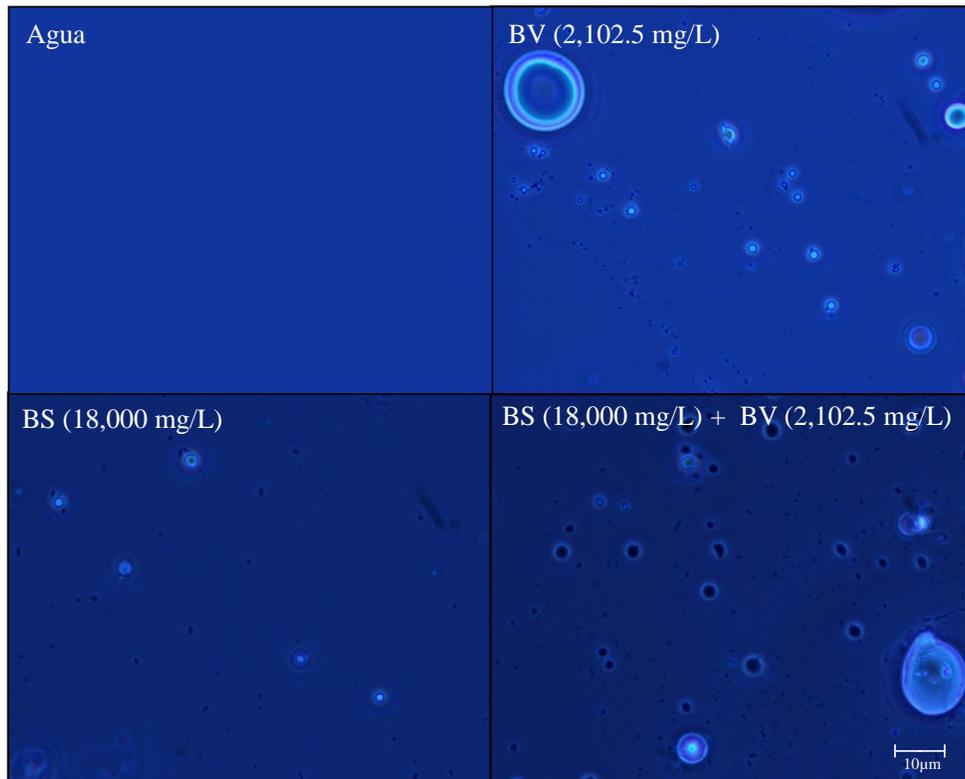


Figura 8.13. Bioproductos observados en el microscopio en contraste de fases (100x)

Tabla 8.7. Tamaños de las micelas de los bioproductos BS y BV observados en el microscopio en contraste de fases (100X)

Sustancia o Mezcla	Cantidad de micelas			
	Tamaño [μm]			
	<2	2-5	5-10	>10
Agua	NO	NO	NO	NO
BV (2,102.5 mg/L)	19	2	2	1
BS (18,000 mg/L)	7	NO	NO	NO
BS (18,000 mg/L) + BV (2,102.5 mg/L)	18	13	2	1

NO: No observadas

8.4.3 Evaluación del efecto combinado de los bioproductos sobre la viscosidad de dos crudo

La viscosidad en los aceites es un parámetro importante a considerar para la selección de un proceso EOR, para crudos con alta viscosidad suele ser recomendable tratamientos térmicos, mientras que para crudos menos viscosos se recomienda el uso de métodos químicos (Abass y Song, 2011). Los solventes y biosurfactantes como método de recuperación de crudo han mostrado buenos resultados en la disminución de la viscosidad. Se ha observado que la inyección de solventes como propano han reducido la viscosidad de un crudo de 10,000 a 2,000 mPa*s (James, 2009) y varios solventes en mezcla (heptano, octano y tolueno en relaciones de 50:30:20, respectivamente) redujeron la viscosidad de 53.6 a 4.3 mPa*s (Ghosh y Al Shalabi, 2011). Por otra parte, en trabajos sobre biosurfactantes reportan que este tipo de metabolitos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* disminuyeron la viscosidad un 38.5 y 34.1%, respectivamente (Li *et al.*, 2002; Soudmand-asli *et al.*, 2007). De acuerdo a estos antecedentes sobre la capacidad de los solventes y biosurfactantes para reducir la viscosidad, los bioproductos BS y BV, es decir, un biosurfactante y un solvente pero de

tipo biológico (biosolvente) pueden tener un mejor efecto sobre la disminución de la viscosidad al ser empleados ambos en mezcla.

El efecto de la mezcla de los bioproductos fue evaluado sobre la viscosidad de dos crudos con diferentes propiedades y densidades (18 y 15° API), observando diferente efecto en cada uno. Los bioproductos BS y BV de manera individual, disminuyeron la viscosidad en ambos crudos (Figs. 8.14 y 8.15). En cambio, con la mezcla de bioproductos (BS y BV) hubo una disminución de la viscosidad solo en el crudo de 18° API (Fig. 8.14). En este crudo la viscosidad a 70° C con respecto a la del crudo original, fue disminuida por efecto de los diferentes fluidos con los que se puso en contacto: el agua disminuyó la viscosidad 23.9 %, el bioproducto BV 31.9 %, el bioproducto BS 37.5% y la mezcla de bioproductos 52.7%.

Los resultados anteriores muestran que la mezcla de bioproductos fue la que disminuyó más la viscosidad (15.2% más que el bioproducto BS solo). Estos porcentajes variaron de un 3.4 a 15.1 % al tener el crudo a 30° C, donde el agua disminuyó la viscosidad en un 27.3 %, el bioproducto BV 40.3 %, el bioproducto BS 52.6% y la mezcla de bioproductos un 61.4 %. Considerando estos porcentajes, los resultados fueron favorables, sin embargo los valores de viscosidad son 10 veces más altos a 30° C que a 70° C, lo que implica que es necesario realizar un perfil de temperaturas para observar que posibles dificultades puede haber en la transportación de crudo en tuberías a diferentes temperaturas.

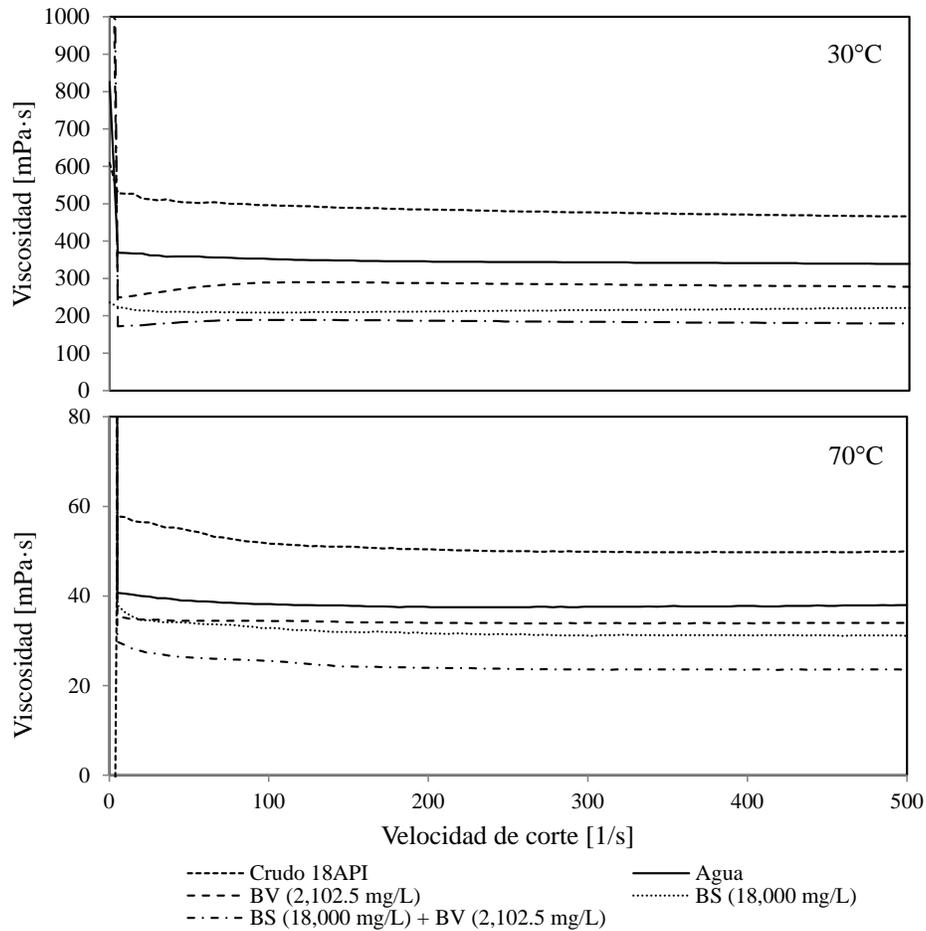


Figura 8.14. Efecto de los bioproductos BS y BV sobre la viscosidad en crudo de 18° API.

En cuanto al crudo de 15° API (aceite más pesado) su viscosidad fue disminuida a 70 °C con respecto al crudo original por efecto del agua en un 13 %, el bioproducto BV 16.9 %, el bioproducto BS 21.6 % y la mezcla de bioproductos (BS y BV) 23.3 % (Fig. 8.15). La variación entre el bioproducto BS y la mezcla fue baja (1.7 %), por lo que no fue significativa y se consideró que el efecto alcanzado con o sin bioproducto BV es el mismo. Sin embargo, el no tener un efecto positivo en la viscosidad no indica que la mezcla no sea útil para un proceso EOR, ya que hay que considerar que en otros parámetros si hubo resultados positivos, como fue la tensión interfacial y en el sistema de recuperación de crudo. Cabe resaltar que las características del yacimiento y del crudo varían de lugar a lugar, por lo que los efectos que se obtendrán de una sustancia o mezcla son diferentes. En

la viscosidad del crudo de 15° API medida a 30° C, estos porcentajes de 70°C variaron de 2.3 a 4 % y el valor de la viscosidad fue aproximadamente 9 veces más alto.

Con estos resultados se corroboró, que el efecto de los bioproductos solos o combinados dependerá del crudo o aceite que se evalué.

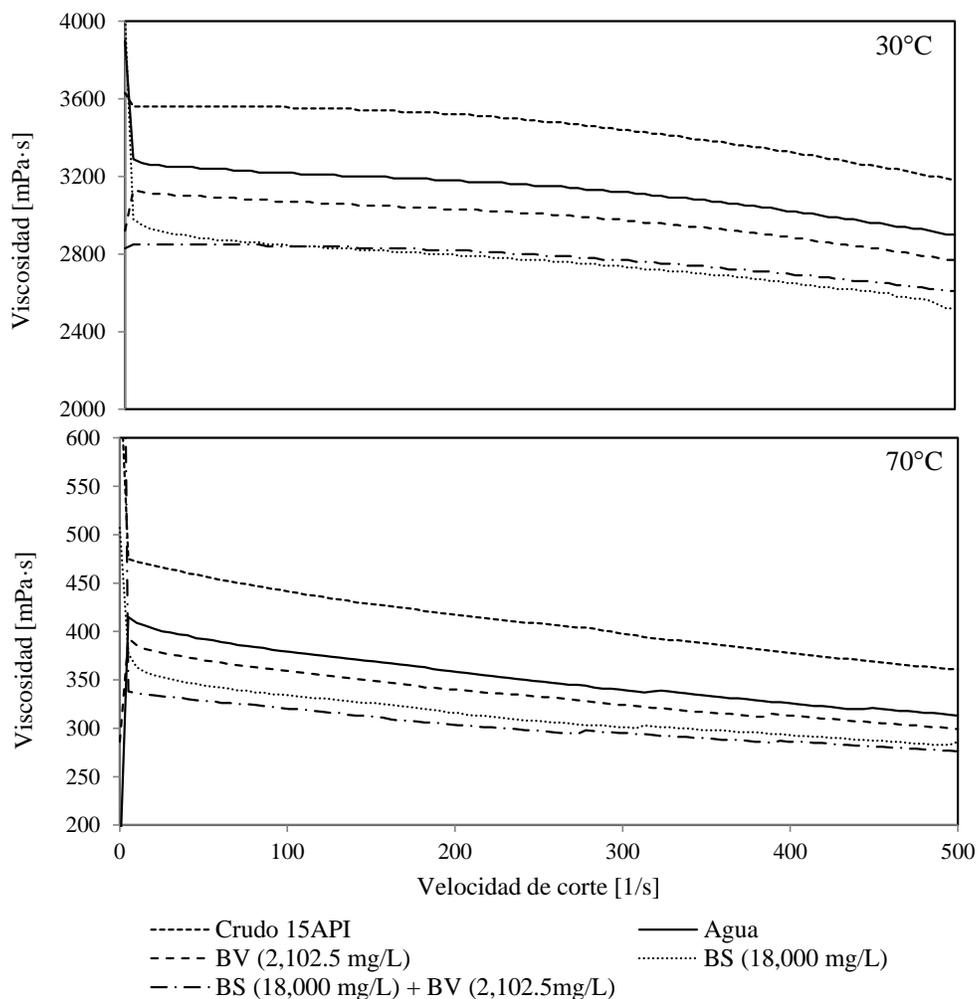


Figura 8.15. Efecto de los bioproductos BS y BV sobre la viscosidad en crudo de 15° API

Los resultados obtenidos principalmente en tensión interfacial y disminución de la viscosidad, con los bioproductos BS y BV en mezcla resultaron ser mejores que los obtenidos por el bioproducto BS, por lo que pudiera considerarse que se potenció el efecto

de este último bioproducto sin ser totalmente puro, inclusive esta mezcla fue ligeramente mejor que el biosurfactante puro reportado por Singer *et al.* (1983) (Tabla 8.8) con buenos resultados.

Tabla 8.8. Comparación de la TS, TI, CMC y disminución de la viscosidad con respecto al bioproducto BS

Parámetro	BS	Mezcla BS y BV	Singer <i>et al.</i> (1983)
TS [mN/m]	28	33.73	30
TI* [mN/m]	9.5	4	11.8
CMC [mg/L]	350	-	295
Disminución de la viscosidad [%]	37.5	52.7	50

TS: tensión superficial, TI*: tensión interfacial con hexadecano, CMC: concentración micelar crítica.

Los perfiles de viscosidad con respecto a la velocidad de corte (reograma) de cada uno de los crudos son diferentes debido a las características propias de cada uno de ellos, y éstas como ya se mencionó influyeron en el efecto generado por los bioproductos solos y combinados. La finalidad de realizar estos reogramas fue para tener un panorama de cómo afectan los bioproductos BS y BV sobre la reología de los crudos. La reología es la ciencia que estudia la deformación y flujo de la materia (Guánchez, 2005). Con respecto al crudo de 15° API conforme disminuyó la viscosidad fue más estable su perfil, lo que indica que el crudo se vio menos afectado por el esfuerzo aplicado, mientras que en el crudo de 18° API fueron estables los perfiles en todas las lecturas de viscosidad sin importar la sustancia o mezcla empleada sobre el crudo. De acuerdo a estos resultados, sería de interés realizar estudios reológicos más completos considerando esfuerzos de corte, velocidades de corte y diferentes temperaturas, y así determinar cómo se ve afectada la reología del crudo al estar en contacto con los bioproductos, lo cual podría determinar el posible comportamiento del crudo durante el proceso extracción en yacimientos, o bien durante su transportación.

9. CONCLUSIONES

- La verificación de la actividad tensoactiva del bioproducto BS fue reproducible a lo reportado en trabajos previos, presentando una TS de 28 mN/m, dispersión de aceite de 7 cm, TI de 9 mN/m.
- A pesar de que el bioproducto BS no era un producto puro, tuvo una CMC de 350 mg/L y un rendimiento de 18 g/L, que lo hace eficiente con respecto a otros bioproductos puros reportados en la literatura.
- El bioproducto BV (biosolvente) presentó actividad tensoactiva al dispersar el aceite evaluado directamente y adicionado en agua. El bioproducto puro tuvo una TS de 28 mN/m y provocó dispersión de aceite más grandes que otros solventes con menos volumen, con 2 μ L la dispersión de aceite fue de 9.4 cm y la TI con agua fue de 12 mN/m. Adicionado en agua incrementó la dispersión de aceite en 1.5 cm, comparada con la del agua de 0.3 cm a una concentración de 10,382.7 mg/L y redujo la TS de 72 a 50 mN/m a una concentración de 16,490 mg/L, correspondiente a su CMC.
- La TS no fue un parámetro contundente que permitiera determinar el posible efecto de los bioproductos combinados sobre crudo.
- Mezclas de los bioproductos BS y BV tuvieron un efecto positivo sobre la dispersión de aceite, incrementando hasta 3.97 cm, mientras que en TI disminuyó desde 2 hasta 21.5 unidades con respecto al bioproducto BS, con una TI mínima de 4 mN/m.
- En las pruebas de movilidad (desplazamiento de crudo en placa de vidrio) las mezclas de bioproducto BV (2,102.5 mg/L) con dos concentraciones diferentes de BS (1,440 y 18,000 mg/L), incrementaron el desplazamiento de crudo de 18° API, 5 veces más grande que el bioproducto BS sólo. Con el crudo de 15° API, las mismas mezclas incrementaron el desplazamiento de aceite de 30 a 50 %.
- En recuperación de crudo, la mejor relación de bioproductos fue con 18,000 mg/L BS y 2,102.5 mg/L BV, con la que se obtuvo la mayor recuperación a 70° C, observándose que el efecto de los bioproductos fue afectado por la temperatura. La recuperación fue de 90 %, la cual puede ser atribuida a la acción de ambos

productos, o bien, al efecto sumado de ellos, porque el bioproducto BS recuperó 80.3 % y el BV 10.2 %.

- El efecto de la mejor relación de bioproductos sobre la viscosidad de crudo de 15° API, tuvo el mismo valor que la del bioproducto BS, por lo que el efecto fue atribuido a este último bioproducto y no a la mezcla. En cambio, la misma mezcla aplicada sobre un crudo de 18° API, disminuyó un 52.7% la viscosidad del crudo original, comparado con un 37.5% que disminuyó el bioproducto BS y un 31.9% el bioproducto BV.
- El efecto que la mezcla de bioproductos puede provocar en un crudo y/o yacimiento dependerá de las características propias de estos dos.
- Resultados de TS, DA y TI fueron reproducibles con el bioproducto BS a una concentración de 18,000 mg/L (concentración del sobrenadante libre de células), por lo que el proceso de liofilización puede ser omitido para la mezcla.

10. RECOMENDACIONES

La mezcla de bioproductos BS y BV logró tener efectos positivos sobre la movilización y recuperación de aceite, además de provocar disminución de la TI, D.A.; sin embargo hace falta realizar más investigación y experimentación a nivel laboratorio y a condiciones de campo (yacimientos) para mejorar y optimizar los resultados de este trabajo e implementar este tipo de tecnología a nivel campo. Por lo que se sugiere lo siguiente:

- Purificar el bioproducto BS con la finalidad de evaluar si se puede incrementar el efecto sobre crudo y evaluar que tan favorable puede ser con respecto al uso del biosurfactante sin liofilizar (sobrenadante libre de células..
- Evaluar la mezcla de BS y BV adicionando un co-surfactante (por ejemplo, otro biosurfactante, un alcohol u otro solvente), lo que puede permitir la formulación de nano o microemulsiones, con las que se pueden alcanzar tensiones interfaciales bajas o ultrabajas, y por tanto, el incremento del número capilar y de los factores de recuperación de crudo.
- Debido a la prueba de recuperación de crudo en un medio poroso que fue positiva, se recomienda realizar pruebas de mojabilidad y tensión interfacial con crudo (en lugar de hexadecano), con esto, se puede obtener un análisis más completo de los mecanismos de recuperación en los que están actuando los bioproductos BS y BV.
- Evaluar el efecto de los bioproductos BS y BV sobre la viscosidad de otros crudos.
- Realizar estudios reológicos más completos de los crudos donde los bioproductos BS y BV tengan efectos positivos sobre la viscosidad del mismo, esto permitirá definir más adecuadamente el efecto ocasionado en el crudo y su posible comportamiento durante la recuperación en yacimiento y transportación.
- Evaluar la estabilidad de la mezcla a condiciones de yacimiento (por ejemplo: temperatura, salinidad y pH).
- Considerando la baja solubilidad del bioproducto BV en agua y su abundancia en la naturaleza, se podría probar su combinación con otros biosurfactantes para incrementar la cantidad del bioproducto BV incorporado en agua.

- Probar el bioproducto BS con otro terpeno o con algún bioproducto similar o derivado del bioproducto BV.
- Realizar formulaciones de mezclas a condiciones de yacimiento.
- Continuar la investigación de mezclas con otros biosurfactantes, lo cual puede potenciar los efectos que tiene éste sobre el crudo, inclusive se podrían generar sinergias.

11. GLOSARIO

Bioproducto. Compuestos sintetizados a partir de microorganismos, plantas o animales, o con algún componente de materiales biológicos o renovables. El prefijo “bio” se refiere a los insumos derivados de fuentes biológicas como los provenientes de microorganismos, la agricultura y / o elaboración de alimentos.

Biosurfactante. Moléculas anfifílicas sintetizadas por microorganismos, hongos o levaduras dentro o fuera de su pared celular.

Concentración micelar crítica (CMC). Parámetro característico de los surfactantes que se define como la concentración en la que se alcanza la mínima tensión superficial y por arriba de este valor el surfactante forma micelas espontáneamente.

Emulsión. Mezcla de líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante).

EOR (Enhanced oil recovery). Proceso de recuperación de hidrocarburos que se aplica a los yacimientos, en algunas ocasiones después de la recuperación primaria y la secundaria, con objeto de aumentar la recuperación final del mismo.

Factor de recuperación de crudo. Porcentaje que representan los hidrocarburos recuperables en las reservas geológicas de crudo en un yacimiento o de un sistema de recuperación a nivel laboratorio o planta piloto.

Grados API. Parámetro internacional del American Petroleum Institute (API), el cual corresponde a la medida de la densidad de los productos líquidos del petróleo, derivado de la densidad relativa de acuerdo con la siguiente ecuación: $Densidad\ API = (141.5 / densidad\ relativa) - 131.5$. La densidad API se expresa en grados; la densidad relativa 1.0 es equivalente a 10 grados API.

Isopreno (metil-1,3-butadieno). Compuesto orgánico con fórmula $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$. Es producido de forma natural en los animales y en las plantas.

MEOR (Microbial enhanced oil recovery). Proceso de recuperación de crudo mediante un sistema biológico o vía microbiana que consiste en el uso de microorganismos o sus metabolitos.

Micela. Conglomerado dinámico de moléculas de surfactante (monómeros).

Microemulsión. Sistema de agua, aceite y por lo menos un compuesto anfifílico, como los surfactantes. Esta emulsión tiene un tamaño de gota (glóbulos de aceite) menor a 100 nm, lo que permite que la solución sea transparente, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable.

Mojabilidad. Es la capacidad que tiene un líquido de extenderse y dejar una traza sobre un sólido. Depende de las interacciones intermoleculares entre las moléculas superficiales de ambas sustancias. Este parámetro también es considerado como la preferencia de un sólido de estar en contacto con un fluido en lugar de otro.

Molécula anfifílica. Molécula con una proporción o varias proporciones hidrofílicas (polar) e hidrofóbicas (no polar).

Nanoemulsión. Emulsión que poseen tamaño de gota entre 20 y 500 nm, de apariencia translúcida y alta estabilidad cinética, sin requerir concentraciones de surfactante tan elevadas para su formación.

Permeabilidad. Capacidad de la roca para permitir el flujo de fluidos a través de su medio poroso.

Porosidad. Cantidad de espacio vacío dentro de una roca o formación.

Reología. Es la ciencia de los fluidos que estudia la deformación de un cuerpo sometido a esfuerzos externos.

Surfactante. Moléculas anfifílicas que pueden ser sintetizados de manera química o biológica. La principal capacidad de estas moléculas es disminuir la tensión superficial.

Tensión interfacial. Cantidad de energía libre existente en la zona de contacto de dos líquidos inmiscibles.

Tensión superficial. Cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie de un líquido por unidad de área. Este parámetro es medido para sistemas líquido-gas.

Terpeno. Compuestos formados por la unión de unidades pentacarbonadas ramificadas relacionadas con el isopreno.

Viscosidad. Resistencia a la deformación del fluido, la cual se ve afectada por la temperatura. Este parámetro relaciona el esfuerzo cortante con la velocidad de deformación o de corte.

12. REFERENCIAS

- Abass E., Song C. L. (2011) Artificial intelligence selection with capability of editing a new parameter for EOR screening criteria. *Journal of Engineering Science and Technology*. Vol. 6, No. 5, 628 – 638.
- Abdalla E. K., Tan, I. M. (2012) The application of a new polymeric surfactant for chemical EOR in Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites. Ed. Laura Romero-Zerón. 45-70.
- Abtahi N., Roostaazad R., Ghadiri F. (2003). Biosurfactant Production In MEOR For Improvement Of Iran's Oil Reservoirs' Production Experimental Approach. SPE International Improved Oil Recovery Conference in Asia Pacific. Kuala Lumpur, Malaysia, SPE Paper 57321.
- Acuña A., Pucci G., Morales M. J., Pucci O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 30:29-36.
- Agostini C. T. S., Vieira R. F., Bizzo H. R., Silveira D., Gimenes M. A. (2012) Secondary Metabolites in Chromatography and Its Applications. Sasikumar Dhanarasu, InTech, 132.
- Aguilera D. A. V., Rojas O., Mogollón G., Gutierrez I., Gomez L. (2002) Formulación de surfactantes y especies alcalinas en el destintado por flotación. Congreso Iberoamericano de investigación de celulosa y papel. 1-11.
- Alonso M. A.; De la Cruz A. V., Barceló G. (2009) Pronóstico para la inyección de tenso-activos en pozos de petróleo a partir de una metodología que integra técnicas de inteligencia artificial y minería de datos. *Interciencia* Vol. 34 No. 10. 703-709.
- Al-Mjeni R., Arora S., Cherukupalli P., Wunnik J., Edwards J., Felber B. T., Gurpunar., Hirasaki G., Miller C. A., Jackson C., Kristensen M. R., Lim F., Ramamoorthy R. (2011) ¡Legó el momento para la tecnología EOR?. *Oilfield Review*, Vol. 22, No. 4, 16-35.
- Al-Sulaimani H., Joshi S., Al-Wahaibi Y., Al-Bahry S., Elshafie A., Al-Bemani A. (2011) Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: Current developments and future prospects. *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.* 1 (2): 147-158.

- Alvarado, V. Manrique E. (2010) Enhanced oil recovery: an update review. *Energies*, 3, 1529-1575.
- Amarnath A. (1999). Enhanced Oil Recovery Scoping Study, EPRI.
- Amézcuca V. C., Poggi V. H., Esparza G. F., Rios L. E., Rodríguez V. R. (2007) Effect of culture conditions on fatty acids composition of biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*. Vol. 98: 237-240.
- Anton R. (2005) Tensión interfacial. Cuaderno FIRP S203-A. Universidad de los Andes. Venezuela. 1-11.
- Araujo K. F., Melo SA. L. M., Loureiro B. F. A. C., Ramos M. R., Piacsek B. C., Guimaraes F. D. M. (2008). Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 147: 33-45.
- Ávila G. R. M., Burguera J. L., Salager J. L., Bracho C. L. (2003). Las micelas en química analítica. Aplicaciones en la espectroscopía de absorción atómica. *Sociedad Venezolana de Química*, Vol. 26 N. 2.
- Bajaj H., Bisht S., Yadav M., Sighn V. (2011) Bioavailability enhancement: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol. 2, No. 2, 202-216.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:495-508.
- Batista S. B., Mounteer A. H., Amorim F. R., Tótola M. R. (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology* 97, 868–875.
- Batista G. R. A., Quesada Q. A. L., Sánchez R. A., López G. S., Domínguez S. Z. (2011) Microbiología y biotecnología aplicadas a la exploración y producción petroleras *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 42, núm. 1, pp. 35-41.
- Bhairi S. M., Mohan C. (2007) Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. *Calbiochem*. Pág. 1.
- Bleve M., Pavanetto F., Perugini P. (2011). Solid lipid nanoparticles: technological developments and in vivo techniques to evaluate their interaction with the skin in *Progress in molecular and environmental bioengineering-from analysis and modeling to technology applications*, Prof. Angelo Carpi (Ed.), InTech. 191-216.

- Bognolo G. (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 152, 41–52.
- Bokanka T. C. X. (2006) Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal . Curso 2006/07. 21-24.
- Bradford m: M. (1976) A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* , 72: 248-254.
- Bravo L. C., Fuentealba L. O. (2008) Biosolventes como agentes limpiadores de derrames de petróleo en zonas costeras. Fundación MAPFRE. 1-15.
- Bryant L. S., Lockhart T. P. (2002) Reservoir Engineering Analysis of Microbial Enhanced Oil Recovery. *SPE Reservoir Evaluation & Engineering*. 365-374.
- Cameotra, S.S. and Makkar, R.S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 520-529.
- Cantarero M. A. S. (2010) Determinación de tensioactivos aniónicos en matraces ambientales. Comportamiento del jabón en una parcela agrícola. Tesis doctoral. Universidad de granada. 25-29.
- Cardoso F.G., Fonseca A.P.F., Nele M., Zarur C.M.A. (2010). Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Biomedicine Biotechnol*, 1-8.
- Carvel D. D., Cartwright R. T. (2005) Innovative heavy oil contaminant remediation at typical MGP remediation sites. [Http://www.mecx.net/services1.html](http://www.mecx.net/services1.html).
- Castellanos E. F., Perea V. A., Ortíz L. C., Obtención de alcohol perílico por biotransformación del limoneno. *Scientia Et Technica*, vol. XIII, núm. 33, 137-140.
- Chandran P., Das N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *trichosporon adahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International J. Eng. Sci. Technol.*, 2(12): 6942-6953.
- Chen T., Zhang G., Ge J., Yang H. (2013) The Research on Weak Alkali ASP Compound Flooding System for Shengli Heavy Oil. *CS Canada, Advances in Petroleum Exploration and Development* Vol. 5, No. 1, 106-111.
- Colina M. F. J. (2009) Evaluación del proceso de inyección alterna de vapor con solventes en pozos horizontales en el yacimiento Jobo 01, campo Jobo 02, a través de la simulación numérica. Universidad de Oriente, Venezuela, 49-51.

- Colonial Chemical, Inc. (2006) Colonial Chemical Surfactants for Use with d-Limonene Formulations. Formula number: 011, www.colonialchem.com.
- Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) (2011) El futuro de la producción de petróleo en México: Recuperación avanzada y mejorada (IOR-EOR). 2-37.
- Contreras A. V. (2012) Mejoramiento de la producción de un biosurfactante. Instituto Politécnico Nacional. 125pp.
- Daniel T. A. (2012) Evaluación de la estabilidad de un biosurfactante con potencial aplicación en la industria petrolera. Universidad Politécnica de Puebla. 60pp.
- Dehghan N. G., Hasa M., Kazaeli P., Akef F. (2010) Studies on bioemulsifier production by *Bacillus licheniformis* PTCC 1595. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(3), 352-356.
- Dejoye T. C., Vian M. A., Ginies C., Elmaataoui M., Chemat F. (2012) Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, 17, 8196-8205.
- Desai J. D., Banat I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 61, No. 1, 47–64.
- Drelich J., Fang C., White C. L. (2002) Measurement of interfacial tension in fluid-fluid system. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Marcel Dekker, Inc. 3152-3166.
- Douglas A. (2006) Use of atomic force microscopy to study a molecular micelle as an anionic polymer for polyelectrolyte multilayer deposition on polymeric substrates. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College 6-7.
- Fracchia L., Cavallo M., Martinotti M. G., Banat I. M. (2012). Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials, *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), InTech, 325-369.
- Flores Y. L. A. (2009) Recuperación mejorada de petróleo (EOR) mediante inyección de nitrógeno en el noroeste peruano. Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ingeniería de Petróleo, Gas Natural y Petroquímica. p. 65.
- García G. M. (2012) Escalamiento de la producción de biosurfactante a nivel reactor y su eficiencia sobre la recuperación de aceite. Universidad Veracruzana. 74pp.

- Gogoi S. B. (2010) Characterization of vesicle for enhanced oil recovered. Indian Journal of Chemical Technology. Vol. 17, 282-290.
- Ghosh B.; Al Shalabi E. W. (2011) Solvent Induced Oil Viscosity Reduction and Its Effect on Waterflood Recovery Efficiency. Advances in Petroleum Exploration and Development. CSC Canada. Vol. 2, No. 2, 24-31.
- Guánchez D. A. M. (2005) Efecto de surfactantes iónicos y no-iónicos sobre las propiedades de emulsiones de crudo extrapesado en agua estabilizada con surfactantes naturales. Universidad Central de Venezuela. 66-81.
- Gudiña E. J., Pereira J. F.B.; Rodrigues L. R., Coutinho J. A. P., Teixeira J. A. (2012). Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. International Biodeterioration & Biodegradation, 68, 56-64.
- Guillén C., Urrestarazu M. (2012) Sustentable Use of the Wetting Agents in Protected Horticulture in Horticulture. Prof. Alejandro Isabel Luna Maldonado (Ed.), InTech, <http://www.intechopen.com/books/horticulture/use-of-the-humectant-agents-in-protectedhorticulture>, 145-160.
- Haegel F. H., Lopez J. C., Salager J. L., Engelskirchen S. (2009) Microemulsions in Large-Scale Applications in Microemulsions. Background, new concepts, applications, perspectives. Cosima Stubenrauch, A John Wiley and Sons, Ltd, Publication, 311.
- Hollingsworth R. G. (2005) Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects, Ecotoxicology. J. Econ. Entomol. 98(3): 772-779.
- Illias, R.M., Ooi S.W., Idris A.K., Rahman W.A.W.A. (1999) Production of biosurfactant and biopolymer from Malaysian oil fields isolated microorganisms. Society of Petroleum Engineers SPE 57315.
- James L. A. (2009) Mass Transfer Mechanisms during the Solvent Recovery of Heavy Oil. University of Waterloo. Canada. 10-18.
- Jacobs J. A., Ryder S. M. (2006) Biosolvent Flushing and High Vacuum Extraction of Heavy Waste Oil. Battelle Conference, Battelle Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds Meeting Proceedings, California. 1.

- Khopade A, Ren B, Liu XY, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. (2012) Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of Colloid and Interface Science* 367, 311-318.
- Kitamoto D., Isoda H., Nahahara T. (2002) Functions and potential applications of glycolipids biosurfactante from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* 49(3):187-201.
- Kristensen R. (2009). *Methods for Increasing Oil Recovery, PETRAD.*
- Kumar T., Bera A., Mandal A. (2012). *Physicochemical Properties of Microemulsions and their uses in Enhanced Oil Recovery.* *World Academy of Science, Engineering and Technology* 64. 1114-1119.
- Lemos B. J., Pastore G.M. (2007) Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:563-567.
- Leser M. E., Sagalowicz L., Michel M., Watzke H. J. (2006) Self-assembly of polar food lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 125–136.
- Li Q., Kang C., Wang H., Liu C., Zhang C. (2002) Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. *Biochemical Engineering. Journal* 11, 197–199.
- Lladró V., (2011) *La energía de la naranja. Las provincias.* 9.
- Louvado A, Santos A. L., Coelho F. S. S., Moreira A., Gomes F., Almeida A., Gomes, N. C. M.; Cunha Â. (2010). Isolation of Surfactant-Resistant Bacteria from the Surface Microlayer. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Biological Responses to Contaminants.* TERRAPUB, 89-95.
- McInerney M. J., Maudgalya S. K., Knapp R., Folmsbee M. (2004) Development of Biosurfactant-mediated oil recovery in Model Porous Systems and Computer Simulations of Biosurfactant-Mediated Oil Recovery. University of Oklahoma. Department of Petroleum Engineering and Department of Botany and Microbiology. 9-10.
- Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat, I.B. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1-5.
- Malik M. A. Hashim M. A., Nabi F., Al-Thabaitia S. A., Khan Z. (2011) Anti-corrosion ability of surfactants: A review. *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol. 6, No. 6, 1927-1948.

- Mandal A., Samanta A., Bera A., Ojha K. (2010) Characterization of oil-water emulsion and its use in enhanced oil recovery. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 12756-12761.
- Mandal A., Bera A. (2012) Surfactant Stabilized Nanoemulsion: Characterization and Application in Enhanced Oil Recovery. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 67, 21-26.
- Maqsood M. I., Jamal A. (2011) Factors affecting the rhamnolipid biosurfactant production. *Pak. J. Biotechnol.* Vol. 8 (1) 1-5.
- Marechal, Philippe, Mouloungui, Zephirin, Truong Dinh, Nguyen (2010) Poliesteres de policarbonato de glicerina y otros polimeros y copolimeros polihidroxiados. Francia. <http://patentados.com/patente/poliesteres-policarbonato-glicerina-otros-polimeros-copolimeros-polihidroxiados/>.
- Marfisi V. S. (2005) Estabilidad de emulsiones relacionada con el proceso de deshidratación de crudos. Universidad de los Andes, Venezuela. 7.
- Martínez G.X. (2011). Producción de biosurfactantes por microorganismos aislados de sitios extremos y contaminados con hidrocarburos. Instituto Politécnico Nacional. 112 pp.
- Matta G. B. (1985) D-Limonene based aqueous cleaning compositions. US 4511488 A
- Miñana M., Goncalves E. (2011) Aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de los surfactantes. Cuaderno FIRP S372-A. Versión # 1. Mérida- Venezuela. 10-11.
- Mishra M., Muthuprasanna P., Surya P. K., Sobhita R. P., Satish B. I.A., Sarath C. I., ArunaC. G., Shalini S. (2009) Basics and potential applications of surfactants - a review, *International Journal of PharmTech Research* 1:1354-1365
- Montiel L. V. (1985). Oxidación anódica de terpenos. Vol (I). Universidad de Alicante. 3.
- Monreal C. M. (2008) La utilización de los residuos agrícolas y otros desechos para la producción de bioenergía, biocombustibles y bioproductos. Nano- and Biotechnologies Laboratory, Canadá. 1-23.
- Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. (2000) A study on the structure function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:211-218.
- Moreno M. C. U., Bretón D. L. M., Ríos L. E., Barrera C. J., Rinderknecht S. N., Poggi V. H. M. (2011) Incremento de la solubilización de percloroetileno con un tensoactivo no iónico. *Interciencia*, Vol. 36, No. 3, 224-228.

- Mosayeb A., Abedini R. (2012) The effect of non-ionic surfactants on the interfacial tension between crude oil and water. *Petroleum & Coal* 54 (2) 110-113, 2012
- Muhammad K. A., Sakhawat S. S. (2008) Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of sodium dodecyl sulfate (SDS) and the effect of low concentration of pyrene on its CMC using ORING Software. *J. Chem. Soc. Pak.*, Vol. 30, No. 2, 186-191.
- Munroe N. D. H., Bravo M. C., Singh G. P. K. (2007) Advances in heavy oil recovery. %th Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology. México, 7B. 3-1 - 7B. 3-10.
- Nguyen T. T., Sabatini D. A. (2011) Characterization and Emulsification Properties of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants and Their Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1232-1244.
- Norman C., Trombetta J.C. (2007). El uso de surfactants en proyectos de recuperación terciaria . Tiorco, Notas Técnicas., p. 5.
- Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. (2001) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, 3ra Edición, Capítulo 104, 294.
- Paster M., Pellegrino J. L., Carole T. M. (2004) Industrial Bioproducts: Today and Tomorrow. 1-88.
- Pérez S. M., Sandoval M., Cortés C. A., García M. H., Sinisterra J. V., Gracia J. I., Hernaiz M. J. (2011) Solvents derived from glycerol modify classical regioselectivity in the enzymatic synthesis of disaccharides with *Biolacta* β -galactosidase. *Green Chem.*, 13, 2810-2817.
- Perfumo A., Rancich I., Banat I. M. (2008). Possibilities and Challenges for Biosurfactants Uses in Petroleum Industry. *Biosurfactants. Ramkrishna Sen.* 1-11.
- Qadir S. T., Haque T. A., Ahmed G. N., Mohamed E. Z. (2011) Comparison of Different Enhanced Oil Recovery Techniques for Better Oil Productivity. *International Journal of Applied Science and Technology.* Vol. 1 No. 5; 143-153.
- Raiger I. L. J., López N. I. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva.* Número 3, año 8, 145-209.

- Rangel Y. C. O., Ling H. H. W., Pessoa J. A., Costa T. L. (2005) Micellar solubilization of ibuprofen-influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*. Vol. 41 n. 237-246.
- Rashedi H., Yazdian F., Naghizadeh (2012) Microbial enhanced oil recovery in Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites. Laura Romero-Zerón (Ed). 71-88.
- Riojas G. H. H., Gortáres M. P., Mondaca F. I., Balderas C. J. J., Torres B. L. G. (2010a) Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-solvente en suelo contaminado con diésel. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 6 (2), 100-109.
- Riojas G. H. H., Torres B. L. G., Mondaca F. I., Balderas C. J. J., Gortáres M. P. (2010b) Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, vol. 9, núm. 3, diciembre, 120-145.
- Riojas G. H. H., Gortáres M. P., Mondaca F. I., Balderas C. J. J. (2011a) Aplicación de Tween 80 y D-limoneno en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. *Ide@s CONCYTEG*, 6 (7), 571-584.
- Riojas G. H. H., Gortáres M. P., Mondaca F. I., Balderas C. J. J. (2011b) Influencia de los surfactantes en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Facultad de ciencias básicas. Universidad militar nueva Granada*, Vol. 7, núm. 1, 94–115.
- Riojas G. H. H., Gortáres M. P., Mondaca F. I., Balderas C. J. J. (2011c) Sinergia en surfactantes para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *An. Quím.*, 107(3), 243–249.
- Roldán C. T., Martínez G. X., Zapata P. I., Castorena C. G., Reyes A. J., Mayol C. M., Olguín L. P. (2011): Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86: 384–389.
- Rolo L. I. Caço A. I., Queimada A. J., Marrucho I. M., Coutinho J. A. I. (2002) Surface Tension of Heptane, Decane, Hexadecane, Eicosane, and Some of Their Binary Mixtures. *J. Chem. Eng. Data*, 47, 1442-1445.

- Romero Z. L. (2012). Advances in enhanced oil recovery processes, Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.). InTech. 3-44.
- Rosen M. J., Wang H., Shen P., Zhu Y. (2005) Ultralow Interfacial Tension for Enhanced Oil Recovery at Very Low Surfactant Concentrations. *Langmuir*, 21, 3749-3756.
- Schramm L. L., Stasiuk E. N., Marangoni G. (2003). Surfactants and their applications in *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C*, 99, 3-48
- Sagar G. H., Arunagirinathan M. A., Bellare J. R. Self-assembled surfactant nano-structures important in drug delivery: a review. *Indian journal of experimental biology*. Vol. 45, 133-159.
- Salager J. L. (1999) *Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para Obtener las Propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. Cuaderno FIRP S747-B. Versión #2. Mérida-Venezuela*, 1-43.
- Salager J. L. (2002) *Surfactantes tipos y usos. Cuaderno FIRP S300-A. Versión #2. Mérida-Venezuela*, 1-53.
- Salager J. L. (2005) *Recuperación mejorada del petróleo. Universidad de los Andes. Venezuela. Cuaderno FIRP S357-C*, 1-34.
- Salager J. L., Forgiarini A., Márquez L., Tolosa L., Vejar F. (2009) Microemulsiones para la recuperación mejorada de crudo y la limpieza de pozos. *Revista Ciencia e Ingeniería*. Vol. 30, No. 1, 79-92.
- Salehizadeh H., Mohammadizad S. (2009) Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. *Iranian Journal of Biotechnology*, Vol. 7, No. 4, 216-223.
- Sen R. (2008). *Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. Progress in Energy and Combustion Science* 34:714-724.
- Singh V. (2012) Biosurfactant – Isolation, production, purification & significance. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 2, Issue 7, 1-4.
- Singer M. E., Finnerty W. R., Bolden P., King A. D. (1983) Characterization of a biosurfactante effective in heavy oil viscosity reduction. Vol. (28) 3. 1.

- Soudmand-asli A., Shahab A. S., Mohabatkar H., Zareie M., Farzad S. S. (2007) The in situ microbial enhanced oil recovery in fractured porous media. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 58, 161–172.
- Spernath A., Yaghmur A., Aserin A., Hoffman R. E., Garti N. (2002) Food-grade microemulsions based on nonionic emulsifiers: media to enhance lycopene solubilization. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (23), 6917–6922.
- Sun H., Bei X., Lu F., Lu Y., Wu Y., Lu Z. (2009). Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Can. J. Microbiol.* 55: 1003-1006.
- Sustersick C. J. (2004) Síntesis y caracterización de un surfactante tipo gemelo. Instituto Politécnico Nacional. 4-11.
- Sunayana S. (2010) Wetting of PTFE Surface by Mixed Surfactant Solutions in the Presence of Electrolyte. National Institute of Technology, India, 1-4.
- Suthar H., Hingurao K., Desai A., Nerukar A. (2008) Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. *Journal of Microbiological Methods.* 75:225-230.
- Tan J. L., Sun J., He Z. G. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: Strategy for Improving Oral Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Current Drug Therapy*, 2007, 2, 85-93.
- Thimmanagari M., McDonald I., Todd J. (2010) Introduction to bioproducts. Factsheet. ORDER NO. 10-013W. Ministry of agriculture, food and rural affairs. 1-5.
- Tyowua A. T., Yiase, S. G., Wuanna R. A. (2012) Manipulation of concentration-conductivity data of sodium dodecyl sulfhate and sodium dodecylbenzene sulphonate in KCl solution in relation to micellisation parameters. *Chemical sciences journal.* Vol. 2012: CSJ-7, 1-9.
- Wan S. W. R., Kwon P. S., Soo L. E. (2012) Potential of Polysorbate20 Surfactant for Enhanced Oil Recovery. *The Open Petroleum Engineering Journal*, 5, 63-68.
- Wan S. W. R., Soo L. E. (2012) Simulation of surfactant based enhanced oil recovery. *The Open Petroleum Engineering Journal*, 5, 78-87.

Zwenger S., Basu C. (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials.
Biotechnology and Molecular Biology Reviews Vol. 3 (1), pp. 001-007.

13. ANEXOS

A.1 Medio mineral para la producción de BS

Tabla A.1. Medio mineral para la producción de biosurfactante

Componente	Fórmula	Cantidad para 1L
Peptona		4.0 g
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	13.6 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	17.4 g
Sulfato de amonio	$(NH_4)_2 SO_4$	1.0 g
Aceite de soya		10 mL