



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

**PROFESOR PATROCINANTE:
DR. CLAUDIO BRAVO LINARES
INSTITUTO DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:
DR. EDUARDO QUIROZ REYES
INSTITUTO DE CIENCIAS QUÍMICAS**

“DISTRIBUCIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE α -PINENO EN EL SANTUARIO DE LA NATURALEZA “CARLOS ANWANDTER”, VALDIVIA, REGIÓN DE LOS RÍOS”.

**Tesis de Grado presentada
como parte de los requisitos
para optar al Título de Biólogo
Marino.**

XIMENA PAOLA PALMA LARREA

VALDIVIA –CHILE

2012

“Están los que llevan amuletos. Los que hacen promesas. Los que imploran mirando al cielo. Los que creen en supersticiones. Y están los que siguen corriendo cuando les tiemblan las piernas. Los que siguen jugando cuando se les acaba el aire. Los que siguen luchando cuando todo parece perdido. Como si cada vez fuera la última. Convencidos de que la vida misma es un desafío. Sufren, pero no se quejan, porque saben que el dolor pasa. El sudor se seca. El cansancio termina. Pero hay algo que nunca desaparecerá: la satisfacción de haberlo logrado. En sus cuerpos hay la misma cantidad de músculos. En sus venas corre la misma sangre. Lo que los hace diferentes es su espíritu. La determinación de alcanzar la cima. Una cima a la que no se llega superando a los demás, sino a uno mismo.”

Daisaku Ikeda

Esta tesis está dedicada a mi hija Florencia,
a mis padres Manuela y Hernán
y a mi maestro de vida
Daisaku Ikeda

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle las gracias al Dr. Claudio Bravo, por su apoyo como guía en este trabajo. Quiero agradecer además a mi padre, el Profesor Hernán Palma Fleming por ser además de un guía fundamental para el desarrollo de mi carrera, un importante maestro de la vida, ya que sus enseñanzas no sólo comprendieron el área profesional, sino también a aquellos relacionados con actitudes frente a la vida y las personas, los cuales ayudaron a que pudiera enfrentar mis problemas desde un punto de vista más amplio y seguro. Quiero agradecer además, a los Dr. Eduardo Quiroz, quien mostro siempre una gran disposición a ayudar. Quiero agradecer a Dr. Jorge Toro por su disponibilidad y comprensión. Deseo agradecer en forma especial a mi madre, por su grandeza, optimismo y por ser ejemplo de vida para mi desarrollo como ser humano. Quiero agradecer a mi pequeña hija Florencia, quien se ha manifestado para ser la luz que guíe mi camino por la vida, por ser mi alegría máxima, y por entregarme su amor incondicional. Agradezco a mis hermanos Claudio, Mariela, Andrés y Sebastián por su incondicional apoyo y cariño. Quiero darle las gracias a mis compañeros de carrera, en especial a mi amiga Vania por sus palabras, su sinceridad y por ser siempre un apoyo, a mis amigas Andrea, Karina, Marcela por los hermosos recuerdos. Quiero agradecer además a todos los miembros de la Soka Gakai Internacional de Valdivia, en especial a María José (Jo), por su tiempo y su ayuda en este momento tan importante.

Esta tesis fue financiada por el Proyecto (S-200807/DID-UACH)

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCION.....	3
1.1.-Hipotesis del trabajo.....	12
1.2.-Objetivo General.....	12
1.3.-Objetivos Específicos.....	13
2. MATERIAL Y METODO.....	14
2.1.- Área de estudio.....	14
2.2.- Selección de las estaciones de muestreo.....	14
2.3.- Toma de muestras.....	15
2.4.- Materiales.....	15
2.4.1.- Materiales y Reactivos.....	15
2.4.2.- Otros materiales.....	16
2.5.- Limpieza de material.....	17
2.6.-Metodología analítica.-.....	17
2.6.1.- Método de extracción.....	20
2.6.2.- Cromatografía de gases acoplada a Detector de Masas (GC-MS).....	212
2.6.3.- Condiciones de operación del análisis cromatográfico.....	22
2.6.4. Análisis estadístico de datos.....	23
3. RESULTADOS	23

3.1.- Población de muestras y datos utilizados.....	23
3.2.- Análisis cromatográfico.	24
3.3.- Análisis cuantitativo.....	25
3.3.1. Análisis temporal.	25
3.3.2. Análisis intersitio.....	30
3.4.- Análisis estadístico de datos.	32
3.4.1. Análisis temporal.	32
3.4.2. Análisis intersitio.....	32
4. DISCUSIÓN.....	33
5. CONCLUSIONES.....	44
6. BIBLIOGRAFIA	46
7. ANEXOS	53
7.1. Figuras	53
7.2. Tablas.....	55

RESUMEN

En el presente trabajo se determinaron las concentraciones de α -pineno en muestras de sedimentos correspondientes a quince estaciones localizadas en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" de Valdivia durante los años 2008 y 2009. Se realizó, además, un estudio comparativo con datos obtenidos en trabajos previos que se remontan al período 2004-2006. Los resultados indican que las concentraciones de α -pineno se mantienen en niveles relativamente constantes entre las estaciones de muestreo entre 2008 y 2009 con un rango entre 26 ngg^{-1} y 525 ngg^{-1} . Al comparar los niveles de concentración entre los años 2004 y 2009 se puede apreciar un abrupto decaimiento de este compuesto, en donde las mayores concentraciones por estación de muestreo se registraron en diciembre de 2004 (concentración máxima 5.576 ngg^{-1}) con tendencia a decrecer a niveles de concentración de línea base ($50\text{-}150 \text{ ngg}^{-1}$) en el período 2008-2009. En relación a las distribuciones espaciales 2008 y 2009, las mayores concentraciones ocurrieron en Nanihue 5 (528 ngg^{-1}) y Nanihue 4 (472 ngg^{-1}) para 2008, Cudico 3 (406 ngg^{-1}) y Sta. María (292 ngg^{-1}) para 2009. Al tener un registro más amplio de datos, que abarca el período en estudio, se puede inferir como conclusión relevante que α -pineno sigue un patrón de comportamiento, en relación a su variación espacio-temporal, concordante con el evento de destrucción de *Egeria densa* (Luchecillo) y disminución del cisne de cuello negro, ocurrido en abril de 2004, la que posiblemente está ligada a alguna actividad de tipo antropogénica que afectó el santuario de la naturaleza Carlos Anwandter de Valdivia.

SUMMARY

α -Pinene concentration was determined in sediment samples collected from fifteen sites at the “Carlos Anwandter” Sanctuary of the Nature, a wetland located at Valdivia, South Central Chile during 2008 and 2009. In addition, a comparative study by using data collected from previous studies from the period 2004-2006 was afforded. Results showed that α -pinene concentrations stated at relatively constant levels among sampling sites during 2008 as compared to 2009, showing a variation between 26 ngg^{-1} and 525 ngg^{-1} . When comparing data collected from the period 2004-2009, an abrupt decay of α -pinene was observed, where the highest concentrations were registered during December 2004 (5.576 ngg^{-1}) and the lowest levels were registered during 2008-2009, showing a tendency to baseline levels ($50\text{-}150 \text{ ngg}^{-1}$). In relation to the spatial distributions of this compound for the period 2008 and 2009, the highest concentration were found in Nanihue 5 (528 ngg^{-1}) and Nanihue 4 (472 ngg^{-1}) for 2008, Cudico 3 (406 ngg^{-1}) and Sta. María (292 ngg^{-1}) for 2009. Having a more complete register of data collected between 2004 and 2009, it may be concluded that the abrupt decreasing trend of α -pinene in sediments of the “Carlos Anwandter” Sanctuary of the Nature is coincident with the event of destruction of *Egeria densa* (luchesillo) and the following decrease of the black neck swan population produced by some anthropogenic activity that affected the wetland.

1. INTRODUCCIÓN

Es de conocimiento general, hoy en día, que la actividad antropogénica es una de las principales causantes del ingreso de un sinnúmero de compuestos químicos a sustratos inorgánicos y orgánicos, que incluyen a organismos tanto animales como vegetales, sedimentos y atmósfera. Muchos de estos compuestos se transportan vía aérea, acuática o terrestre y pueden ejercer sobre los organismos efectos tóxicos agudos o bien crónicos, aún en cantidades de traza.

Una importante actividad industrial, dado su impacto en la sociedad, es la industria de la celulosa, que en Chile representa una de las actividades industriales de mayor crecimiento durante los últimos cincuenta años, sumando 11 plantas con procesos ya sea químicos o bien mecánicos (Corma, 2010). Esto ha conllevado también a un incremento excesivo de la superficie de suelos de bosques nativos a suelos con habilitación forestal. Actualmente en Chile los bosques cubren una superficie de 16 millones de hectáreas (21,5 % de la superficie territorial). De esta superficie, alrededor del 13,5 millones de hectáreas corresponden a bosque nativo (18,4 % del territorio nacional) y 2,7 millones de hectáreas corresponden a plantaciones forestales, equivalentes al 3,1 % del territorio nacional. La principal causal de cambio en uso de suelo entre 1998 y 2006 en la XIV Región de Los Ríos, corresponde a habilitación para plantación forestal, con un 31,7 %. Aproximadamente el 75% de ésta superficie de plantaciones corresponde a *Pinus radiata*, el 18 % a especies del género *Eucalyptus* y el resto a otras especies, tales como, tamarugo, pino oregón, álamo y algarrobo. Las plantaciones se encuentran localizadas principalmente entre las

Regiones V y X, y hasta el año 2001 en la X Región (incluida la actual XIV Región) las plantaciones de Eucalipto ocupaban 5.300 hectáreas (ha) mientras que las plantaciones de *Pinus radiata* alcanzaban 806 ha. Sin embargo, al 2008 en la X y XIV Regiones las plantaciones de Eucalipto alcanzaron a 6097 ha (15 % de aumento) y las de Pino radiata a 3.938 ha - 389% de aumento -(CONAF, 2007; INFOR 2008).

De la industria asociada a la actividad forestal, la celulosa se ha convertido en el principal producto de exportación. Actualmente, el uso de los cultivos forestales se descompone en 46% para la industria de la celulosa y papel, 46% para la industria de los aserraderos y remanufactura y 8% como combustibles. Para producir 1 tonelada de celulosa de fibra larga se requieren 5 a 6 metros cúbicos de *Pinus radiata* y para producir 1 tonelada de celulosa de fibra corta, se requieren 3 a 4 metros cúbicos de *Eucaliptus* (Corma, 2010).

Los efectos tóxicos de las emisiones de plantas de procesamiento de pulpa de celulosa sobre el medio ambiente están bien documentados en la literatura (McMaster *et al.*, 2003; Environment Canada, 2003). Las actividades de blanqueo de pulpa Kraft han producido importantes alteraciones sobre la vida acuática y terrestre, en donde los principales problemas medioambientales provienen de las emisiones a cuerpos de agua y aire, manejo de los desechos y consumo de energía. La composición química de las emisiones líquidas, aéreas y sólidas que se arrojan al medio ambiente es muy heterogénea e incluso varios compuestos aún no han sido identificados (McMaster *et al.*, 2003). Los monoterpenos son emitidos a la atmósfera en cantidades significativas desde la vegetación que se encuentra por sobre el nivel del suelo, los cuales pueden

alterar los procesos fotoquímicos atmosféricos, siendo la reacción con ozono la más importante forma de eliminación de los insaturados y determina de este modo su eventual disipación en la atmósfera (Monson and Holland, 2001; Ludley *et al.*, 2009). Los efluentes conllevan un sinnúmero de compuestos químicos provenientes de la materia prima o bien aditivos utilizados en el proceso de producción, que hacen que la emisión provoque en la biota del ecosistema acuoso efectos asociados con toxicidad crónica y aguda (Juuti *et al.* 1990; Sibley *et al.* 1997, 1998; Sibley *et al.* 1997, 1998; Lacorte *et al.*, 2003; Hynynen *et al.* 2004). Aún más, el volumen y la composición química de los residuos líquidos dependen del tipo de madera empleada (fibra corta o larga), así como de los procesos de pulpaje y blanqueo (Lacorte *et al.*, 2003). Además, existen estudios que señalan que derivados de hormonas vegetales (fitoesteroles) y productos de la degradación de componentes no-celulósicos de la madera, principalmente lignina, terpenos y ácidos resínicos presentes en efluentes de plantas productoras de pulpa Kraft generan diversos efectos tóxicos en la biota acuática (Munkittrick *et al.*, 1992, Oakes *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha informado que las emisiones aéreas de terpenos, especialmente de α -pineno y 3-careno, provenientes de plantas procesadoras de pulpa Kraft, generan una variedad de fotooxidantes fitotóxicos que han contribuido significativamente a una decadencia y disminución del bosque a distancias de aproximadamente 50 km de su fuente de emisión (Strömwal and Peterson, 1993). Se ha encontrado también que α -pineno y β -pineno, involucrados en emisiones líquidas de plantas de celulosa con tecnología Kraft, presentan una elevada toxicidad aguda hacia *Artemia salina* y por lo tanto no se puede soslayar su presencia en emisiones no controladas o poco eficientes por cuanto éstos pinenos están ligados estrechamente con el aceite de trementina (Tambosi *et al.*, 2006). La trementina es

tóxica, donde el mayor peso en toxicidad lo aportan sus principales constituyentes alfa- y β -pineno que constituyen cerca del 90% de la composición del aceite (NIOSH, 2005; Mercier *et al.*, 2009).

Tanto *Pinus radiata* así como *Eucalyptus globulus*, entre muchas otras especies arbóreas, contienen terpenos volátiles que se caracterizan por ser hidrocarburos cíclicos o de cadena abierta, lipofílicos, derivados de una unidad simple de cinco carbonos llamada Isopreno. Constituyen uno de los grupos de compuestos más ampliamente distribuidos en la naturaleza junto a los alcaloides y compuestos fenólicos. Los terpenos volátiles poseen una variedad de funciones como mediadores en interacciones antagónicas y de beneficio entre los organismos, tales como defensa de muchas especies de plantas, animales y microorganismos contra depredadores, patógenos y competidores (Gershenzon and Dudareva, 2007).

También se ha demostrado que los terpenos volátiles juegan un importante, aunque poco apreciado rol en respuestas al estrés abiótico, tales como aumento de la radiación lumínica, temperatura, sequía y condiciones oxidantes de la atmósfera, generando un estrés oxidativo en el que estos compuestos, entre otras especies químicas, mejoran la habilidad de la planta para mediar los cambios oxidativos internos sin importar la naturaleza del estresante (Vickers *et al.*, 2009) Los monoterpenos son compuestos de 10 átomos de carbono derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (Tingey *et al.*, 1991). Los monoterpenos constituyen la fracción principal de los aceites terpénicos o aceites esenciales que son guardados en los órganos secretores de las plantas como tricomas glandulares y conductos de resinas

(Croteau, 1987). α -Pino es un monoterpeno abundante en muchas especies arbóreas (Fig. 1 Anexo), prácticamente en toda la familia de las coníferas (pinaceae) (Banthorpe & Le Patourel, 1972) y en miembros de las familias: Lamiaceae/labiatae (romero, salvia, lavanda), Apiaceae (Apio, perejil, cilantro, zanahoria), Rutaceae (cítricos), Myrtaceae (Eucaliptos, Arrayán) (Kesselmeier & Staudt, 1999; Smith, 2000). Ahora bien, se ha informado en la literatura científica que α -pino, solo o en sinergia con otros pinos, tiene propiedades lipofílicas, bactericidas, plaguicidas, antioxidante, inmunoestimulante, antiinflamatoria, anticonvulsiva, antiestrés, sedativa, hipoglucémico y capaz de expeler los xenobióticos, además de ser un anticarcinógeno (citotóxico sobre células malignas) entre otras propiedades, cuando es utilizado en pequeñas cantidades controladas que no constituyen riesgo (Mercier *et al.*, 2009).

El Santuario Carlos Anwandter, como parte del sistema estuarino de Valdivia (XIV Región, W 73° 18', S 39° 49'), ocupa una interfase entre la cuenca terrestre río arriba del Río Cruces y sus afluentes (Ríos Nanihue, Cudico Pichoy, Cayumapu y San Ramón) y el sistema estuarino y marino del Océano Pacífico. El sitio cubre 4.877 ha., y está localizado inmediatamente al norte de la ciudad de Valdivia, XIV Región de Chile (39°41'S 73°11'W) (Fig. 2). El Santuario fue designado bajo la Convención Ramsar sobre Humedales a partir de su acceso el 27 de Julio de 1981. La hidrología del humedal predetermina el ambiente físico-químico, específicamente en cuanto a la disponibilidad de oxígeno, ciclos de nutrientes, pH y toxicidad, y proporciona, además, un importante medio de transporte para sedimentos, nutrientes y material tóxico que puede producir modificaciones físico-químicas en el ecosistema. La dinámica del movimiento de las aguas también proporciona un medio de transporte para la

disipación de material biótico y abiótico tal como carbono orgánico disuelto, toxinas, sedimento y detritos (Di Marzio, 2005). En general, los estuarios representan ecosistemas acuáticos sensibles donde el principal efecto de las actividades antropogénicas es el incremento en la movilización de sedimentos, nutrientes y material particulado (Burban *et al.*, 1989).

El Santuario del Río Cruces Carlos Anwandter de Valdivia sufrió un notable daño ambiental entre abril y diciembre del año 2004. El desastre ambiental generó muerte y migración de los cisnes de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) (Fig. 1) y extinción masiva de su principal alimento luchecillo (*Egeria densa*) (Fig. 1), una planta acuática introducida, proveniente de Brasil. La investigación realizada en el humedal por la Universidad Austral de Chile permitió evacuar un informe que responsabiliza a la empresa CELCO-ARAUCO (UACH, 2005). En dicho informe se concluye que la principal razón por la cual se produjo dicho desastre es la toxicidad sobre el luchecillo por parte del hierro presente en los vertidos de la planta elaboradora de pulpa de celulosa Kraft, sin embargo, desde el punto de vista de relación causa-efecto, quedaron aún dudas respecto de la verdadera razón por la cual se extinguió repentinamente el luchecillo. Por otro lado, Mulsow y Grandjean (2006) en una controversial publicación (Harding *et al.*, 2007; Soto-Gamboa *et al.*, 2007) han propuesto que el sulfato en alta concentración fue el responsable de la desaparición de dicha planta acuática. Objetivamente, a medida que avanza el tiempo, desde el instante que ocurrió el desastre, es cada vez más difícil establecer exactamente cual o cuales fueron los tóxicos que provocaron el problema ambiental y si éstos provenían o no de la planta CELCO-ARAUCO.

Un aspecto es establecer por qué *Egeria densa* se extinguió masivamente y por qué murieron ejemplares de cisnes de cuello negro y un gran número de éstos emigraron o mostraron comportamiento anormal en el Santuario del Río Cruces, y otro aspecto es demostrar objetivamente la responsabilidad de un emisor en un desastre ambiental, es decir el origen.

Egeria densa es un macrófito (ver Fig. 1) Estos macrófitos juegan un rol fundamental en los ecosistemas acuáticos, pues constituyen la base de la producción primaria, oxigenando y depurando el agua, manteniéndolas limpias y transparentes, y además proporcionan un sustrato ideal para los animales ligados a estos medios, tales como anfibios, aves, insectos y peces.



Fig. 1. Cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*) y luchecillo (*Egeria densa*), su principal alimento.

Una importante técnica en forénsica ambiental para investigar el origen de un daño ambiental en ecosistemas acuáticos es el análisis de datos exploratorio “Exploratory Data Analysis” (EDA), mediante el cual se pueden identificar las descargas de huellas dactilares químicas típicas o bien de un trazador químico, asociados con una actividad industrial específica (Morrison, 2000). Dichos trazadores no necesariamente tienen que ser tóxicos, ya que lo importante es que puedan establecer una relación de causa-efecto de manera objetiva. Durante el año 2005, se realizó un EDA a muestras de sedimentos del Humedal del Río Cruces, habiéndose identificado α -pineno como un componente típico y reiterativo en la matriz orgánica, apareciendo, por lo tanto, como un potencial candidato a trazador químico de emisiones, ya sea naturales o bien antropogénicas, ligadas a especies arbóreas. Posteriormente se realizó un estudio más sistemático, incluyendo muestras correspondientes al año 2006 (Foitzick, 2008). El mismo EDA se aplicó a muestras de distintos órganos de peces muertos provenientes del desastre ocurrido en el Río Mataquito, Región del Maule, durante el año 2007, habiéndose encontrado α y β -pineno en concentraciones elevadas (Palma-Fleming, 2008, comunicación personal). En este caso, sin embargo, la responsabilidad fue reconocida por CELCO-ARAUCO. Paralelamente, en muestras de agua recolectadas en el período 2005-2006, se identificó eucaliptol, que podría constituir otro trazador químico, aunque menos estable desde el punto de vista de permanencia en dicha matriz. α -Pineno puede ser útil a fin de establecer el origen del impacto ambiental que se produjo durante abril de 2004 y el impacto que CELCO-ARAUCO podría continuar ejerciendo sobre el delicado ecosistema del Humedal del Río Cruces, por cuanto este compuesto químico ha sido reconocido como un componente estrechamente relacionado con las actividades de industrias de celulosa que emplean eucalipto y pino

como materia prima (Strömwall *et al.*, 1997). α -pineno no debiera detectarse en los residuos líquidos (RIL) ni tampoco en sedimentos en concentraciones por encima del nivel basal adyacentes a una planta de celulosa, por cuanto este compuesto constituye alrededor del 50-60% del aceite esencial el cual debiera ser recuperado en el proceso. Si este aceite no es recuperado eficientemente, o bien en las actividades de mantenimiento es evacuado con el RIL en formas accidental o intencional, entonces este compuesto debiera ser detectado en concentraciones suficientemente altas, por sobre valores de línea base, lo que permitiría inferir que el ecosistema podría estar siendo impactado, inclusive a distancias tan lejanas como 40 km del sitio de descarga (Lacorte *et al.*, 2003). Se espera por lo tanto encontrar α -pineno en muestras de sedimentos del Humedal del Río Cruces durante el período 2008-2009 en niveles relativamente constantes y cercanos al nivel basal encontrado en otros sitios lejanos de la zona de influencia de los efluentes de la industria CELCO-ARAUCO de Valdivia.

De acuerdo a lo anterior, no se descarta la posibilidad de que α -pineno pueda constituirse en un buen candidato a trazador químico y también que haya causado daño a *Egeria densa*, en conjunto con otros compuestos químicos que probablemente produjeron un efecto tóxico agudo multi-causal. Los sedimentos y la biota en general, son reservorios finales de muchos de estos contaminantes liberados a partir de dichas actividades. Es por ello que, utilizando principios básicos de la Forénsica Ambiental, la cual utiliza técnicas forenses para investigar temas ambientales de preocupación (Saber, 2005), tales como asociación de un compuesto químico (trazador) con alguna actividad productiva o bien manufacturera, (perfil químico o huella dactilar), modelos de degradación química y modelamiento del transporte (Taylor, 2004), surge el interés por

continuar evaluando la presencia de α -pineno como trazador químico de contaminación por actividades antropogénicas en el Santuario Carlos Anwandter de Valdivia.

1.1. HIPOTESIS DEL TRABAJO

Según, los antecedentes anteriormente señalados se postula como hipótesis que, de acuerdo a los elevados niveles y la tendencia a la disipación de la concentración de α -pineno en los sedimentos en el período 2004-2006, debieran encontrarse niveles de concentración de α -pineno relativamente menores en el periodo 2008-2009, siguiendo una tendencia a niveles de línea base.

1.2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio es determinar los niveles de concentración, distribución espacial y variación temporal del contenido de α -pineno en sedimentos de sitios seleccionados de acuerdo a los antecedentes previos del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" en el período 2008-2009, y comparar además dichos niveles y sus variaciones con los obtenidos en el periodo 2005-2006, incluyendo algunas estaciones de muestreo del 2004.

1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la concentración de α -pineno en muestras de sedimento del área de estudio en el período 2008-2009, mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MSD).
- Determinar la variabilidad temporal 2008-2009 de α -pineno en muestras de sedimento de quince estaciones.
- Determinar la variabilidad espacial (intersitio) en 2008 y 2009 de α -pineno en muestras de sedimento de quince estaciones.
- Comparar los niveles de concentración de α -pineno en todo el período 2004-2009 y sus tendencias en cada estación, y también con áreas estuariales circundantes correspondientes al año 2003 que pueden servir de control.

2. MATERIAL Y METODO

2.1.- Área de estudio.

El Santuario Carlos Anwandter es del tipo micromareal positivo; morfológicamente correspondería a una mezcla entre estuario de río y uno de planicie inundada que se formó luego del terremoto de mayo de 1960 que redujo la elevación del terreno aproximadamente dos metros; el origen del estuario sería neotectónico (Pino *et al.*, 1994). El sitio recibe una cantidad significativa de agua dulce del Río Cruces y sus afluentes, tales como los ríos Nanihue, Cudico, Pichoy, Cayumapu y San Ramón. El área de estudio abarca estaciones ubicadas en el Río Cruces y en dos de los principales afluentes del Río Cruces, el Río Nanihue y el Cudico, incluyéndose además, estaciones localizadas en otros sitios del Humedal y sistema estuarino conexo (Río Calle-Calle, Río Valdivia y área de la Bahía de Corral).

2.2.- Selección de las estaciones de muestreo.

En la zona investigada se eligieron 15 sitios de muestreo (Figura 2, Tabla 1). Estos sitios se eligieron de acuerdo a los antecedentes de estudios previos (CONAMA-UACH, 2005; Foitzick, 2008), los que estuvieron basados en las características hidrodinámicas de humedal con respecto a la acumulación de sedimento, considerando el Santuario Carlos Anwandter y sus afluentes.

2.3.- Toma de muestras.

La toma de muestras se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por el Método Técnico para Recolección, Almacenaje y Manipulación de Sedimentos para Análisis Químico y Toxicológico (EPA-823-B-01-002, Octubre 2001).

Las muestras fueron recolectadas por triplicado con un espesor de entre 10 a 15 cm. empleándose una draga de Eckman, luego se envasaron en bolsas plásticas, con la respectiva rotulación, posteriormente se trasladaron al laboratorio desde el sitio de muestreo en una caja aislante térmica. Una vez en el laboratorio, se realizó un análisis de humedad para cada muestra con el fin de determinar su peso seco. Luego se envolvieron en papel aluminio y se rotularon debidamente e inmediatamente se guardaron en un congelador (-15° C) para su posterior análisis.

2.4.- Materiales.

2.4.1.- Materiales y Reactivos.

Se utilizó material para el almacenamiento de las muestras, entre ellos frascos ámbar (100 mL, 5 mL.), papel aluminio, bolsas plásticas, congelador.

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de alta pureza: hexano (Merck, Suprasolv), acetona (Merck. Licrosolv), sulfato de sodio (Merck, GRA) y nitrógeno gaseoso de alta pureza (AGA).

Estándares analíticos certificados: α -Pino (Fluka, calidad GC) y mentol (Aldrich, calidad GC) como estándar interno.

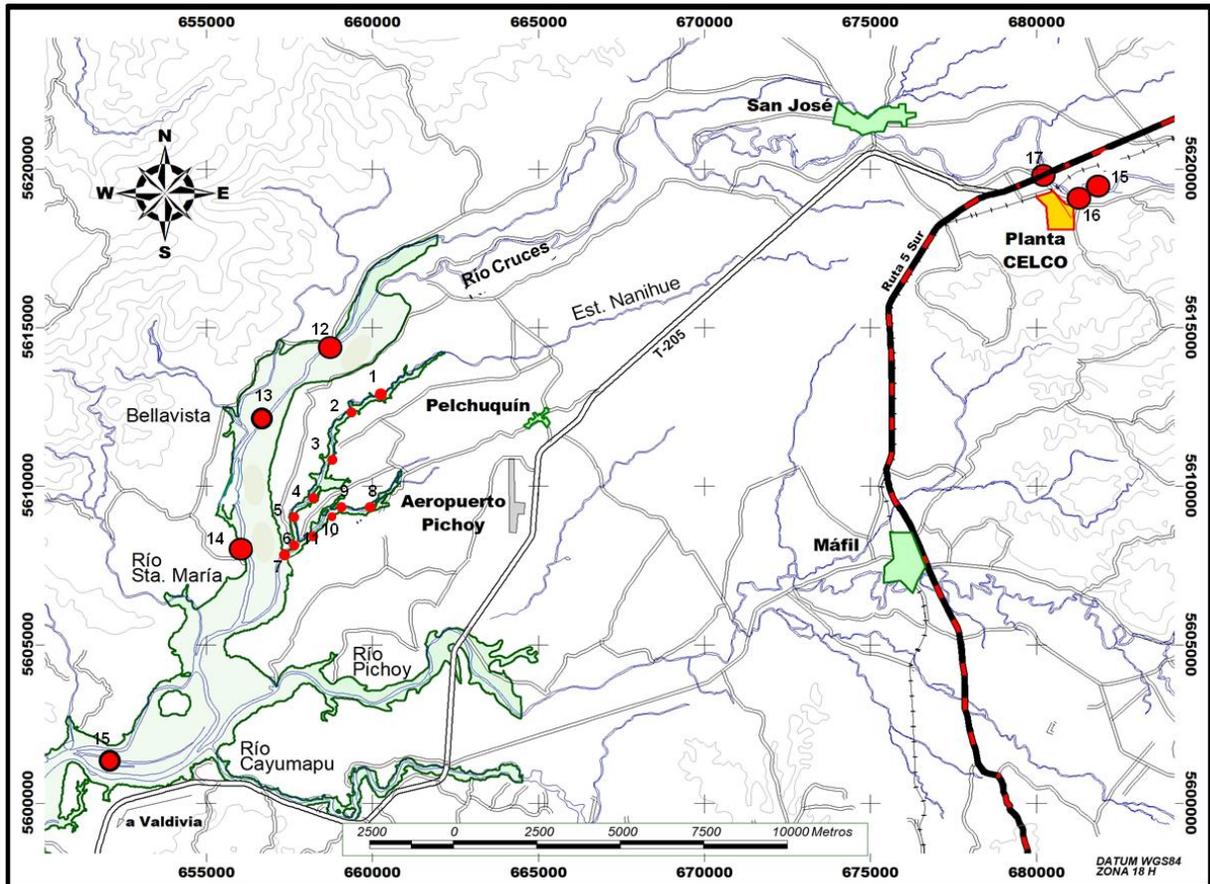


Figura 2: Ubicación del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter en el río Cruces.

2.4.2.- Otros materiales

- Vasos de precipitado
- Pipetas Pasteur
- Balones de fondo redondo (250 mL)
- Embudos de filtración gravitatoria
- Agitador mecánico

- Rotavapor (Büchi)
- Estufa de secado con aire forzado
- Micropipeta de volumen variable (10-100 μL y 100-1000 μL)

2.5.- Limpieza de material.

Los materiales de vidrio, porcelana y metal, utilizados en los análisis, fueron sometidos a procedimientos de operación estándar de limpieza con el fin de eliminar impurezas que pudieran interferir el resultado de los análisis. El material se lavó con abundante agua y detergente para limpieza de material de vidrio (Extran), luego se enjuagó con agua destilada y se colocó en una estufa a 120° C por dos horas. Todos los frascos y material sometido a limpieza en estufa se cubrieron con papel aluminio previamente sometido a limpieza con acetona y hexano. Antes de usar todos los materiales fueron enjuagados con hexano.

2.6.- Metodología analítica.

Aproximadamente 7 a 10 g de muestras húmedas, pesadas a las milésima de gramo, se secaron en mortero de porcelana con aproximadamente 30 g de sulfato de sodio anhidro (Merck). Luego se extrajeron por agitación constante mediante la metodología MSE (Extracción a Microescala) (U.S.EPA, 2000) con 50 mL de hexano por 4 horas en frascos de 100 mL con septa de Teflón. Después de la extracción cada muestra se filtró gravitatoriamente y el residuo sólido se lavó tres veces con 50 mL de hexano (Merck) cada vez. El extracto hexánico (200 mL aprox.) se concentró por corriente de nitrógeno con flujo suave para evitar coevaporación.

Para realizar la cuantificación de α -pineno se utilizó mentol como estándar interno, un alcohol monoterpénico estable e inerte para este propósito ($\log K_{ow}$ de 3,3) (Fig. 2 Anexo). Para preparar las soluciones estándares de diferentes niveles de concentración de α -pineno, se preparó una disolución stock-1 de $2.535 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para ello se midieron $300 \mu\text{L}$ del estándar analítico con micropipeta Eppendorf y se diluyó a 100 mL en hexano. Ya que el estándar viene a una concentración de $98,5 \%$ p/p con una densidad de $0,858 \text{ g/mL}$, los $300 \mu\text{L}$ medidos corresponden a $257,4 \text{ mg}$ de disolución, que contiene $253,5 \text{ mg}$ de α -pineno.

Con esta solución stock-1 se preparó la solución stock-2 y las soluciones estándares para utilizar en la curva de calibración, con un volumen final de 1 mL . A cada una de estas soluciones estándares se le adicionó $100 \mu\text{L}$ de solución de estándar interno de concentración $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (300 ng) antes de completar el volumen final. Para la preparación de las soluciones estándares de α - pineno a diferentes niveles de concentración se tomaron los siguientes volúmenes de las soluciones que se indican:

Solución stock-2: 2.535 ng mL^{-1} ($100 \mu\text{L}$ de solución stock-1 diluido en 100 mL)

Solución Pine 005: 1.268 ng mL^{-1} ($5,0 \text{ mL}$ de solución stock-2 diluido a 10 mL)

Solución Pine 004: 634 ng mL^{-1} ($5,0 \text{ mL}$ de solución Pine 005 diluido a 10 mL)

Solución Pine 003: 317 ng mL^{-1} ($5,0 \text{ mL}$ de solución Pine 004 diluido a 10 mL)

Solución Pine 002: 159 ng mL^{-1} ($5,0 \text{ mL}$ de solución Pine 003 diluido a 10 mL)

Solución Pine 001: 40 ng mL^{-1} ($2,5 \text{ mL}$ de solución Pine 002 diluido a 10 mL)

Para realizar la curva de calibración se inyectaron cada una de las soluciones en el cromatógrafo de gas acoplado a un detector de masas, obteniéndose los datos presentados en la en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de concentración, áreas del estándar α -pineno y áreas del estándar interno mentol obtenidas a partir del análisis GC-MS.

Área del Estándar	Área del Estándar Interno	Conc. del Estándar	Proporción de Áreas (STD/ISTD)
178447	507381	40	0,352
386206	489951	159	0,788
715340	504681	317	1,417
1590240	615127	634	2,585
3557733	741257	1268	4,799

La Figura 3 muestra la curva de calibración obtenida con los 5 niveles de concentración.

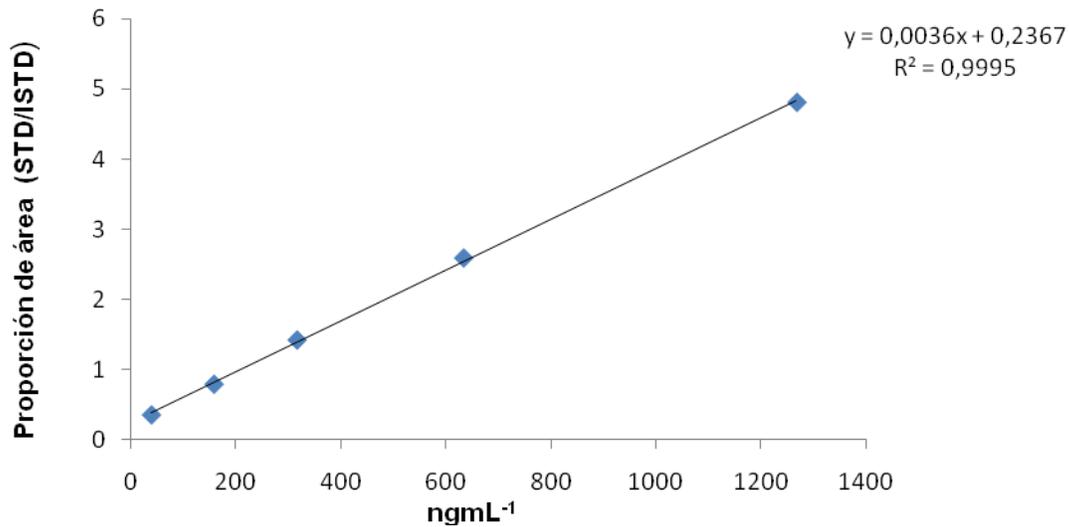


Fig. 3. Curva de calibración del estándar α -pineno.

2.6.1.- Método de extracción.

El diagrama de flujo del protocolo analítico se muestra en la Fig. 4. Se pesaron entre 7 y 10 g. de muestra húmeda de sedimento a la exactitud de una milésima de gramo y se colocaron en un mortero. Luego, con el propósito de secar cada muestra se agregó sulfato de sodio anhidro en una proporción 3:1 respecto del peso de dichas muestras, mezclando hasta homogeneizar completamente. La mezcla se trasvasió cuantitativamente a un frasco ámbar de 100 mL con tapa de rosca y septa de Teflón, agregándose hexano hasta cubrir todo el sólido (50 mL aproximadamente).

La extracción se realizó mediante un agitador mecánico orbital durante 4 horas. Posteriormente las muestras fueron filtradas en embudos gravitatorios con lana de vidrio y sulfato de sodio anhidro, recibiendo el filtrado en un balón de fondo redondo de 250 mL. Los frascos de extracción así como el residuo sólido se lavaron tres veces con 50 mL de hexano. El filtrado así como las soluciones de lavado se juntaron para hacer volumen final que fue reducido por rota-evaporación a presión reducida a aproximadamente 1 a 2 mL. Este volumen se trasladó cuantitativamente con pipeta Pasteur a un frasco ámbar con septa de Teflón de 4 mL, enjuagando tres veces el balón con pequeñas fracciones de hexano. Al volumen contenido en el frasco ámbar se le agregó 100 μ L de estándar interno (300 ng de mentol). Luego, se le agregaron láminas de cobre en láminas pequeñas a fin de eliminar trazas de azufre proveniente de las muestras que puedan interferir en el análisis cromatográfico. Por último, se concentró el volumen de muestra contenido en el frasco ámbar hasta \sim 1 mL con un

suave flujo de nitrógeno gaseoso ultra puro, quedando el extracto listo para ser analizado por GC-MS.

Además de las muestras, se prepararon blancos analíticos siguiendo la misma pauta de las muestras, conteniendo solamente arena blanca grado analítico. A fin de determinar la validación de los resultados se empleó el método de adición de estándar tanto en muestras reales así como en blancos analíticos. El porcentaje de recuperación osciló entre 75 y 110 %.

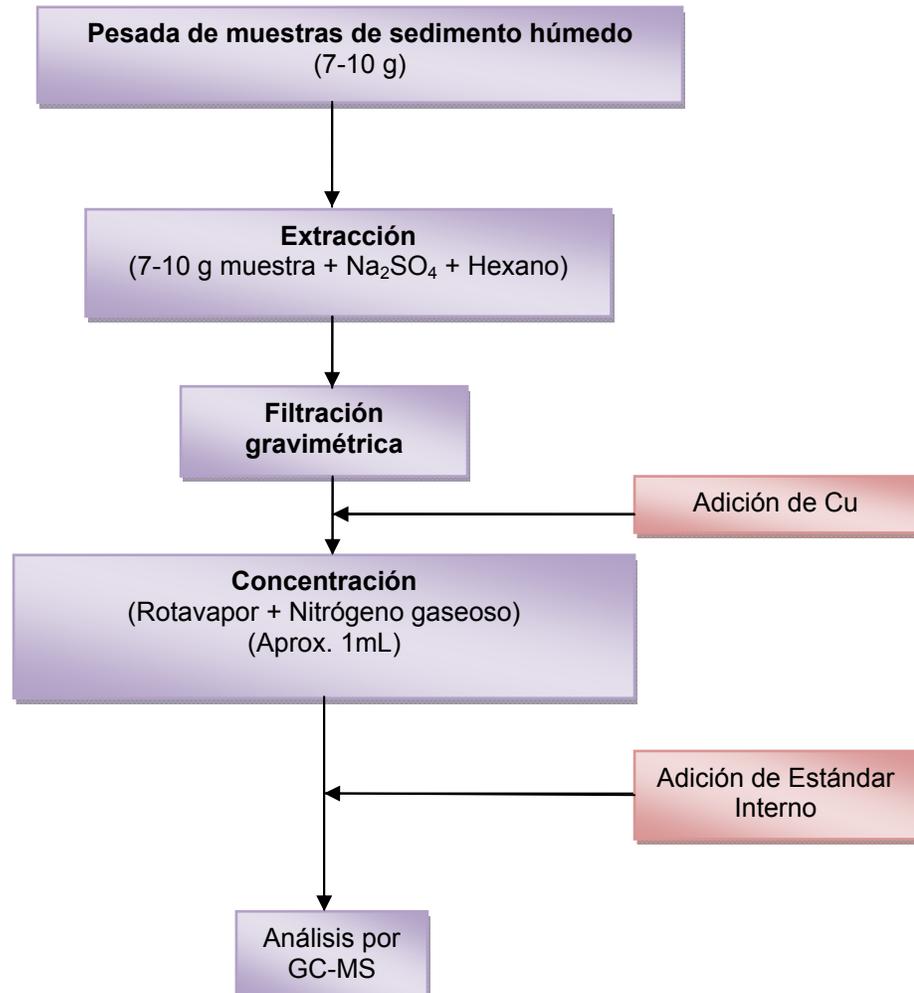


Fig. 4. Diagrama de flujo del protocolo analítico de α -pineno por GC-MS.

2.6.2.- Cromatografía de Gases acoplada a Detector de Masas (GC-MS)

El α -Pino se analizó mediante un cromatógrafo de gases modelo Focus acoplado a un detector de masas DSQ II, ambos marca Thermo® con inyector split/splitless y manejado con el software XCalibur y una biblioteca NIST de espectros de masas de compuestos orgánicos. Se empleó una columna capilar RTx®-5MS (Crossbond® 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de película.

2.6.3.- Condiciones de operación del análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó con rampa de temperatura, comenzando a 70° C por 4 minutos y luego hasta una temperatura final de 300°C a una razón de 10°C min^{-1} . La temperatura del inyector fue 250°C. El tiempo total de la corrida cromatográfica fue de 30 minutos. Se utilizó Helio 6.0 (99,9999 % de pureza) con una presión de salida de 8,30 psi y velocidad de flujo de 1.2 mL min^{-1} . El volumen de inyección fue de 1 μL en modo "sandwich". Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: modo de ionización por impacto electrónico a 70 eV, temperatura de la fuente de iones a 200°C, línea de transferencia a 250°C, rango de masas 50- 650 m/z en modo de barrido total (SCAN).

La identificación de α -pino se realizó por comparación del tiempo de retención del estándar certificado y contrastación de su espectro de masas con el de la base espectral NIST del equipo, mientras que la cuantificación se hizo empleando la curva

de calibración de 5 niveles de concentración más el estándar interno, descrita anteriormente.

. 2.6.4. Análisis estadístico de datos.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Sigma Plot 11.0, realizándose una comparación temporal. Se aplicó el Test de Kruskal-Wallis para Análisis de Varianza de una cola sobre rangos, puesto que las varianzas no fueron homogéneas, aplicándose también el test de Tukey para comparaciones múltiples

3. RESULTADOS

3.1.- Población de muestras y datos utilizados.

En este estudio se utilizaron los datos de muestras recolectadas en los años 2008 y 2009, incluyéndose, además, los resultados de muestras analizadas correspondientes al año 2004, realizadas por el Laboratorio de Química Orgánica Ambiental de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, así como muestras de los años 2005 y 2006 analizadas por Foitzick (2008). Sin embargo, los datos correspondientes al año 2007, con excepción de algunas muestras no contempladas en el set de puntos de muestreo de este estudio y que alcanzaron a analizarse, están ausentes debido a la pérdida de las muestras en el incendio ocurrido a la Facultad de Ciencias en diciembre de ese mismo año. En todas las muestras se detectó α -pineno.

3.2.- Análisis cromatográfico.

Un cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) típico, en modo scan, que muestra la presencia de α -pineno a tiempo de retención (TR) 3,59 min y el estándar interno a TR 8,58 min se puede observar en la Fig. 5.

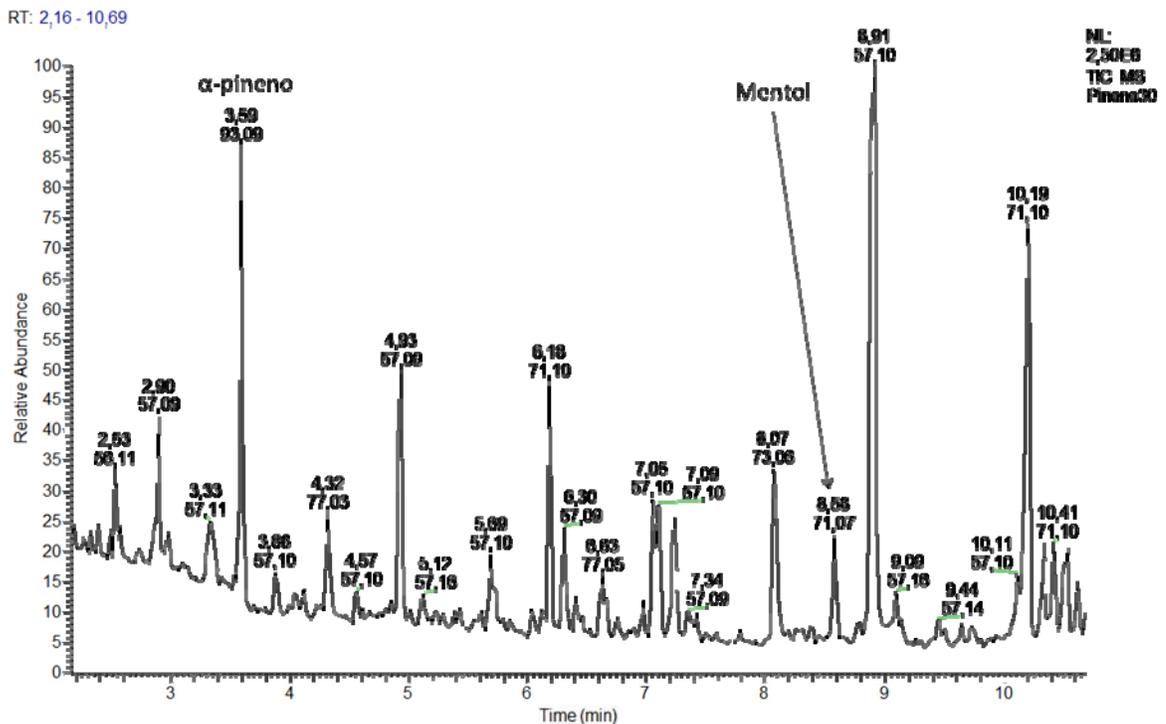


Figura 5. Cromatograma de Corriente Iónica Total (TIC) del extracto en hexano de la muestra correspondiente a la estación Nanihue 5 del año 2008. TR de α -pineno a 3,59 min y mentol a TR 8,58 min.

3.3.- Análisis cuantitativo.

3.3.1. Análisis temporal.

Los resultados de los análisis realizados en años anteriores a este estudio y los correspondientes a las muestras de sedimento recolectadas en los años 2008 y 2009, para las estaciones seleccionadas, se encuentran en la Tabla 1. El balance de masa de α -pineno en peso seco, tomado en consideración la sumatoria de los niveles de las estaciones muestreadas como indicadores de carga neta, para el año 2008 es de 2.705 ngg^{-1} y de 2.621 ngg^{-1} para el año 2009, respectivamente.

Tabla 1. Concentración de α -pineno (ngg^{-1} p.s.) en sedimentos correspondientes a las 15 estaciones seleccionadas de los años 2008 y 2009, incluyendo además los datos de los años 2004 a 2006 de estudios anteriores. Los datos corresponden al promedio ($n=3$) de las réplicas de campo analizadas.

Campañas	Estaciones de Muestreo															Total
	Cud 1	Cud 2	Cud 3	Cud 4	Nan 1	Nan 2	Nan 3	Nan4	Nan5	Nan 6	Conflu.	Fuerte Sn. Luis	Salida Bañados	Bajo Rialejo	Sta María	
23.12.04	480	61	-	-	5.576	162	-	-	-	4.560	-	713	-	-	693	12.245
28.11.05	308	153	175	119	684	214	103	1.021	261	2.715	1.433	87	-	403	230	8.214
16.06.06	446	196	37	112	381	57	197	915	375	1.236	111	-	-	-	-	-
17.11.06	119	131	50	96	214	149	257	95	89	159	149	367	212	442	157	2.686
10.12.08	192	68	31	72	214	165	87	472	528	310	238	26	96	115	89	2.705
02.09.09	167	213	406	77	203	80	59	57	269	115	243	72	223	144	292	2.621

En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran las gráficas de barra correspondientes a los niveles de concentración de α -pineno para cada estación y sus campañas. En algunas estaciones, las campañas incluyen años 2004 y 2005. Ya que las mayores concentraciones del compuesto en estudio se registraron en el tributario Nanihue se

puso mayor atención a esta área, a fin de pesquisar su posible origen. Puede que llame la atención la ausencia de datos para el año 2007, sin embargo es necesario aclarar que, producto del incendio ocurrido a la Facultad de Ciencias en diciembre de 2007, las muestras se destruyeron, excepto la muestra correspondiente a la estación Cudico-1, que alcanzó a ser procesada y analizada, dejando por lo tanto, una discontinuidad en el seguimiento de la variabilidad espacio-temporal contemplada inicialmente en este trabajo de largo plazo.

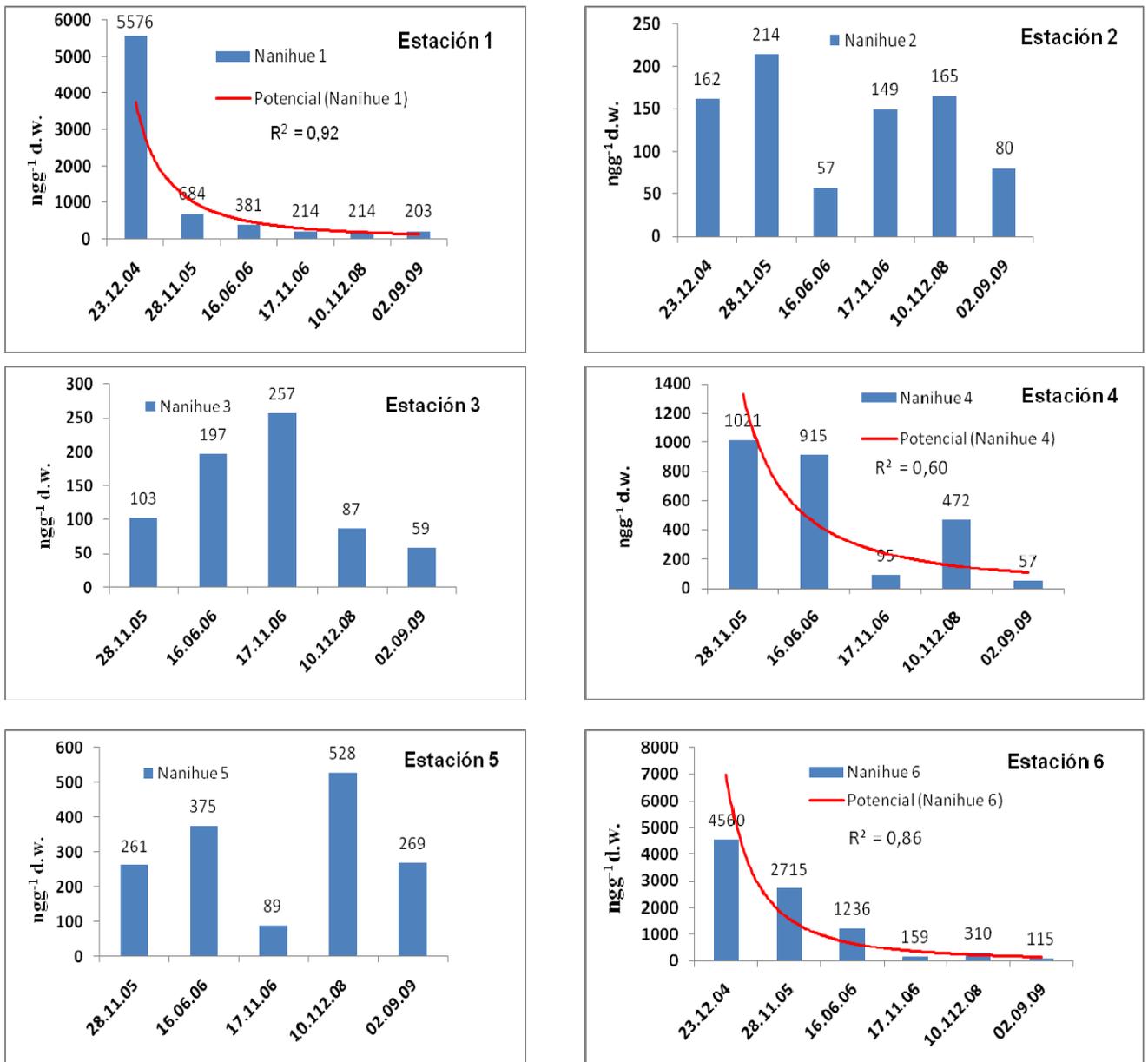


Fig. 6. Distribución temporal de α -pineno en sedimentos del Tributario Nanihue ubicado en el Humedal del Río Cruces entre los años 2004 y 2009.

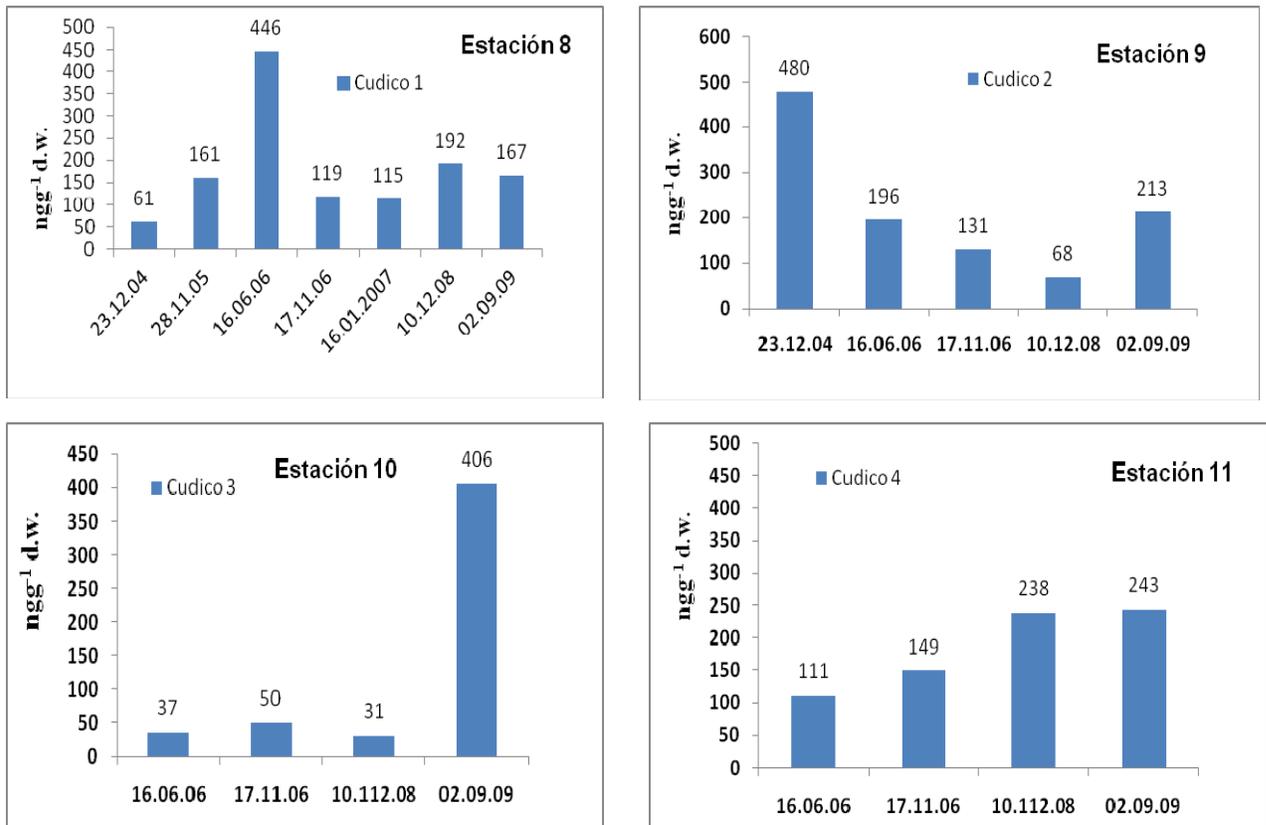


Fig. 7. Distribución temporal de α -pineno en sedimentos del Tributario Cudico ubicado en el Humedal del Río Cruces entre los años 2004 y 2009.

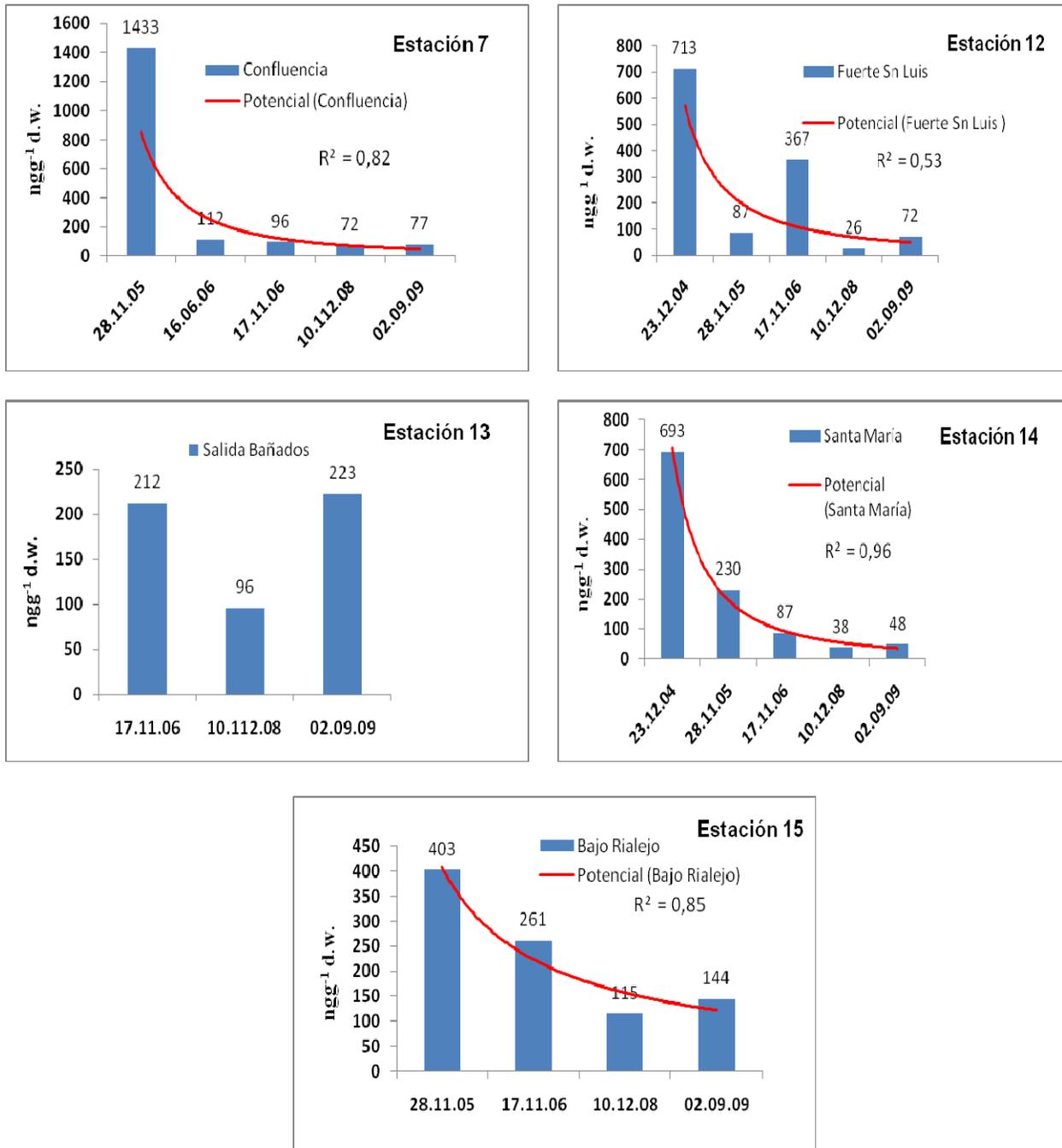


Fig. 8. Distribución temporal de α -pineno en sedimentos del Humedal del Río Cruces entre los años 2004 y 2009.

3.3.2. Análisis intersitio.

En la Figura 9 se observa la distribución de α -pineno por sitio para los años 2008 y 2009. Se encontró que los niveles de concentración de α -pineno son significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre las estaciones de muestreo correspondientes tanto para el año 2008 como para 2009 (Tabla 1). Se observa que la estación Nanihue 5 presenta la más alta concentración, con un valor de 528 ng/g, mientras que la estación Fuerte San Luis de Alba presenta la más baja concentración con 26 ng/g durante 2008. Respecto del año 2009, en la estación Cudico 3 se observa la concentración más alta, con 406 ng/g, sin embargo en la estación Nanihue 3 se observa la concentración más baja, con 59 ng/g. El balance de masa del total de α -pineno, en base sólo a las estaciones consideradas en este estudio para el 2008 es de 2.705 ng/g y de 2.621 ng/g para 2009.

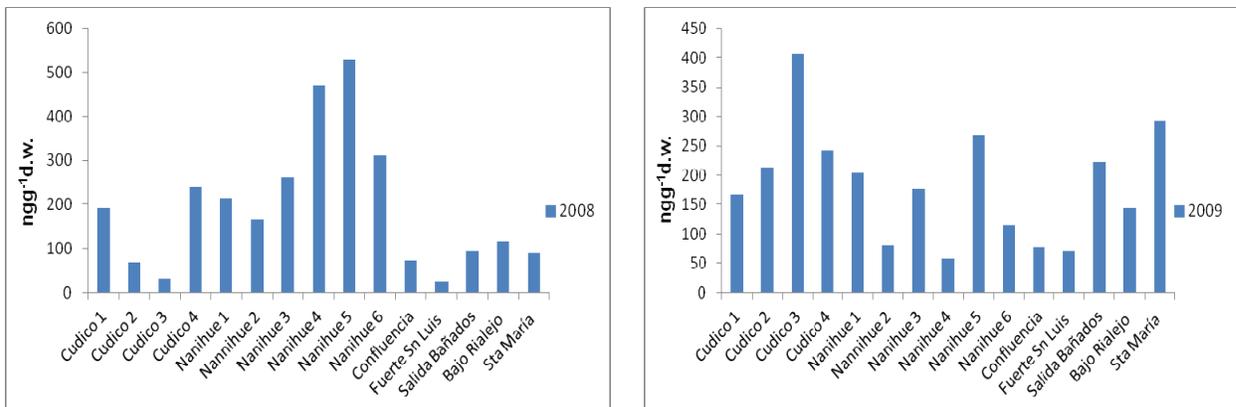


Fig. 9. Distribución espacial de α -pineno en el Humedal del Río Cruces años 2008 y 2009.

En la Figura 10 se presentan los resultados de las distribuciones espaciales de α -pineno por año, desde 2004 a 2009. Como hay estaciones que en aquel entonces no fueron muestreadas, debido principalmente a la estrategia utilizada y que estuvo basada en establecer hipótesis previas que definieron los objetivos y metodología de muestreo, fue necesario completar cada estación con datos faltantes asumiendo hipotéticamente valores promedios de las estaciones anteriores e inmediatamente posteriores, a fin de tener una aproximación que permitiese comparar las distribuciones por año.

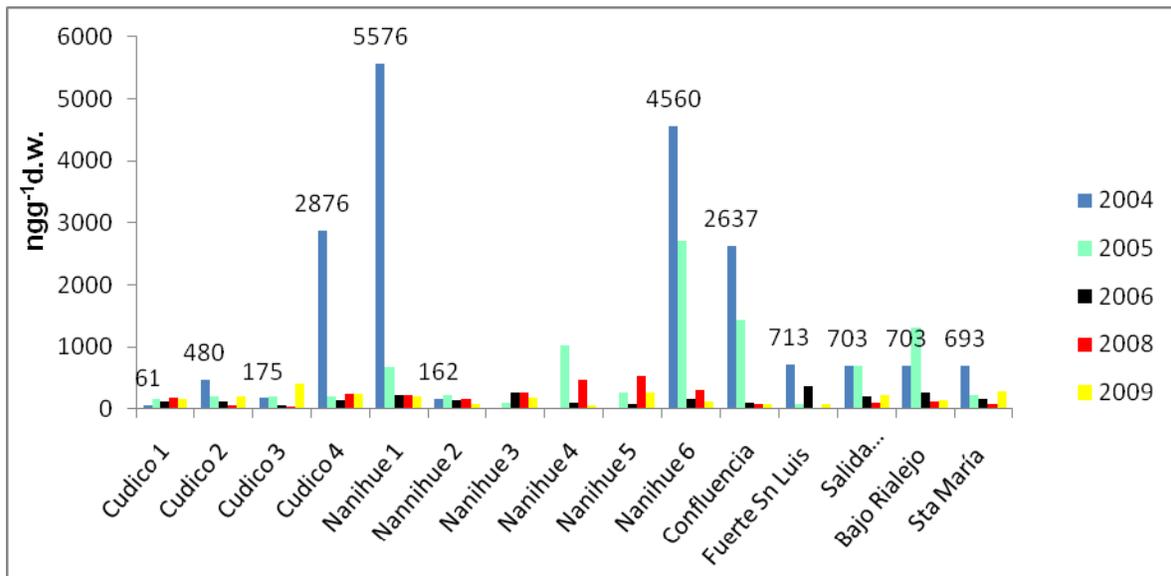


Fig. 10. Distribución espacial (intersitio) de α -pineno en el Humedal del Río Cruces para los años 2004 a 2009. Los valores indicados en el gráfico corresponden a los obtenidos en el año 2004.

En este estudio se incluyeron también los resultados de muestras analizadas en trabajos anteriores, correspondientes a los años 2004, 2005 y 2006, para la mayoría de las estaciones consideradas en 2008 y 2009. En la Tabla 2 (Anexo) se encuentran los

resultados de estaciones diferentes a las consideradas en el presente trabajo, pero que resultan de especial relevancia para el análisis global, ya que sirven como estaciones de control, sobre todo aquellas que corresponden al año 2005, y que se encuentran en puntos geográficos más alejados de la zona afectada por el desastre ambiental ocurrido durante 2004 en el Humedal del Río Cruces (Fig. 3). Entre ellas están las estaciones Punta Castillito (22 ng/g), Carboneros (58 ng/g), Bahía Corral (frente a la cancha de acopio de astillas o chips) (149 ng/g) y Cabo Blanco (18 ng/g), esta última dentro del Humedal del Río Cruces.

3.4.- Análisis estadístico.

3.4.1. Análisis temporal.

Los resultados del análisis Kruskal-Wallis para datos no paramétricos indica que las diferencias de los niveles de concentración de α -pineno entre los años 2008 y 2009 no son significativas ($p > 0,05$) para un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, aplicando el test de Tukey para comparaciones múltiples de todas las campañas (2004 a 2009), se encuentra que los niveles de concentración de α -pineno medido en las estaciones del año 2004 y 2005 son significativamente diferentes ($p < 0,05$), con un nivel de confianza de 95%, que las de 2006, 2008 y 2009.

3.4.2. Análisis intersitio.

El análisis de Kruskal-Wallis de los niveles de concentración de α -pineno en los diferentes puntos de muestreo para las campañas realizadas, no arrojó diferencias

significativas, para un valor $p > 0,05$ con un nivel de confianza de 95%, excepto para las estaciones Nanihue 4, Nanihue 6 y Confluencia durante 2005 con un $p < 0,05$.

4. DISCUSION

De acuerdo a los objetivos planteados en este estudio, se midió el nivel de concentración de α -pineno en sedimentos de una zona específica del Humedal del Río Cruces y en algunos de sus afluentes. La elección de las estaciones se hizo de acuerdo a lo datos históricos obtenidos inicialmente a través de un Análisis de Datos Exploratorio (EDA) realizado sobre muestras recolectadas entre diciembre del año 2004 y enero de 2005, después del desastre ambiental, y que se utilizaron en el estudio realizado por la Universidad Austral de Chile en conjunto con la Comisión Nacional de Medio Ambiente (UACH-CONAMA, 2005).

Se encontró α -pineno en todas las muestras analizadas, las concentraciones en peso seco fluctúan entre 26 ngg^{-1} y 528 ngg^{-1} para los muestreos realizados en 2008 y 2009 (Figuras 5, 6 y 7). En general, se puede apreciar que los niveles de α -pineno se mantienen relativamente constantes entre estos dos años, con variaciones observadas en algunas estaciones. Así, para el año 2009 las estaciones Cudico 2 y Cudico 3, presentan un aumento respecto del año 2008 de 68 ngg^{-1} a 213 ngg^{-1} y de 31 ngg^{-1} a 406 ngg^{-1} respectivamente (Fig.5). Contrariamente, el Estero Nanihue, que confluye junto con el Cudico, compartiendo una sola desembocadura sobre el Humedal propiamente tal, presenta una disminución de los niveles del compuesto en todas las estaciones, excepto la estación Nanihue 1 y Confluencia, siendo esta última una

estación compartida entre ambos tributarios. La disminución de la concentración de α -pineno en estas estaciones es de alrededor del 50% entre 2008 y 2009 (ver Fig.6).

Haciendo un análisis intersitio para el muestreo de 2008 en el tributario Cudico (Fig. 5) se observa una variación notable, con valores de concentración más altos en los extremos del estero, es decir Cudico 1 (Estación 8, con 192 ngg^{-1}) y Cudico 4 (Estación 11, con 238 ngg^{-1}), mientras que las estaciones que están más al centro y cercanas entre sí, Cudico 2 y 3 poseen valores más bajos (Estación 9, con 68 ngg^{-1} y Estación 10, con 31 ngg^{-1}). Durante el año 2009, sin embargo, el comportamiento cambia ostensiblemente, en donde se mantienen relativamente constantes los niveles de concentración en las estaciones Cudico 1, 2 y 4 (167 ngg^{-1} , 213 ngg^{-1} y 243 ngg^{-1} , respectivamente), pero la estación Cudico 3 presenta la mayor concentración (406 ngg^{-1}). Esta distribución pudiera deberse a una dinámica de transporte producida por los regímenes de marea en un sitio de aguas relativamente más someras que las que circundan en torno al Río Cruces. En relación al tributario Nanihue, se observa algo similar (Fig. 7), aunque menos marcado como en el Cudico, las estaciones Nanihue 2 y 3 presentan niveles de concentración más bajos (165 ngg^{-1} y 87 ngg^{-1} , respectivamente) que las estaciones Nanihue 1, 4, 5 y 6 (214 ngg^{-1} , 472 ngg^{-1} , 528 ngg^{-1} y 310 ngg^{-1}) y esto es particularmente más notorio durante el año 2009. Los datos de las muestras tomadas en otras estaciones como Fuerte San Luis, Salida Bañados, Santa María y Bajo Rialejo (Fig. 8), ubicadas en la zona del curso del Río Cruces, muestran niveles de concentración de α -pineno relativamente bajos entre las estaciones tanto para el año 2008 así como el 2009, con valores que van desde 26 ngg^{-1} a 144 ngg^{-1} . Sin embargo, en las mediciones realizadas en muestras del año

2005 en la estación Cabo Blanco, ubicada en otro sector más lejano de la zona de la cabeza del humedal, se encontraron concentraciones muy bajas (18 ngg^{-1}), mientras que en otras estaciones cercanas a la costa de Valdivia se encontraron concentraciones algo mayores (Tabla 3 Anexo). En general, el análisis espacial muestra un descenso en las concentraciones de α -pineno hacia sectores menos influidos por las corrientes del Río Cruces.

En relación a la variación de los niveles de α -pineno, considerando el lapso de tiempo entre 2004 y 2009, se puede observar que, a pesar de que algunas estaciones parecen mostrar un comportamiento fluctuante y errático, hay otras que muestran una clara tendencia a la disminución, con niveles de concentración comparativamente altos en los sedimentos coleccionados en diciembre de 2004. Así, la estación Nanihue 1 concurre desde una concentración de 5576 ngg^{-1} en 2004 a un nivel relativamente estable y menor de alrededor de 200 ngg^{-1} en 2009. Lo mismo sucede con la estación Nanihue 4 (de 1.021 ngg^{-1} a 57 ngg^{-1}), Nanihue 6 (de 4560 ngg^{-1} a 115 ngg^{-1}), Confluencia (de 1.433 ngg^{-1} a 77 ngg^{-1}), Santa María (de 693 ngg^{-1} a 48 ngg^{-1}), Fuerte San Luis (de 713 ngg^{-1} a 72 ngg^{-1}) y finalmente, en menor extensión Bajo Rialejo (de 403 ngg^{-1} a 144 ngg^{-1}). De estas siete estaciones, tres están ubicadas en el Tributario Nanihue (Nanihue 1, 4 y 6) y una en la intersección del Cudico y Nanihue (Confluencia), más específicamente en la desembocadura al Humedal (ver Fig. 1).

Llama la atención que las mayores concentraciones encontradas en los sedimentos de las estaciones estudiadas correspondan al Estero Nanihue. Lamentablemente no se cuenta con datos del 2004 para todas las estaciones, sin

embargo, observando los datos de las estaciones ubicadas en el curso del Río Cruces, dentro del Humedal, tal como Fuerte San Luis, Santa María, Salida Bañados y Bajo Rialejo, se puede decir que el Estero Nanihue presenta una fuerte depresión en los niveles de concentración de α -pineno comparativamente con los del Humedal. Si se comparan los niveles de concentración total, considerando todas las estaciones, excepto algunas del año 2004 (12.245 ngg^{-1}), se observa la misma tendencia de disminución a niveles relativamente constantes a partir de 2006 (aproximadamente 2.600 ngg^{-1}). Este comportamiento de disminución de α -pineno, producido probablemente por degradación química más que por dispersión física revela claramente la presencia de un evento generador de una elevada carga producida durante el año 2004 y que coincide con el deterioro ambiental ocurrido ese mismo año en el Humedal, que ocasionó la desaparición de *Egeria densa*, así como la migración y muerte de cisnes de cuello negro.

Ahora bien, no existen en la literatura datos relativos a concentración de α -pineno en sedimentos estuariales, fluviales o bien marinos. Button y Jüttner (1989) informan niveles de concentración de terpenos en aguas marinas de Alaska del orden de $0,1 \text{ } \mu\text{M}$ ($13,6 \text{ microgramo L}^{-1}$), en donde α -pineno y β -pineno tienen el mayor peso en el aporte a la concentración total de terpenos, habiendo encontrado que el origen de estos compuestos es esencialmente terrestre. Aunque se ha informado que existen terpenos de origen marino, específicamente de algas marinas, no se han encontrado monoterpenos volátiles, tales como α -pineno o β -pineno en estas especies, pero sí se sabe que estos dos compuestos existen en cantidades relativamente notables en las coníferas (Gershenzon y Dudareva, 2007). De acuerdo a estos datos se puede inferir

que α -pineno, encontrado en los sedimentos del Humedal del Río Cruces, debiera tener un origen terrestre.

Por otro lado, en un estudio realizado por Rolon y Rocha (2011) se sugiere que la presencia de pinos influencia directa o indirectamente la estructura macrófita acuática, generando una reducción en su riqueza y cambios en la composición de especies en el humedales del Sudeste de Brasil, aparte de otras variables medioambientales, tales como demanda de oxígeno, conductividad, hidroperíodo, pH y potencial de oxido-reducción.

De acuerdo a los catastros de plantaciones de Eucalipto y Pino entregados por CONAF (2007) e INFOR (2008), en la X y XIV Regiones, ha habido un significativo aumento de las plantaciones de Pino (388 %) comparado con las de Eucalipto (15%) desde 2001 al 2008. Esto debiera significar un mayor impacto sobre el ambiente de parte de las emisiones aéreas de monoterpenos volátiles, especialmente α -pineno y β -pineno. No ha habido cambios en el uso de tierras ni reforestación de estas dos especies en las inmediaciones del Humedal del Río Cruces que pudieran hacer pensar que hubo un efecto directo de estos dos compuestos monoterpénicos sobre *Egeria densa*, tal como ha ocurrido en los humedales de Brasil (Rolon y Rocha, 2011). El aumento de plantaciones de Pino en la X y XIV Regiones se contradice con la fuerte depresión de α -pineno ocurrida desde 2004 a 2009 en el Humedal. Ahora bien, sólo se ha detectado α -pineno en los sedimentos del Humedal y eucaliptol (no cuantificado) en agua. α -Pineno tiene un factor de bioconcentración (BCF) de 1040 ($K_{ow} = 45.709$) y una constante de Ley de Henry (H_{pc}) de 13.590, sugiriendo que el potencial para

bioconcentración en organismos acuáticos es muy alta, sin embargo β -pineno, con un BCF de tan solo 320 ($K_{ow} = 26.302$) y una H_{pc} de 6826 (Copolovici y Niinemets, 2005, McDonald et al., 2002; TOXNET, 2011) podría explicar no solo su ausencia en sedimentos, sino también la de otros monoterpenos volátiles en casos de ingresos puntuales que hayan ocurrido históricamente en ecosistemas acuáticos, es decir, dada esta ventaja de mayor capacidad de acumulación de α -pineno en sustratos lipofílicos (por ejemplo sedimentos ricos en materia orgánica y organismos acuáticos), resulta ser un compuesto orgánico más útil para establecer un registro histórico como trazador que su isómero beta y otros monoterpenos volátiles. A esta diferencia en las propiedades físico-químicas de α -pineno, se debe agregar que las velocidades de emisiones foliares de vegetales generadores de monoterpenos volátiles dependen fuertemente de su partición entre las fases aire, agua y lípidos en las hojas, y en este sentido dicho compuesto tiene ventaja sobre los otros componentes volátiles relativas a los volúmenes de emisiones aéreas (Copolovici and Niinemets, 2005 y 2007). En este contexto hay suficiente fundamento, dada la dinámica de comportamiento de α -pineno, tanto en su origen foliar, así como en su destino final en los cuerpos acuosos, para sostener que debiera tener mayor tendencia en el tiempo a acumularse en los sedimentos, siempre y cuando su origen sea por emisiones aéreas y esté ocurriendo un significativo aumento en las plantaciones de especies arbóreas que contienen este compuesto volátil en áreas relativamente cercanas, dadas las características de mayor reactividad en la atmósfera como consecuencia de la presencia de un doble enlace endocíclico en su estructura respecto de β -pineno, que posee un doble enlace exocíclico (Chen y Griffin, 2005; Epstein and Donahue, 2010).

Se ha demostrado que α -pineno es un inhibidor del crecimiento y causa daño oxidativo en tejido de raíces y semillas de diversos vegetales terrestres. Se ha informado del efecto inhibitorio de α -pineno sobre la germinación, crecimiento de raíces primarias y respiración mitocondrial del maíz a concentraciones de 1,0 mM ($136 \mu\text{g mL}^{-1}$) sin embargo, el efecto inhibitorio es más marcado sobre semillas germinadas a concentraciones tan bajas como 100 μM ($13,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Abraham et al., 2000 y 2003; Singh et al., 2006). Específicamente no existen datos en la literatura respecto de los niveles de concentración y toxicidad de α -pineno presente en sedimentos sobre macrófitos presentes en humedales, sin embargo se sabe que α -pineno tiene una acción sinérgica cuando está presente en el medio ambiente en conjunto con otros xenobióticos (Mercier *et. al.*, 2009), de tal manera que la concentración a la cual este monoterpeno volátil pudiese ejercer una acción tóxica en ambientes acuáticos que hayan sido impactados por algún evento relacionado con vertidos industriales líquidos podría ser aún menor.

No se puede realizar una comparación de los resultados obtenidos en sedimentos en este estudio respecto de los niveles de α -pineno encontrados en agua, por ser dos matrices completamente diferentes, además no hay estudios científicos que describan la presencia de α -pineno en sedimentos. Existen, sin embargo, estudios donde se informa que las plantas de celulosa liberan a través de sus efluentes, una serie de compuestos orgánicos naturales y no naturales, generados por el proceso Kraft (Fig.11), tales como ácidos resínicos, fitoesteroles, ácidos grasos, terpenos, organoclorados y otros compuestos aún no caracterizados (Hewitt *et al.*, 2003) que

se pensó en un posible ducto clandestino o bien alguna otra actividad agroindustrial que estuviese conectada o hubiese utilizado el Nanihue como vía de evacuación de sus RILES. No en vano la COREMA de Los Lagos había impuesto una multa por infracción a la normativa ambiental durante el año 2005 a la empresa en cuestión, la cual fue anulada por la Corte de Apelaciones de Puerto Montt el 16 de septiembre de 2011. Se le imputó a la empresa, en aquella ocasión, de haber efectuado un vertido sobre el curso de un estero localizado en las cercanías de la empresa y que está conectado con el Río Cruces.

Aún, a pesar de que existan estaciones a las cuales no se determinó α -pineno en el Humedal del Río Cruces antes y durante 2004 y también en el 2005, es posible, utilizando principios básicos de forénsica ambiental, realizar una aproximación al establecimiento del origen del emisor. Si bien es cierto que los compuestos químicos en el medio ambiente pueden no retener su composición original, es decir la composición química puede variar con el tiempo por procesos tales como oxidación, reducción, biodegradación, volatilización y fotodegradación (Colombo *et al.*, 2005), no es menos cierto que algunos, dada su persistencia, pueden afortunadamente permanecer suficiente tiempo en un dado sustrato, como los sedimentos, para ser utilizados como un trazador químico que permita establecer el origen de una dada contaminación. En primer lugar su fortaleza radica en que la presencia de dicho trazador pueda estar conectada con una actividad industrial específica, sin embargo su debilidad puede ser que dicho compuesto químico sea producido o utilizado por varias fuentes posibles. Tal es el caso del evento de contaminación puntual producida por la planta de celulosa LICANTEL, ocurrida en el año 2007 en la Región del Maule, donde se observaron varias similitudes con lo ocurrido en el Santuario Carlos Anwandter en el

año 2004. El estudio, realizado por el Laboratorio de Química Orgánica Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, en hígado y branquias de peces que recibieron una descarga de contaminantes de los riles de la planta en el río Mataquito, permitió establecer que estos organismos fueron impactados por algún vertido con elevado contenido de α y β -pineno (ambos relacionados con licores de digestión de pulpa de actividades industriales de papeleras que procesan madera de pino y eucalipto). La responsabilidad de este evento de contaminación, en esta ocasión, fue reconocida por la empresa Celulosa Arauco ya que, según lo informado por la planta, se liberaron RILES de forma accidental, que contenían aceite de trementina al cuerpo del Río Mataquito (Palma-Fleming, información personal, 2011).

En segundo lugar, el modelo de distribución y comportamiento temporal pueden ser de gran utilidad para apuntar objetivamente hacia el origen, sobre todo cuando se trata de emisiones puntuales intencionales o bien accidentales. En este trabajo, particularmente por las características geomorfológicas del Río Cruces en el tramo comprendido entre la Planta CELCO y el Humedal, caracterizado preferencialmente por un sustrato del tipo grava, resulta imposible realizar un modelamiento de distribución espacial de α -pineno que permita sacar conclusiones respecto de la ubicación del origen del emisor. Sin embargo, el comportamiento temporal tiene un peso importante, tal como se ha discutido anteriormente.

En relación a la posible toxicidad, se desconoce el nivel de concentración de α -pineno en los sedimentos que podría haber ejercido un efecto nocivo sobre *Egeria densa*, a pesar de que se detectó un nivel de concentración de 457 ngg^{-1} en una única

muestra analizada proveniente del humedal en diciembre de 2005, y que se encontraba seriamente dañada. El efecto de toxicidad sólo puede ser determinado realizando ensayos de laboratorio.

α -Pineno y β -pineno son los principales constituyentes de los aceites esenciales de *Pinus radiata* (22% de α -pineno y 35% de β -pineno) y *Eucaliptus globulus* (20% de α -pineno y 0.5% de β -pineno) (Sacchetti *et al.*, 2005), sin embargo la composición de la terpentina-sulfato proveniente de la recuperación como subproducto del pulpaje químico de pinos en la industria de la celulosa contiene mayoritariamente 60-65% α -pineno y 25-35% de β -pineno, pero puede variar considerablemente de acuerdo a las especies de pino del cual es extraído (Thiel and Hendricks, 2004) y la temperatura en procesos que involucren la extracción de la terpentina, debido a la coevaporación parcial de los terpenos volátiles, tal como ha sido demostrado en la extracción de aceite de pino (Nero *et al.*, 2011) Podría ser que estos compuestos hayan ingresado a los cuerpos de agua a través de los efluentes de la planta celulosa existente río arriba del Santuario Carlos Anwandter en una situación de emisión de RILES no controlada, intencional o no intencional. Esta planta ocupa como materia prima una gran cantidad de *Pinus radiata* (2.240.000 m³/año aproximadamente) y eucaliptus (563.000 m³/año aproximadamente), por lo tanto podría haber dispuesto una carga importante de terpenos al agua a través de sus riles si no hubieron buenas prácticas del manejo de residuos. Si la descarga correspondió a RILES provenientes de *Eucaliptus globulus*, entonces esto también podría explicar la ausencia de β -pineno en el Humedal del Río Cruces, al contrario de lo que ocurrió en el Río Mataquito, en donde se encontró mayoritariamente este compuesto en las muestras de la biota analizadas.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, incluyendo los datos obtenidos en años anteriores, se puede concluir lo siguiente:

- Se detectó α -pineno en sedimentos de los tributarios Nanihue y Cudico y en sitios que siguen el curso del Río Cruces en el Santuario de la Naturaleza “Carlos Anwandter” tanto en 2008 así como en 2009.
- Las variaciones temporales 2008-2009 de los niveles de concentración obtenidos en los sedimentos de los sitios de muestreo seleccionados muestran una distribución relativamente homogénea, con tendencia a niveles de línea base.
- Las variaciones espaciales de α -pineno en 2008 y 2009 muestran que existe una distribución no homogénea que probablemente está predeterminada por la dinámica de transporte de los sedimentos en las muestras de los tributarios y del río Cruces analizadas.
- Las variaciones temporales de α -pineno muestran una clara disminución desde el año 2005 al 2009 y una fuerte depresión si se consideran algunas estaciones que incluyen datos del año 2004.
- El balance de masa del total de α -pineno desde el año 2004 al 2009 también muestra una ostensible declinación, que se contrapone con el aumento de superficie de reforestaciones de pino de la X y XIV Regiones, lo que permite inferir que α -pineno fue probablemente introducido como producto de algún

evento puntual de contaminación antropogénica en vez de un evento gradual y natural.

- Se acepta la hipótesis de que, de acuerdo a los elevados niveles y la tendencia a la disipación de la concentración de α -pineno en los sedimentos en el período 2004-2006, debieran encontrarse niveles de concentración de α -pineno, ya sea comparables o bien menores en el periodo 2008-2009, siguiendo una tendencia a niveles de línea base.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abraham D., Braguini W.L., Kelmer-Bracht A.M. and Ishii-Iwamoto E.L.** (2000). Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *J. Chem. Ecol.* 26: 611-624.
- Abraham D., Francischini A.C., Pergo E.M., Kelmer-Bracht A.M. and Ishii-Iwamoto E.L.** (2003). Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 985-991.
- Banthorpe, D.V., Le Patourel, G. N.** (1972). The Biosynthesis of (+)- α -pinene in Pinus Species. *Biochem. J.*, 130: 1055-1061.
- Burban, P., Lick, W., Lick, J.** (1989). The flocculation of fine-grained sediments in estuarine waters. *J. Geophys. Res.*, 94: 8323-8330.
- Button, D.K. and Jütner F.** (1989). Terpenes in alaskan waters: concentrations, sources, and the microbial kinetics used in their prediction. *Mar. Chem.* 26: 57-66.
- Chen, J., Griffin, R.** (2005). Modeling secondary organic aerosol formation from oxidation of α -pinene, β -pinene, and d-limonene. *Atmos. Environ.*, 39: 7731-7744.
- Coakley, J., Hodson, P.V., Van Heiningen, A., Cross, T.** (2001). MFO induction in fish by filtrates from chlorine dioxide bleaching of wood pulp. *Wat. Res.* 35:921-928.
- CONAF.** 2007. Corporación Nacional forestal, Recursos forestales, plantaciones, Chile. Disponible en www.Conaf.cl. Consultado el 10.11.2007.
- CONAMA-UACH.** 2005. Estudio sobre origen de mortalidades y disminución poblacional de aves acuáticas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter en la Provincia de Valdivia. Informe final. Dirección Regional Conama Xª Región de los Lagos-Universidad Austral de Chile.146pp.

- Copolovici, L.O. y Niinemets, Ü.** (2005). Temperature dependencies of Henry's law constants and octanol/water partition coefficients for key plant volatile monoterpenoids. *Chemosphere*, 61: 1390-1400.
- Copolovici, L.O. y Niinemets, Ü.** (2007). Salting-in and salting-out effects of ionic and neutral osmótica on limonene and linalool Henry's law constants and octanol/water partition coefficients. *Chemosphere*, 69: 621-629.
- Corma** (2010). Celulosa Chilena: A la Vanguardia a Nivel Mundial (año 10, nº 3). http://www.corma.cl/corma_info.
- Croteau, R.** (1987). Biosynthesis and catabolism of monoterpenoides. *Chem Rev.*, 87:929–954.
- Di Marzio, W.** (2005). Santuario Carlos Anwandter (Valdivia), Misión consultiva Ramsar, Chile. Pag.5.
- Epstein S. A. and Donahue, N.M.** (2010). Ozonolysis of cyclic alkenes as surrogates for biogenic terpenes: primary ozonide formation and decomposition. *J. Phys. Chem. A*, 114: 7509-7515.
- Environment Canada** (2003).. National Assessment of Pulp and Paper Environmental Effects Monitoring Data: A Report Synopsis. National Water Research Institute, Burlington, Ontario. NWRI Scientific Assessment Series No. 2. 28 pp.
- Foitzick, M.** (2008). "α-Pineno en el Humedal del Río Cruces". Tesis de grado. Escuela de Química y Farmacia, Universidad Austral de Chile.
- Gershenzon J. and Dudareva N.** (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3(7) : 408-414.

- Harding L., Pretorius J. and McGurk M.** (2007). Recent changes in the Rio Cruces: Comment on Mulsow and Grandjean (2006). *Ethics Sci. and Environ. Pol.* 2007: 1-3.
- Hewitt LM, Pryce AC, Parrott JL, Marlatt V, Wood C, Oakes K, Van der Kraak GJ.** (2003). Accumulation of ligands for aryl hydrocarbon and sex steroid receptors in fish exposed to treated effluent from a bleached sulfite/groundwood pulp and paper mill. *Environ. Tox. Chem.*, 22 (12): 2890-2897.
- Hynynen, J., Palomäki, A., Merläinen, J., Witick, A., Mántykoski, K.** (2004). Pollution history and recovery of a boreal lake exposed to a heavy bleached pulping effluent load. *J. of Paleolimnol.* 32: 351-374.
- INFOR** (2008). SUPERFICIE DE BOSQUES PLANTADOS POR ESPECIE Y REGIÓN http://www.infor.cl/archivos/series_estadisticas/recurso5.pdf.
- Juuti, S., Arey, J. and Atkinson, R** (1990) Monoterpene emission rate measurements from a Monterey Pine. *J. Geophys. Res-Atmosph.* 95(6): 7515-7519.
- Kesselmeier, J. and Staudt, M.** (1999) Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *J. Atmos Chem.*, 33: 23-88.
- Lacorte, S., Latorre, A., Barceló, D., Rigol, A., Malmqvist, A., Welander, T.** (2003). Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. *Trends in Anal. Chem.*, 22 (10): 725-737.
- Ludley, K.E., Jickells, S.M., Chamberlain, P.M., Whitaker, J. and Robinson, C.H.** (2009). *Soil Biol. and Biochem.*, 41: 1050-1059.
- McDonald, A.G., Dare, P.H., Gifford, J.S., Steward, D. and Riley, S.** (2002). Assessment of air emissions from industrial kiln drying of *Pinus radiata* wood. *Holz. Roh-Werkst.* 60:181-190.

- McMaster, M. E., Parrott, J. L. and Hewitt, L.M.**(2003). A Decade of Research on the Environmental Impacts of Pulp and Paper Mill Effluent in Canada (1992-2002). National Water Research Institute, Burlington, Ontario. NWRI Scientific Assessment Report Series, 4, 84.
- Mercier B., Prost, J. and Prost M.** (2009). The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *Int. J. of Occup. Med. and Environ. Health* 22(4):331-342.
- Monson, R. and Holland, E.** (2001). Biospheric trace gas fluxes and their control over tropospheric chemistry. *Annu. Rev. Ecol. and Syst.*, 32: 547-576.
- Morrison R. D.** (2000). Critical Review of Environmental Forensic Techniques: Part I. *Environ. Forensics* 1: 157-173.
- Mulsow S. and Grandjean M.** (2006). Incompatibility of sulphate compounds and soluble bicarbonate salts in the Rio Cruces waters: an answer to the disappearance of *Egeria densa* and black-necked swans in a RAMSAR sanctuary. *Ethics Sci. and Environ. Pol.* 2006: 5-11.
- Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., Dixon, D.G.** (1992). Changes in maturity, plasma sex steroids levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 1560-1569.
- Nero B.N., Reiboldt, A., Davis, W., Bedard, N. and Russel E.** (2011). *Eur. J. Wood Prod.* 69: 545-552.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health)**(2005). NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. NIOSH Publication No. 2005-149.

- Oakes, K. D., McMaster, M. E., Pryce, A. C., Munkittrick, K. R., Portt, C.B., Hewitt, L. M., MacLean, D. D., Van Der Kraak, G. J.** (2003). Oxidative Stress and Bioindicators of Reproductive Function in Pulp and Paper Mill Effluent Exposed White Sucker. *Toxicol. Sci.* 74, 51–65.
- Pino, M., Perillo, G.M., Santamarina, P.** (1994). Residual fluxes in cross section in the Valdivia River Estuary, Chile. *Estuary, Coast. Shelf Sci.*, 38: 491-505.
- Rolon, A.S. and Rocha, O.** (2011). Does pine occurrence influence the macrophyte assemblage in Southern Brazil ponds? *Hydrobiologia* 675: 157-165.
- Saber, D. L. (2005).** Applications of forensic chemistry to environmental work. *J. Ind. Microbiol. Biot.*,32 (11-12): 665-8.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice M. and Bruni, R.** (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91: 621-632.
- Sibley, P.K., Dixon, D.G., Barton, D.R.** (1998) Environmental Assessment of Benthic Impacts Associated with Pulp Mill Discharges. II. Distribution of Sediment EOX in Relation to Environmental Factors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 34(2):158-66.
- Sibley P.K., Legler J., Dixon D.G. and Barton D.R.** (1997). Environmental Health Assessment of the Benthic Habitat Adjacent to a Pulp Mill Discharge. I. Acute and Chronic Toxicity of Sediments. *Arch. Of Environ. Con. Tox.* 32: 274-284.
- Singh H.P., Batís D.R., Kaur S., Arora K. and Kohli R.** (2006). α -Pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots. *Ann. Bot-London* 98: 1261-1269.

- Smith, R.** (2000). Xylen monoterpenes of pines: distribution, variation, genetics, function. *Gen. Tech. Rep.* PSW-GTR-177. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture., 454.
- Soto-Gamboa M., Lagos N., Quiroz E., Jaramillo E., Nespolo R. and Casanova-Katny.** (2007). Causes of the disappearance of *Egeria densa* and black-necked swans in a RAMSAR sanctuary: comment on Mulsow and Grandjean (2006). *Ethics Sci. and Environ. Pol.* 2007: 7-10.
- Strömvall, A. M., Petersson, G.** (1993). Photooxidant-forming monoterpenes in air plumes from kraft pulp industries. *Environ. Pollut.*, 79,219-223.
- Tambosi J.L., Di Domenico M., Schirmer W.N., Jose H., and Moreira R.D.P.M.** 2006. Treatment of paper and pulp wastewater and removal of odorous compounds by a Fenton-like process at the pilot scale. *J. Chem.Tech. Biotech.* 81: 1426-1432.
- Taylor, D.** (2004). Environmental Forensic files, Innovative technologies. *Environ. health persp.*, 112 (2),88-89.
- Thiel, L. and Hendricks F.** (2004). Study into the establishment of an aroma and fragrance fine chemicals value chain in South Africa (Tender Number T79/07/03). Final Report. Part Two/four. Report: Aroma Chemicals Derived from Effluent from the Paper and Pulp Industry. Triumph Venture Capital Ltd. FRIDGE Ed. 2004.
- Tingey, D. T., Turner, D. P., Weber, J. A.** (1991). Factors controlling the emission of monoterpenes and other volatiles compounds. In: Sharkey, T. D., Holland, E. A. and Mooney, H. A. (ed.): Trace Gas Emission by Plants. Pp. 93-120. Academic Press, San Diego, CA.
- TOXNET.** <http://toxnet.nlm.nih.gov/>. Revisado 2011.

- UACH (Universidad Austral de Chile).** “Estudio sobre origen de mortalidades y disminucion poblacional de aves acuaticas en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, en la Provincia de Valdivia”. Convenio Complementario Especifico N° 1210-1203/2004-12-14. Direccion Regional Conama Xª Region de los Lagos - Universidad Austral de Chile (2005).
- U.S. EPA (2001).** Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analysis: Technical Manual. United States Environmental Protection Agency, EPA-823-B-01-002, October 2001.
- U.S. EPA (2002).** Microscale Extraction Method (MSE). United States Environmental Protection Agency, EPA-3570, November 2002.
- Vickers C. E., Gershenzon, J., Lerdau, M. and Loreto F. (2009).** A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature chemical Biology* 5(5): 283-291.

7. ANEXOS

7.1. Figuras

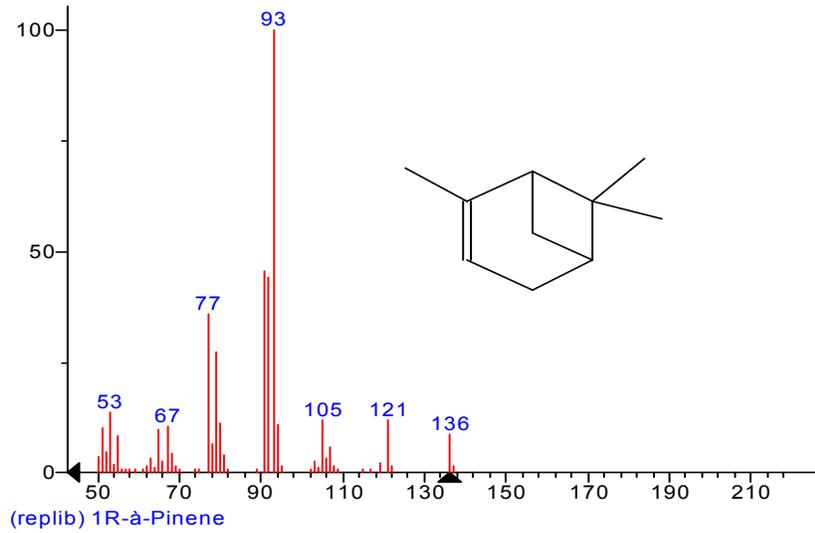


Figura 1.- Estructura y espectro de masas de α -pineno.

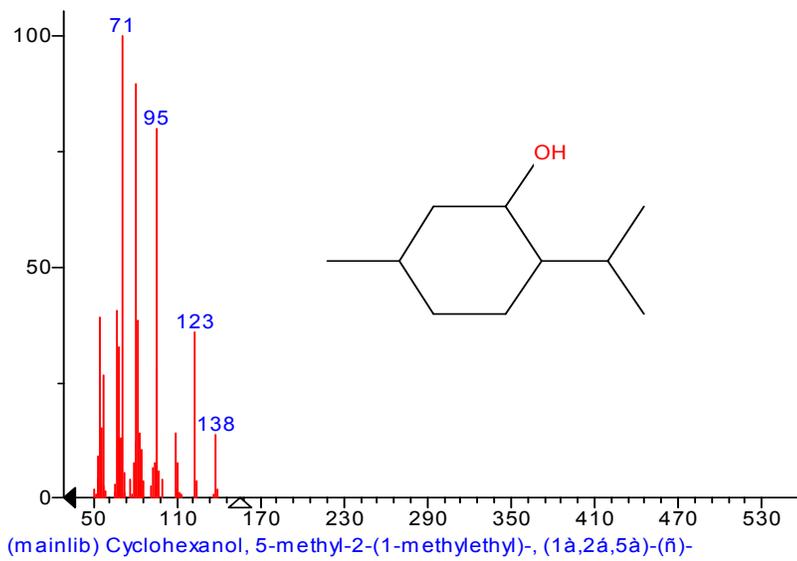


Figura 2.- Estructura y espectro de masas del estándar interno mentol.

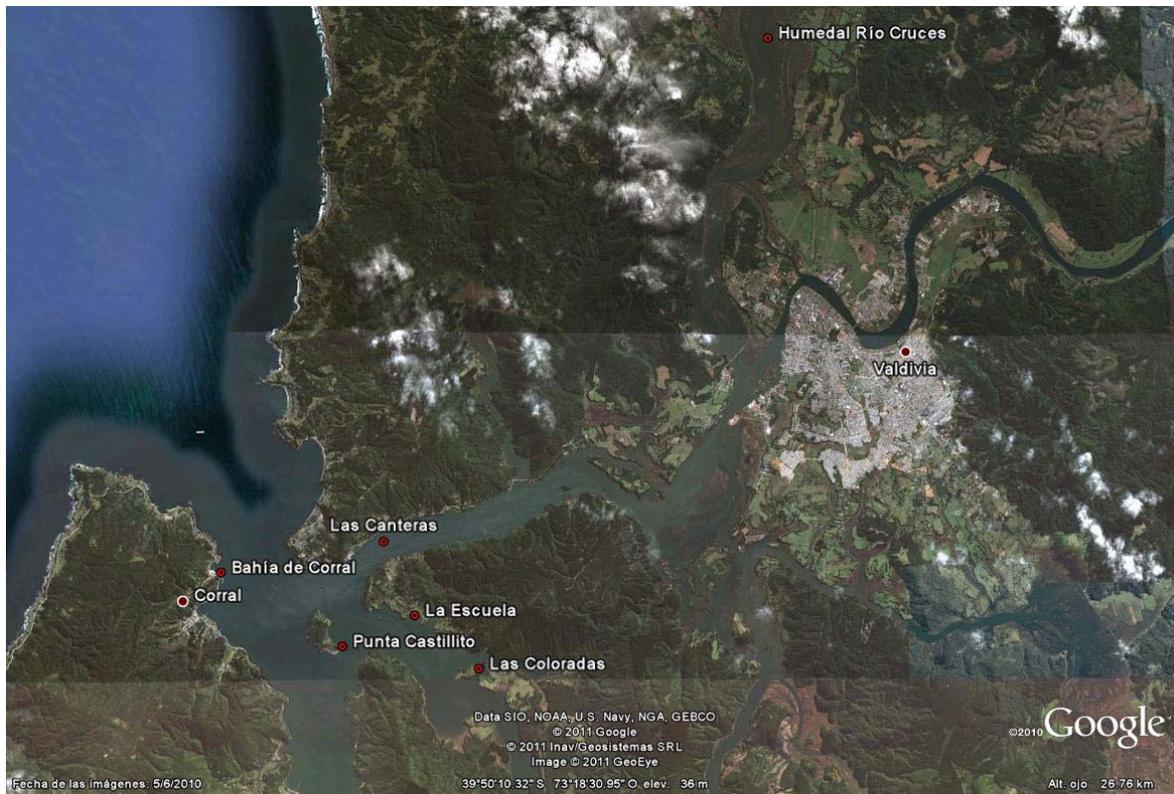


Figura 3. Fotografía satelital tomada de Google Earth de estaciones de muestreo seleccionadas como estaciones de control (Bahía Corral, Punta Castillito, Las Coloradas, Carboneros).

7.2. Tablas

Tabla 1. Georeferenciación de las estaciones de muestreo.

Estaciones de Muestreo	
Nanihue 1	W 73° 0.8' 6.8''
	S 39° 37' 12.3''
Nanihue 2	W 73° 0.8' 17.2''
	S 39° 37' 17.3''
Nanihue 3	W 73° 0.8' 37.3''
	S 39° 37' 28.1''
Nanihue 4	W 73° 0.8' 57.8''
	S 39° 38' 8.4''
Nanihue 5	W 73° 0.9' 25.4''
	S 39° 38' 52.4''
Nanihue 6	W 73° 0.9' 50.5''
	S 39° 37' 13.3''
Confluencia	W 73° 0.9' 40.6''
	S 39° 39' 40.1''
Cudico 1	W 73° 0.7' 31.5''
	S 39° 38' 38.1''
Cudico 2	W 73° 0.7' 48.2''
	S 39° 38' 48.6''
Cudico 3	W 73° 0.8' 37.3''
	S 39° 39' 6.9''
Cudico 4	W 73° 0.9' 51.1''
	S 39° 39' 52.3''
Belloto	W 73° 0.2' 40''
	S 39° 35' 37''
Puente Cudico	W 73° 0.4' 8.2''
	S 39° 37' 19.2''
Puente Nanihue	W 73° 0.2' 26.9''
	S 39° 36' 17.7''
Bajo Isla Rialejo	W 73° 13' 18.2''
	S 39° 43' 17.8''
Fuerte San Luis	W 73° 0.8' 56.8''
	S 39° 36' 16.7''
Salida Bañados	W 73° 10' 26.6''
	S 39° 37' 37.8''
San Martin	W 73° 11' 2.9''
	S 39° 38' 23.8''
Santa Maria	W 73° 10' 45.1''
	S 39° 34' 56.6''
Pta Castillito	W 73° 23' 12''
	S 39° 53' 34''
Carboneros	W 73° 22' 37''
	S 39° 52' 38''
Bahía Corral	W 73° 25' 29.2''
	S 39° 53' 8.9''
Las Coloradas	W 73° 19' 55''
	S 39° 54' 44''
Cabo Blanco	W 73° 25' 35.6''
	S 39° 46' 65.5''

Tabla 2. Concentración de α - pineno en sedimentos para otros sitios de toma de muestra realizados años 2005, 2006 y 2007.

Estaciones	Fechas	α-pineno(ngg^{-1} ps)
Pte. Cudico	16.06.06	446
Belloto	16.06.06	85
Pte Cudico	16.01.07	115
Belloto	16.01.07	176
Pte. Nanihue	16.01.07	42
Pta. Castillito	16.06.05	22
Carboneros	20.10.05	58
Cabo Blanco	16.12.05	18
Pta. Castillito	16.06.05	22
Carboneros	20.10.05	58
B. Corral	16.06.05	149
Las Coloradas	16.06.05	188

Tabla 3. α -Pino en sedimentos del Humedal del Río Cruces. Muestras únicas recolectadas para el estudio realizado por la Universidad Austral de Chile-CONAMA, 2005.

UBICACIÓN	FECHA	CONCENTRACION (ngg ⁻¹ ps)
San Luis 1	24/11/2004	36
Pichoy 1	23/12/2004	9
Pichoy 2	23/12/2004	130
Pichoy 3	23/12/2004	547
Muestra Blanco	23/12/2004	12
Tambillo 1	23/12/2004	345
Tambillo 2	23/12/2004	329
Chorocamayo	23/12/2004	344
San Ramon 1	23/12/2004	75
San Ramon 2	23/12/2004	69
Punucapa	23/12/2004	151
Cabo Blanco 1	23/12/2004	13
Las Animas 1	23/12/2004	65
Fuerte San Luis 1	23/12/2004	1154
Cayumapu 1	23/12/2004	153
Cayumapu 2	23/12/2004	547
Cayumapu 3	23/12/2004	148
Cayumapu 4	23/12/2004	80
San Antonio 1	23/12/2004	84
Sitio Histórico 1	23/12/2004	7
Fuerte San Luis 2	18/01/2005	19
Fuerte San Luis 1	18/01/2005	128
Muestra Blanco	18/01/2005	nd
San Martin 1	18/01/2005	268
Santa María 1	18/01/2005	236
Santa María 2	18/01/2005	28
Rucaco 2	18/01/2005	134
Rucaco 1	18/01/2005	121
Fuerte San Luis 2	18/01/2005	80
Antes Planta CELCO 3	18/01/2005	199
Antes Planta CELCO 1	20/01/2005	159
Antes Planta CELCO 2	20/01/2005	403
Las mulatas 2	16/06/2005	37
Las Mulatas 1	16/06/2005	55