



Universidad Austral de Chile

---

Facultad de Ciencias

Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Hernán Palma F.

**INSTITUTO:** Química

**FACULTAD:** Ciencias

“ $\alpha$ -PINENO EN EL HUMEDAL DEL RÍO CRUCES”

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico.

**MAGALY EVELYN FOITZICK MARTÍNEZ**

VALDIVIA-CHILE

2008

*“El fuego no quema el conocimiento ni la sabiduría”*

*... a todos los docentes afectados por el incendio del edificio Emilio Pugín.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En el último paso de este largo camino quisiera agradecer a cada una de las personas que transitaron junto a mí...*

*En forma particular quiero agradecer a las personas que hicieron posible este trabajo. Al profesor Hernán Palma, por la confianza, buena disposición, paciencia y apoyo. Al profesor Eduardo Quiroz por su disposición y colaboración en la revisión. Al profesor César López por sus importantes palabras en momentos difíciles, por su disposición y colaboración en la revisión.*

*A todas las personas que trabajan en el Instituto de Química por su amabilidad y disposición.*

## INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MATERIALES Y MÉTODO .....	14
2.1.- Área de estudio. ....	14
2.2.- Selección de las estaciones de muestreo. ....	14
2.3.- Toma de muestras.....	14
2.4.- Materiales. ....	15
2.4.1.- Materiales de laboratorio. ....	15
2.4.2.- Otros materiales .....	16
2.5.- Limpieza de material. ....	16
2.6.- Metodología analítica. ....	17
2.6.1.- Método de extracción. ....	19
2.6.2.- Cromatografía de gas-masa. ....	20
2.6.3.- Condiciones de operación para el análisis cromatográfico.....	20
2.6.4.- Análisis estadístico de datos. ....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1 Análisis cualitativo.....	22
3.2 Análisis cromatográfico. ....	22
3.3 Análisis cuantitativo. ....	22
3.3.1. Análisis temporal. ....	22
3.3.2. Análisis intersitio.....	24
3.4. Análisis estadístico. ....	26
3.4.1. Análisis temporal. ....	26
3.4.2. Análisis intersitio.....	26
4. DISCUSIÓN .....	27
5. BIBLIOGRAFIA.....	35

ANEXOS.....	45
Figuras.....	46
Tablas.....	64

## RESUMEN

En el presente estudio se evalúa la presencia de  $\alpha$ -pineno como eventual trazador químico de contaminación producida por alguna actividad de tipo antropogénica en un tramo del santuario Carlos Anwandter, Valdivia. Se determinaron las características espacio temporales de la distribución de  $\alpha$ -pineno en el sedimento de los principales afluentes del humedal del Río Cruces. En la zona de estudio se ubicaron 24 estaciones de muestreo donde se colectaron muestras de sedimento.

Se utilizó cromatografía de gas-espectrometría de masa (CG-MS) para identificar y cuantificar el compuesto. En el primer muestreo prospectivo realizado el 16.06.06, se observó un promedio de las concentraciones de 0,346  $\mu\text{g/g.p.s.}$  para el total de las estaciones en estudio. Para el segundo muestreo realizado el 17.11.06, el promedio fue de 0,140  $\mu\text{g/g.p.s.}$  Se encontró  $\alpha$ -pineno en todas las muestras analizadas, las concentraciones fluctuaron entre 0,0370  $\mu\text{g/g.p.s.}$  y 1,24  $\mu\text{g/g.p.s.}$ , esto sugiere que es probable que este monoterpeno se encuentre en todo el sedimento a lo largo del Santuario Carlos Anwandter.

El análisis temporal de la concentración de  $\alpha$ -pineno mostró una disminución desde el año 2005 al 2006, mientras que el análisis estacional mostró una distribución relativamente homogénea. El  $\alpha$ -pineno es un compuesto altamente reactivo, lo que pudo o puede estar provocando variadas alteraciones en el ecosistema del Santuario.

## SUMMARY

This research evaluates the  $\alpha$ -pinene presence as possible tracer chemical of contamination by anthropogenic activities on a section of the Sanctuary Carlos Anwandter, Valdivia. The temporary space characteristics are determined for the distribution of  $\alpha$ -pinene in the sediment of the main tributaries of the Cruces River wetland. 24 sampling stations were located at the study area where sediment samples were collected.

Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) was used to identify and to quantify the compound. In the first sampling prospective conducted on June 16, 2006, there was an average concentration of 0.346  $\mu\text{g/g.s.w.}$  for all stations in study. For the second sample on November 17, 2006, the average was 0.140  $\mu\text{g/g.s.w.}$   $\alpha$ -Pinene was found in all samples tested, concentrations ranged from 0.037  $\mu\text{g/g.s.w.}$  to 1.24  $\mu\text{g/g.s.w.}$ , this suggests it is likely that this monoterpene yields throughout the sediment along of the Sanctuary Carlos Anwandter.

The temporary analysis of the concentration of  $\alpha$ -pinene showed a decrease from the year 2005 to 2006, while the seasonally analysis showed a relatively uniform distribution. The  $\alpha$ -pinene is a highly reactive compound, which could or may be causing changes in varied ecosystem of the sanctuary.

## 1. INTRODUCCIÓN

Algunas de las actividades desarrolladas por el ser humano pueden liberar compuestos al medio ambiente que pueden o no introducir desequilibrios en un ecosistema (Tortorelli & Hernández, 1995). Este, es sin duda un tema muy amplio, donde la variedad de ecosistemas sobre los cuales puede ocurrir un evento de contaminación, el o los tipos de sustancias consideradas contaminantes y los efectos que puede llegar a producir sobre los primeros, generan procesos multivariados, dependiente de un sinnúmero de factores. Así por ejemplo, de las diferentes sustancias existentes, más de un millón de ellas han sido introducidas en cuerpos de agua naturales a través de vertidos antropogénicos (Förstner *et al*, 1993).

A grandes rasgos, se puede hablar de cuatro fuentes de contaminación de origen humano o de tipo antropogénica: actividades industriales, actividades agrícolas, eliminación de residuos y transporte. Éstas suelen estar en las proximidades de centros urbanos y polos industriales, donde los contaminantes están concentrados en pequeños volúmenes de aire, agua y suelo. La industria es una de las principales fuentes de contaminación antropogénica, en la cual se originan una diversidad de sustancias nocivas, de acuerdo al área productiva, cuyo destino final es el suelo, aire o los cuerpos de agua.

El desarrollo industrial a nivel mundial ha permitido sin duda el crecimiento económico de muchos países, sin embargo, resulta evidente el incremento

de la contaminación. Una serie de estudios demuestra que la participación de las industrias contaminantes en la estructura productiva de países industrializados ha tendido a caer, mientras las de los países en vías de desarrollo han aumentado en el mercado internacional (Jenkins, 1998; Low & Yeats, 1992; Sorsa, 1994).

El índice de las ventajas comparativas reveladas (IVCR), que permite conocer el impacto de una industria a nivel mundial, muestra que en sectores industriales más contaminantes resulta mayor en los países industrializados que en los países menos desarrollados, pero mientras que en los primeros ese IVCR tiende a reducirse, lo contrario ocurre en los países en desarrollo. Aunque esta evolución parece sugerir que los países desarrollados, que cuentan con un marco regulatorio ambiental más estricto, han perdido competitividad en las industrias ambientalmente sensibles, este fenómeno también puede identificarse con un patrón propio de ciertas etapas de industrialización, donde actualmente varios países latinoamericanos han encontrado un nicho ventajoso, no basado en su rezago ambiental, sino en ventajas tales como el costo de la mano de obra y la disponibilidad de materias primas. Este es el caso típico de sectores que transforman materias primas en sus primeras etapas, generando bienes semi-terminados, que concluyen su elaboración en otros países y que producen grandes cantidades de residuos en el proceso de elaboración. Ejemplos representativos son los de fundiciones de metal, pulpa de papel, y procesamiento de productos químicos (Dasgupta *et al.*, 1998).

En Chile, la industria de la celulosa ha sido una de las que ha presentado unos de los mayores crecimientos desde que se inició en el año 1959; actualmente suman 11 plantas (7 plantas con procesos químicos y 4 con procesos mecánicos) a lo largo del país. Asociado a la industria también ha aumentado en forma brusca la superficie de suelos destinados a plantaciones forestales reduciendo considerablemente la superficie de bosque nativo y de suelo que antes era destinado a cultivos agrícolas. Actualmente, las plantaciones forestales cubren una superficie aproximada de 2,1 millones de hectáreas, equivalentes al 13,5% de la superficie boscosa del país y al 2,8% del territorio nacional. Aproximadamente el 75% de ésta superficie 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 la V y la X regiones. Hasta el año 2001 en la X Región las plantaciones de *Eucalyptus* ocupaban 5.300 hás., mientras que las plantaciones de *Pinus radiata* alcanzaban 806 hás. (CONAF, 2007). Así, el crecimiento del sector forestal juega un rol fundamental en la economía del país, participando con el 3,5% del producto interno bruto (PIB), siendo la segunda actividad económica más importante de Chile, después de la minería. Actualmente las exportaciones forestales alcanzan los US\$ 3.397 millones, lo que representa el 11% del total exportado.

De la industria 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, 2005). Es así como el gran aumento de las actividades productivas de este tipo han generado impactos irreparables tanto en los suelos destinados a plantaciones de tipo forestal, como en todos aquellos ecosistemas que reciben tanto las emisiones gaseosas como los efluentes líquidos de la industria asociada (Hynynen *et al.*, 2004).

La composición química de las emisiones y efluentes que las industrias de celulosa arrojan al medio ambiente es muy heterogénea e incluso varios compuestos aún no han sido identificados (McMaster *et al.*, 2003). El volumen y la composición química de los efluentes líquidos dependen del tipo de madera empleada (fibra corta o larga), así como de los procesos de pulpage y blanqueo (Lacorte *et al.*, 2003). En tal sentido, el proceso Kraft que opera con compuestos clorados como agentes de blanqueo, genera una amplia variedad y cantidad de compuestos químicos, que han sido asociados a diversos efectos tóxicos sobre la biota acuática (McMaster *et al.*, 1995). Tomando como referencia la Resolución Ambiental de la Planta de Celco Valdivia, los desechos del ducto contienen en cada litro: 80% de materia orgánica, 10% de sólidos suspendidos, 4% de cloratos y 2% de compuestos orgánicos halogenados. El resto corresponde a metales pesados (Arsénico, Mercurio, Cadmio, Plomo, Cromo, Molibdeno, Níquel), ácidos resínicos y clorofenoles.

La evidencia científica existente a nivel mundial respecto al daño en ecosistemas sometidos a efluentes de plantas de celulosa, señala que han sido identificados muchos compuestos tóxicos, principalmente organoclorados, como dioxinas y furanos, los cuales tienen varias características comunes: son extremadamente tóxicos, activos fisiológicamente en dosis muy pequeñas; persistentes (no se degradan fácilmente y pueden durar años en el medio ambiente); bioacumulables en los tejidos grasos de los organismos y biomagnificables, es decir, aumentan su concentración progresivamente a lo largo de las cadenas alimenticias. Por su persistencia pueden viajar grandes distancias siendo arrastrados por las corrientes atmosféricas, de agua dulce o marinas. Estos compuestos han resultado ser agentes cancerígenos y disruptores endocrinos (Stringer & Johnston, 2001). Además, existen estudios que señalan que derivados de hormonas vegetales (fitoesteroles), productos de la degradación de componentes no-celulósicos de la madera, principalmente lignina, terpenos y ácidos resínicos (Munkittrick *et al.*, 1992), también han sido denominados disruptores endocrinos, puesto que sus estructuras resultan muy similares a hormonas han sido asociados a efectos sobre la reproducción, desarrollo de órganos, crecimiento, funciones tiroideas, entre otros, de componentes de la biota expuesta a efluentes de plantas de celulosa como, por ejemplo, peces (Munkittrick *et al.*, 1998, Oakes *et al.*, 2003).

Por otra parte, se sabe que las industrias de celulosa emiten una diversidad de contaminantes a la atmósfera, aproximadamente un 22% material particulado, 30% dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), 46% óxidos de nitrógeno (N<sub>x</sub>O<sub>y</sub>), 2%

compuestos de azufre reducidos (TRS) y algunos compuestos orgánicos volátiles (COVs) como hidrocarburos, terpenos y metanol, entre otros (Strömvall & Petersson, 1993; Kotzias *et al.*, 1991; Petersson, 1988); éstos, entre los muchos efectos que producen, solo por citar alguno; juegan un papel significativo en la formación de ozono troposférico (Capouet & Muller, 2006), debido a que sufren transformaciones químicas como oxidaciones por radicales libres como óxidos de nitrógeno e hidroxilos, entre otros.

Entre los COVs, los terpenos poseen las tasas de emisión más altas, aunque tienen una vida media que va desde 2-3 minutos hasta varias horas, dependiendo del agente oxidante, su concentración se mantiene relativamente alta. Además, estos compuestos son emitidos por encima de las cubiertas emisoras forestales de coníferas en donde las concentraciones fluctúan entre 0,5 y 1 ppb (Llusiá & Peñuelas, 2000). Entre los terpenos, se ha observado que  $\alpha$ -pineno posee una de las mayores tasas de emisión y es el más abundante (Guenther *et al.*, 1995). El  $\alpha$ -pineno entonces, puede actuar como agente reductor, participando en la formación excesiva de ozono troposférico (Tolocka *et al.*, 2006; Chen & Griffin, 2005; Kotzias *et al.*, 1990; Juuti *et al.*, 1990).

La evidencia científica sugiere que, durante los últimos años, el ecosistema estuarial de Valdivia (XIV región, W 73° 18', S 39° 49') ha sido expuesto a una tasa creciente de perturbaciones antropogénicas. Estas tienen relación especialmente con la contaminación por desechos industriales, aguas servidas y la

actividad agrícola y ganadera. Por muchos años el sistema estuarial se ha constituido en un vertedero natural para residuos domiciliarios e industriales líquidos, semisólidos y sólidos. (Palma *et al.*, 2006). Como parte del sistema estuarial, el Santuario Carlos Anwandter, ocupa una interfase entre la cuenca terrestre río arriba del Río Cruces y sus afluentes, y el sistema estuarino y marino del Océano Pacífico. El clima, geomorfología e hidrología de la cuenca se combinan como los promotores primarios del proceso hidrogeomórfico dentro del área del humedal. La hidrología del humedal modifica y cambia directamente el ambiente físico-químico, particularmente en cuanto a disponibilidad de oxígeno, ciclos de nutrientes, pH y toxicidad. La hidrología también proporciona un medio de transporte clave para sedimentos, nutrientes y material tóxico, que influye, además, en el ambiente físico-químico. En el Santuario, el agua también proporciona un medio de transporte para remover material biótico y abiótico, tal como carbón 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). La mayor parte de la contaminación que llega al mar lo hace a través de los ríos y por la escorrentía costera produciendo importantes efectos directos sobre el sistema estuarino y los recursos vivos (U.S. EPA, 2000).

Para evaluar los efectos de la contaminación en los estuarios y zonas costeras aledañas, no es necesario distinguir el origen específico de la contaminación,

difusa o puntual, ya que ambas finalmente se concentran en la zona de la desembocadura del río y sus alrededores. Sí, es útil determinar el tipo de contaminación (orgánica, inorgánica, bacteriológica, etc.), además de las eventuales fuentes generadoras, con el fin de implementar medidas de mitigación y/o prevención en su origen.

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 (huella dactilar), modelos de degradación química y modelamiento del transporte (Taylor, 2004), surge el interés por evaluar la presencia de  $\alpha$ -pineno en el sedimento, como trazador químico de contaminación por actividades antropogénicas.

El  $\alpha$ -pineno es el componente principal de la trementina, un producto químico que se obtiene de la savia densa y resinosa de pinos y otras coníferas. Este compuesto es un monoterpeno abundante en muchas especies arbóreas, prácticamente en toda la familia de las coníferas (pinaceae) (Banthorpe & Le patourel, 1972) y en miembros de la familias Lamiacea/labietae (romero, salvia, lavanda), Apiacea (Apio, perejil, cilantro, zanahoria), Rutacea (cítricos), Myrtacea (Eucaliptos, Arrayán) (Kesselmeier & Staudt, 1999, Smith, 2000). 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).

En general, los terpenos son hidrocarburos 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 monoterpenos son compuestos de 10 átomos de carbono derivados biosintéticamente de geranilpirofosfato (Tingey *et al.*, 1991). Se biosintetizan a partir de un proceso general que se inicia con el Acetil coenzima A, siendo el Isopentenil-pirofosfato y su isómero dimetilalil-difosfato, (derivados del ácido mevalónico) precursores del isopreno. La condensación de estos dos compuestos da lugar al geranil-difosfato, unidad de 10 carbonos (Banthorpe & Le patourel, 1972). Este mecanismo es llevado a cabo en los cloroplastos (Fehsenfeld *et al.*, 1992) y luego son almacenados internamente en ductos especializados o canales, o externamente en glándulas de aire (Croteau, 1987). En las plantas, los monoterpenos constituyen parte del sistema de defensa químico, actuando como elemento disuasivo para muchos mamíferos e insectos en general (Lorio & Sommers, 1986; Lewinsohn *et al.*, 1993). Otras posibles funciones de los terpenos son la estabilización y protección de las membranas vegetales contra las altas temperaturas o la alteración de la floración de las plantas vecinas (Sharkey & Singaas, 1995; Terry *et al.*, 1995; Tingey *et al.*, 1991; Loreto *et al.* 1998; Peñuelas & Llusià, 2002). Los terpenos pueden incluso estar

implicados en el desarrollo de incendios forestales, debido a características de inflamabilidad (Owens *et al.* 1998; Peñuelas 1996).

El nombre químico de  $\alpha$ -pineno es 2,6,6-trimetil-biciclo [3.1.1]- 2-hepteno,  $C_{10}H_{16}$ , su peso molecular es de 136,23 g/mol. (Figura 1). El punto de ebullición de los monoterpenos fluctúa entre 140° y 180° C. Son fácilmente solubles en solventes orgánicos (éter de petróleo, cloroformo, benceno, éter, hexano, entre otros). La LD50 oral (ratas) es de 3700 mg/kg.

Según los antecedentes anteriormente señalados se postula como hipótesis que si bien el compuesto  $\alpha$ -pineno se encuentra de forma natural en el medio ambiente como constituyente de algunos árboles, éste se puede utilizar como trazador químico de contaminación por alguna actividad de tipo antropogénica que ocasiona la concentración y acumulación de este compuesto.

El presente estudio tiene como objetivo general medir la variación espacio-temporal de  $\alpha$ -pineno en parte del Santuario Carlos Anwandter, como el Río Cruces y sus afluentes. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la concentración  $\alpha$ -pineno en muestras de sedimento del área de estudio en distintas estaciones del año, mediante cromatografía de gas-espectrometría de masa.
- Determinar variabilidad estacional (otoño-primavera) de  $\alpha$ -pineno en muestras de sedimento.

- Determinar variabilidad espacial (intersitio) de  $\alpha$ -pineno en muestras de sedimento.
- Estimar posibles eventos y fuentes de descarga de  $\alpha$ -pineno

## **2. MATERIALES Y MÉTODO**

### **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 en dos de los principales afluentes del Río Cruces, el Río Nanihue y el Cudico, además de otras estaciones ubicadas en el Río Cruces (Figura 2).

### **2.2.- Selección de las estaciones de muestreo.**

En la zona investigada fueron situadas 24 estaciones de muestreo (Figuras 3 y 4), la selección de las estaciones fue dirigida y basada en las características hidrodinámicas del humedal con respecto a la acumulación de sedimento, considerando el Santuario Carlos Anwandter y sus afluentes, además de las diferentes estaciones del año (Tabla 1).

### **2.3.- Toma de muestras.**

El plan de muestreo y técnica de muestreo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por el Método para recolección, almacenaje y manipulación de

sedimentos para Análisis Químico y Toxicológico: Manual Técnico (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, luego se envasaron en bolsas plásticas, con la respectiva rotulación y 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 (Tabla 2) y se dividió cada muestra recolectada en tres cantidades aproximadamente iguales. Luego se envolvieron en papel aluminio y se guardaron en un congelador (4° C) para su posterior análisis.

Se realizaron dos muestreos prospectivos, el primero el día 16.06.2006 y el segundo el día 17.11.2006. Se consideraron además, muestras guardadas en el laboratorio, que fueron tomadas en el año 2005.

## **2.4.- Materiales.**

### **2.4.1.- Materiales de laboratorio.**

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

#### **Balanzas**

Se empleó una balanza analítica.

## **Solventes**

Se utilizó hexano (Merck), acetona (Merck) ambos de calidad analítica y estándares de alta pureza. Otros reactivos como sulfato de sodio anhidro (Merck) y nitrógeno gaseoso.

**Compuestos químicos patrones:** Solución de  $\alpha$ -pineno (Merck) como solución stock y ciclohexanona (Merck) como estándar interno.

### **2.4.2.- Otros materiales**

Vasos de precipitado, pipetas, balón (250 mL), baguetas, embudos, soporte universal, nueces, lana de vidrio, láminas de cobre, agitador mecánico, rotavapor (Büchi), estufa (WH71, Electric Heated Thermostatic Bay Box), termómetro, tijeras, tenazas, pinzas, micropipeta de volumen variable (10 y 100  $\mu$ L), inyector de muestras de 10 mL, entre otros.

### **2.5.- Limpieza de material.**

Los materiales de vidrio, porcelana y metal, utilizados en los análisis, fueron sometidos a una rutina de procedimientos de limpieza con el fin de eliminar posibles interferencias que pudieran afectar el resultado de los análisis. El material se lavó con abundante agua y detergente común, luego se enjuagó con agua destilada y se colocó en una estufa a 60° C durante el tiempo necesario para que estuviese completamente seco. Antes de usar todos los materiales fueron enjuagados con hexano.

## 2.6.- Metodología analítica.

Para realizar la curva de calibración, se utilizó una solución de trementina, de densidad 0,866 g/mL. De acuerdo a la densidad 1  $\mu$ L de solución de trementina contiene 866  $\mu$ g, ésta solución se llevó a un volumen de 1 mL, por lo tanto, tendrá una concentración de 866  $\mu$ g/mL (solución denominada PINE 55). Se prepararon 4 soluciones más a partir de PINE 55: PINE 11, PINE 22, PINE 33, PINE 44, tomando volúmenes de 5, 10, 25, 35 mL respectivamente y hexano hasta un volumen de 50 mL. Posteriormente, por cromatografía de gas, se obtuvo el porcentaje de  $\alpha$ -pineno para cada solución, dando como promedio un 83,6%. Entonces PINE 55 tendrá una concentración de  $\alpha$ -pineno igual a 724  $\mu$ g/mL. Luego, se toman 100  $\mu$ L de solución PINE 11 se diluye a 100 mL en un matraz aforado, esta solución es llamada PINE-STOCK A1, cuya concentración es de 0,724  $\mu$ g/mL. Finalmente con el objeto de tener concentraciones más pequeñas se tomaron 250  $\mu$ L de la solución PINE-STOCK A1 y se diluyeron a 50 mL, quedando con una concentración de 3,62 ng/mL llamada PINE-STOCK B1.

Para realizar la cuantificación de  $\alpha$ -pineno se debió utilizar ciclohexanona como estándar interno (Figura 5), un compuesto estable e inerte para este propósito. La densidad de la ciclohexanona se determinó pesando un picnómetro vacío (17,5 g) y luego lleno con ciclohexanona (26,8 g). El volumen del picnómetro a 20° C es 9,79 mL. Por lo tanto, la densidad de la ciclohexanona será de 0,948 mg/ $\mu$ L. Posteriormente, por cromatografía de gas, se determinó que el porcentaje de pureza de ciclohexanona es 96,2 %. Entonces, 100 mg de solución contienen 96,2 mg de

ciclohexanona pura, por lo tanto, 94,8 mg o 100  $\mu$ L contendrán 91,2 mg de ciclohexanona pura. Así, la concentración de ciclohexanona en la solución será de 912  $\mu$ g/mL (CICLOH STOCK A1). Finalmente se preparó una solución CICLOH STOCK B1 para lo cual se tomaron 100  $\mu$ L de solución CICLOH STOCK A1 y se diluyeron a 10 mL en un matraz aforado, así la concentración de la solución CICLOH STOCK B1 es de 9,12  $\mu$ g/mL.

Con estas soluciones stock se prepararon las soluciones para utilizar en la curva de calibración, con un volumen final de 1 mL, utilizando una concentración de 456 ng/mL de ciclohexanona como estándar interno en todas las soluciones de  $\alpha$ -pineno, tomando 50  $\mu$ L de CICLOH STOCK B1. Para la preparación de las soluciones estándar de  $\alpha$ -pineno, se tomaron volúmenes de 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 30 $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200 $\mu$ L, y 300 $\mu$ L, respectivamente de la solución Stock PINE-STOCK B1 y se aforaron a 1 mL con hexano. Las concentraciones finales fueron:

Solución Pine 001:36,2 ng/mL.

Solución Pine 002:72,4 ng/mL.

Solución Pine 003:108,6 ng/mL.

Solución Pine 004:362,0 ng/mL.

Solución Pine 005:724,0 ng/mL.

Solución Pine 006:1,09  $\mu$ g/mL.

Las soluciones fueron inyectadas en el cromatógrafo de gas para hacer la curva de calibración (Figura 6). El límite de detección para el análisis es de 4 ng/mL (Figura 7).

### 2.6.1.- Método de extracción (Figura 8).

- **Pesaje de muestras.**

Se pesaron fracciones de 7,00 g de las muestras de sedimento y se colocaron en un mortero. Luego, se pesó en una proporción de tres veces el peso de la muestra de sulfato de sodio anhidro, que cumple la función de atrapar el agua contenida en el sedimento. Se agregó al mortero y se mezcló con la muestra de sedimento hasta homogeneizar. La mezcla se colocó en un frasco ámbar y se agregó hexano hasta cubrir todo el sólido (50 mL aproximadamente).

- **Extracción:**

Extracción mediante agitador mecánico durante 4 horas.

- **Filtración:**

Colocando lana de vidrio y 2 cucharadas de sulfato de sodio anhidro en un embudo, el contenido del frasco ámbar se pasa por el filtro de lana de vidrio y sulfato de sodio, se recibe el filtrado en un balón de fondo redondo de 250 mL y se arrastran los residuos del frasco ámbar tres veces con volúmenes iguales de hexano.

- **Concentración:**

La concentración de las muestras se hizo por destilación, colocando el balón en un rotavapor al vacío y calentando el contenido del balón con agua hasta unos 70°C (Punto de ebullición del hexano 69° C, 1atm). Se concentró hasta un volumen de 2 mL aproximadamente; este volumen se trasladó con una pipeta Pasteur a un frasco ámbar de 5 mL enjuagando tres veces el balón con pequeñas fracciones de hexano. Al

volumen contenido en el frasco ámbar se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de estándar interno CICLOH STOCK B1 (ciclohexanona 456  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Luego, se le agregaron láminas de cobre (captación de azufre). Finalmente se concentró el volumen de muestra contenido en el frasco ámbar hasta 1 mL con nitrógeno gaseoso, quedando lista para ser inyectada la muestra en el cromatógrafo de gas.

Cada muestra de las diferentes estaciones de muestreo se analizó por triplicado. Además de las muestras, se preparó un blanco siguiendo la misma pauta de las muestras, conteniendo solamente arena blanca.

### **2.6.2.- Cromatografía de gas-masa.**

Para la cuantificación de  $\alpha$ -pineno, se utilizó un cromatógrafo gaseoso (Figura 9), modelo HP 6890 (Hewlett Packard®) con ajuste de método " $\alpha$ -pineno", con un inyector split/splitless acoplado a un Detector Selectivo de Masa, modelo HP5973 (Hewlett Packard®), que cuenta con un software HPCHEM y una biblioteca de compuestos orgánicos. Se empleó una columna capilar Crosslinked Phenyl Methyl Siloxane 5% HP 19091S-433 (Hewlett® Packard), 250,00  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 30 m de longitud y 0,25 mm de espesor de película.

### **2.6.3.- Condiciones de operación para el análisis cromatográfico.**

La temperatura del horno inicial fue de 60° C con un tiempo inicial de 1 minuto hasta una temperatura máxima de 325°C. El tiempo total de la corrida cromatográfica es de 30 minutos. El gas utilizado en la fase móvil fue helio de grado

cromatográfico (99,9999 % de pureza) con una presión de 8,30 psi y velocidad de flujo de 20 mL/min. Las condiciones del modo de ionización de impacto de electrones fueron de 70 eV de energía de los iones, 280°C como temperatura de la fuente de iones, 15-500 unidades de masa para el rango de masas en el modo de barrido (SCAN) y el flujo del inyector fue de 53,4 mL/min.

La cantidad de muestra que se inyectó en el cromatógrafo de gas/masa para analizar fue de 2 µL. La identificación del compuesto de interés se realizó de acuerdo al tiempo de retención, mientras que la cuantificación se hizo empleando una curva de calibración y un estándar interno.

#### **2.6.4. Análisis estadístico de datos.**

Las muestras fueron analizadas con el programa estadístico Epi Info 2000 versión 3.4. Se realizó una comparación interestacional y temporal. Se aplicó el Test de Kruskal-Wallis para dos grupos, puesto que las varianzas no son homogéneas.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Análisis cualitativo.**

En el 100% de las muestras analizadas se encontró la estructura química estudiada, esto es, el monoterpeno  $\alpha$ -pineno. Para el estudio se consideraron muestras que fueron tomadas en el año 2005 y que se encontraban guardadas en el laboratorio de Química Orgánica Ambiental, en las cuales también se encontró  $\alpha$ -pineno.

#### **3.2 Análisis cromatográfico.**

En los cromatogramas del análisis cuantitativo se observan claramente los peak de  $\alpha$ -pineno con un tiempo de retención de 3,45 minutos (Figuras 10 y 11). Se observa también un peak para el estándar interno ciclohexanona con un tiempo de retención de 2,93 minutos.

#### **3.3 Análisis cuantitativo.**

##### **3.3.1. Análisis temporal.**

En el primer muestreo realizado el 16.06.06, el promedio de las concentraciones de  $\alpha$ -pineno en peso seco es de 0,346  $\mu\text{g/g}$  para el total de las estaciones en estudio. Para el segundo muestreo realizado el 17.11.06, el promedio es de 0,140  $\mu\text{g/g}$ .

La estación Nanihue 2 presenta variabilidad en los dos muestreos en las concentraciones promedio en peso seco, siendo 0,0566  $\mu\text{g/g}$  para el primer muestreo y 0,149  $\mu\text{g/g}$  para el segundo (Figura 12). La estación Nanihue 3 presenta una concentración de  $\alpha$ -pineno en peso seco de 0,197  $\mu\text{g/g}$  para el primer muestreo, mientras que en el segundo muestreo se encontró una concentración promedio de 0,257  $\mu\text{g/g}$  (Figura 13). La estación Nanihue 4 presenta una concentración promedio de 0,915  $\mu\text{g/g}$  para el primer muestreo, mientras que para el segundo muestreo Nanihue 4 tiene una concentración promedio de 0,0952  $\mu\text{g/g}$  (Figura 14). La estación Nanihue 4-5 presenta una concentración de 0,375  $\mu\text{g/g}$  para el primer muestreo y 0,0889  $\mu\text{g/g}$  para el segundo muestreo (Figura 15). La estación Nanihue 5 tiene una concentración promedio de 1,24  $\mu\text{g/g}$  y 0,159  $\mu\text{g/g}$  en el segundo muestreo (Figura 16). La estación Nanihue 6 presenta una concentración promedio de 0,111  $\mu\text{g/g}$  en el primer muestreo, en el segundo muestreo la concentración promedio de  $\alpha$ -pineno aumenta levemente a 0,149  $\mu\text{g/g}$  (Figura 17). Para la estación Nanihue 7 la concentración promedio de  $\alpha$ -pineno es de 0,112  $\mu\text{g/g}$  y de 0,0962  $\mu\text{g/g}$  para el segundo muestreo (Figura 18). En la estación Cudico 2 se observa una concentración de 0,196  $\mu\text{g/g}$  en el primer muestreo y en el segundo 0,130  $\mu\text{g/g}$  (Figura 19). La estación Cudico 3 presenta el promedio de concentraciones más bajo con 0,0370  $\mu\text{g/g}$  para el primer muestreo y 0,0505  $\mu\text{g/g}$  en el segundo (Figura 20). La estación Puente Cudico tiene una concentración de 0,446  $\mu\text{g/g}$  en el primer muestreo y en el segundo 0,115  $\mu\text{g/g}$  (Figura 21). Finalmente, para la estación Belloto en el primer muestreo se presenta una concentración promedio de 0,0854  $\mu\text{g/g}$  y en el segundo muestreo la concentración promedio es de 0,176  $\mu\text{g/g}$  (Figura 22).

### 3.3.2. Análisis intersitio.

En el primer muestreo de junio del 2006 (Tabla 3) , se observa que la estación Nanihue 5 presenta el promedio de concentraciones en peso seco más alto con un valor de 1,24  $\mu\text{g/g}$ , mientras que la estación Cudico 3 presenta el promedio de concentraciones más bajo con 0,0370  $\mu\text{g/g}$ ; la estación Nanihue 1 presenta una concentración de 0,381  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 2 presenta una concentración de 0,0566  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 3 presenta una concentración de 0,197  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 4 presenta una concentración de 0,915  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 4-5 presenta una concentración de 0,375  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 6 presenta una concentración de 0,111  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 7 presenta una concentración de 0,112  $\mu\text{g/g}$ , la estación Cudico 2 presenta una concentración de 0,196  $\mu\text{g/g}$  (Figuras 23 y 24).

Mientras que en el segundo muestreo (Tabla 4) el promedio de concentraciones en peso seco más alto se observa en la estación Nanihue 3 con 0,257  $\mu\text{g/g}$ , el valor más bajo es de 0,0505  $\mu\text{g/g}$  para la estación Cudico 3. La estación Nanihue 2 presenta una concentración de 0,149  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 4 presenta una concentración de 0,0952  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 4-5 presenta una concentración de 0,0889  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 5 presenta una concentración de 0,159  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 6 presenta una concentración de 0,149  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 7 presenta una concentración de 0,0962  $\mu\text{g/g}$ , la estación Cudico 1 presenta una

concentración de 0,119  $\mu\text{g/g}$ , la estación Cudico 2 presenta una concentración de 0,131  $\mu\text{g/g}$ . (Figuras 25 y 26).

Los promedios de las concentraciones de  $\alpha$ -pineno ajustado a peso seco para otras estaciones consideradas en el segundo muestreo realizado el 17.11.06, son de 0,212  $\mu\text{g/g}$  para la estación salida Bañados, 0,133  $\mu\text{g/g}$  para la estación Santa María, 0,277  $\mu\text{g/g}$  para la estación San Martín, 0,245  $\mu\text{g/g}$  para la estación Fuerte San Luis y 0,260  $\mu\text{g/g}$  para la estación Bajo Isla Rialejo. (Figuras 26 y 27).

En este estudio se analizaron también muestras guardadas en el laboratorio, las cuales fueron tomadas en el año 2005. Entre ellas están la estación Bajo Isla Rialejo, que tiene una concentración promedio en peso seco de 0,403  $\mu\text{g/g}$ . La estación Punta Castillito presenta una concentración de 0,0220  $\mu\text{g/g}$ . La estación Carboneros presenta una concentración de 0,0584  $\mu\text{g/g}$ . La estación Bahía Corral tiene una concentración de 0,149  $\mu\text{g/g}$ . La estación Las Coloradas presenta una concentración de 0,188  $\mu\text{g/g}$ , la última estación analiza fue Cabo Blanco con una concentración de 0,0181  $\mu\text{g/g}$ . (Figura 28). Además se consideró un análisis para estaciones en el río Nanihue (Figura 29), en los cuales se realizó sólo una medición en cada una. La estación Nanihue 1 presentó una concentración de 0,649  $\mu\text{g/g}$ , estación Nanihue 2 la concentración obtenida fue 0,214  $\mu\text{g/g}$ , en la estación Nanihue 3 presentó una concentración de 0,103  $\mu\text{g/g}$ , la estación Nanihue 4 con una concentración de 1,02  $\mu\text{g/g}$ , para la estación Nanihue 5 la concentración obtenida fue de 0,261  $\mu\text{g/g}$ , Nanihue

6 presentó una concentración de 2,72  $\mu\text{g/g}$ , por último la estación Nanihue 7 presentó una concentración de  $\alpha$ -pineno de 1,43  $\mu\text{g/g}$ .

### **3.4. Análisis estadístico.**

Este análisis se realizó sólo para los muestreos prospectivos realizados en el año 2006.

#### **3.4.1. Análisis temporal.**

Al efectuar el análisis intrasitio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas aplicando la dócima Kruskal-Wallis para datos no paramétricos con un valor  $p = 0,9915$  para un nivel de confianza de 95%.

#### **3.4.2. Análisis intersitio.**

En el análisis estadístico de cada una de las estaciones de muestreo aplicando la docima Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, no arrojó diferencias significativas, para un valor  $P = 0,1575$  con un nivel de confianza de 95%.

#### 4. DISCUSIÓN

Este trabajo se efectuó con el objeto de medir la variación espacial y temporal de  $\alpha$ -pineno en sedimento de parte del Río Cruces y en algunos de sus afluentes. La elección de las estaciones se hizo de acuerdo a las características hidrodinámicas de los ríos con respecto a la acumulación de sedimento.

Se encontró  $\alpha$ -pineno en todas las muestras analizadas, las concentraciones en peso seco fluctúan entre 0,0370  $\mu\text{g/g}$  como mínima y 1,24  $\mu\text{g/g}$  como máxima, para los muestreos realizados el 16.06.06 y 17.11.07 (Figura 30). En cuanto al análisis temporal, las estaciones Nanihue 2 (Figura 12), Nanihue 3 (figura 13), Nanihue 6 (Figura 17), Cudico 3 (Figura 20) y la estación Belloto (Figura 22) muestran un aumento en las concentraciones promedio peso seco entre el primer y segundo muestreo, mientras que las estaciones Nanihue 4 (Figura 14), Nanihue 4-5 (Figura 15), Nanihue 5 (Figura 16), Nanihue 7 (Figura 18), Cudico 2 (Figura 19) y Puente Cudico (Figura 21) muestran concentraciones promedio peso seco inferiores en el segundo muestreo respecto del primero, aunque estadísticamente no se observan diferencias significativas entre ambos muestreos realizados en el año 2006. Por otra parte en un muestreo realizado en el año 2005 en las estaciones Nanihue 1 a Nanihue 7 (Figura 29) se encontraron concentraciones del orden de 0,103  $\mu\text{g/mL}$  a 2,71  $\mu\text{g/mL}$ . Las mediciones del año 2005 en el río Nanihue presentan valores bastante más elevados que en los muestreos realizados en el año 2006, en general el análisis

temporal muestra una tendencia a la disminución de las concentraciones de  $\alpha$ -pineno desde el año 2005 al 2006 (figura 31).

Haciendo un análisis intersitio para el primer muestreo (Figura 23) se observa una pequeña variabilidad entre las diferentes estaciones, exceptuando en las estaciones Nanihue 4 y Nanihue 5 que presentan promedios de concentraciones más altos que las demás. En el segundo muestreo (Figura 25) la mayor parte de las estaciones muestran un comportamiento parecido con promedios de concentraciones que fluctúan entre 0,176 y 0,0505  $\mu\text{g/g}$ , exceptuando la estación Nanihue 3 que muestra una concentración de 0,258  $\mu\text{g/g}$ . Las muestras tomadas el 17.11.06 en otras estaciones como Salida Bañados, Santa María, San Martín, Fuerte San Luis, Puente Nanihue (Figura 27) muestran fluctuaciones en la concentración de  $\alpha$ -pineno con valores que van desde 0,0418  $\mu\text{g/g}$  a 0,277  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 5) ; estas estaciones se encuentran en el curso del Río Cruces. Sin embargo, en las mediciones realizadas en muestras del año 2005 (Figura 28), se encontraron concentraciones muy bajas en una zona de poca influencia de corrientes, por encontrarse en otro sector, en esta estación (Cabo blanco) se encontró una concentración de apenas 0,0182  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 6), mientras que en otras estaciones cercanas a la costa de Valdivia se encontraron concentraciones mas elevadas. En general, el análisis temporal muestra un descenso en las concentraciones de  $\alpha$ -pineno hacia sectores menos influidos por las corrientes del Río Cruces.

Es difícil realizar una comparación de los resultados obtenidos respecto a la cantidad de monoterpenos encontrados en sedimento, ya que son escasos los estudios que describen presencia de  $\alpha$ -pineno en sedimentos; sin embargo, sí existen estudios en donde se ha visto que las plantas de celulosa liberan a través de sus efluentes, compuestos naturales como ácidos resínicos (compuestos por terpenos), fitosteroles, ácidos grasos (Hewitt *et al.*, 2002) que, junto a otra serie de compuestos como organoclorados (dioxinas, furanos y clorofenoles) producen inducción en el sistema de monooxigenasas de función mixta (MFO) en peces (Martel *et al.*, 1996, Williams *et al.*, 1996, Coakley *et al.*, 2001). Según Munkittrick (2003) algunos de los efectos de los efluentes de la celulosa en la reproducción de los peces son: alteración en la maduración sexual, alteración del tamaño de la gónada y del huevo, disminución de los niveles de hormonas reproductivas impedimentos metabólicos, alteración de la proporción machos-hembras aguas abajo de las descargas o alteraciones en las branquias, entre otros.

Un estudio realizado por Strömvall & Petersson (1993) determinó que la cantidad de monoterpenos liberada al medio ambiente por una planta de celulosa, que produce 300.000 toneladas de celulosa por año, varía entre 200 a 1500 toneladas al año dependiendo del tipo de madera utilizada como materia prima, alcanzándose concentraciones de monoterpenos de  $540 \mu\text{g}/\text{m}^3$  medidos a 40 m de altura. De estos monoterpenos el compuesto más abundante fue  $\alpha$ -pineno constituyendo entre un 40 y 60% del total.

Por otra parte, Munkittrick, Van Der Kraak y otros autores (1992) han realizado desde hace ya bastante tiempo vastos estudios, respecto a la contaminación producida por plantas de celulosa y los impactos que éstas generan en los ecosistemas. En Canadá, señala que productos de la degradación de componentes no-celulósicos de la madera, principalmente lignina, terpenos y ácidos resínicos, además de derivados de hormonas vegetales (fitoesteroles) han sido denominados disruptores endocrinos. Esto permite sostener que es de suma importancia seguir evaluando este tipo de contaminantes en el Santuario Carlos Anwandter. Además, se debe considerar que el santuario está inserto en un sistema estuarial y las normas de emisión establecidas para la descarga de riles no distingue entre ambientes fluviales y estuariales, sin embargo, éstos son muy distintos. En el segundo, se presentan importantes variaciones naturales en caudal, temperatura, salinidad y velocidad del agua, lo que hace que exista una acumulación aún mayor de contaminantes que en los lugares en donde se han realizado los estudios antes mencionados.

Dentro de la escasa literatura que existe actualmente respecto a análisis realizados sobre la concentración de monoterpenos eliminados a través de los efluentes de plantas de celulosa; Kim y Smith (2006) consideran mediciones de monoterpenos junto a ácidos resínicos y otros compuestos orgánicos eliminados a través de una planta de celulosa ubicada en Nueva Zelanda, el informe señala que las concentraciones de monoterpenos no han sido detectadas en el orden de concentraciones de ng/mL.

Si bien este estudio se realizó sólo en parte del Santuario Carlos Anwandter y en un periodo de tiempo breve, se debe considerar la posibilidad de seguir evaluando las concentraciones de  $\alpha$ -pineno a través del tiempo. El inconveniente que surge es la falta de mediciones en años anteriores de este compuesto en el Santuario, para poder realizar una comparación más crítica, pero sustentándonos en las bases de la forénsica ambiental, en donde se señala este tipo de inconvenientes, los cuales no son motivo para restar importancia a una investigación. Estas bases señalan la complejidad de la distribución de fuentes, las cuales pueden situarse entre dos extremos. Por un lado, todas las fuentes potenciales son conocidas en término de su composición química, localización, historia y duración de la actividad. Por el otro, ninguna de éstas se conoce con certeza. En el primer caso, donde se tiene un conocimiento previo de las fuentes, el problema es relativamente simple, ya que se pueden determinar sitios apropiados de toma de muestra utilizando un diseño experimental adecuado, el cual es parte de la estadística experimental convencional. Sin embargo, aún cuando se piense que se conocen todas las fuentes contribuyentes, las investigaciones forénsicas medioambientales han demostrado ser más complejas de lo inicialmente estimado. 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 biodegradación, volatilización y fotodegradación (Colombo *et al.*, 2005). En el segundo caso, donde no se conocen las fuentes potenciales con certeza, puede haber sospecha. Sin embargo, las muestras de las fuentes pueden no haberse recolectado, y tampoco podrían existir en la literatura. A

menudo, una operación pequeña de bajo perfil puede llegar a ser una importante pero inadvertida fuente de contaminación.

A principios de año ocurrió un evento de contaminación por una planta de celulosa en la región del Maule, en donde se observaron varias similitudes con lo ocurrido en el Santuario Carlos Anwandter en el año 2004. Un estudio realizado en peces que recibieron una descarga de contaminantes de los riles de la planta de celulosa Licantel en el río Mataquito, indicó que estos organismos fueron impactados por algún vertido con elevado contenido de  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno (relacionados con licores de digestión de pulpa de actividades industriales de papeleras que procesan madera de pino y eucaliptos), debido a que los órganos de los peces analizados contenían  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno en concentraciones altas, lo que concuerda con la información entregada por la planta donde se menciona que se liberó de forma accidental, dentro de otros compuestos, aceite de trementina a los cuerpos de agua. El  $\alpha$ -pineno es el principal constituyente de la trementina, entonces, es probable que este compuesto sea eliminado a través de los efluentes de la planta celulosa existente río arriba del Santuario Carlos Anwandter. Esta planta ocupa como materia prima una gran cantidad de madera de *Pinus radiata* (2.240.000 m<sup>3</sup>/año aproximadamente) y eucaliptus (563.000 m<sup>3</sup>/año aproximadamente), por lo tanto, puede eliminar una gran cantidad de terpenos al agua a través de sus riles. Además, estos compuestos también pueden ser eliminados a través de las chimeneas de la planta como lo señala la evidencia científica.

Lamentablemente, no existe control respecto a la cantidad liberada de este compuesto, como de tantos otros, puesto que este tipo de agentes contaminantes en Chile, no están incluidos en la normativa de control de contaminantes de descargas de residuos líquidos a cuerpos de agua.

El análisis efectuado en el presente trabajo junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a los problemas medioambientales que puede llegar a generar un compuesto que aún siendo natural, al encontrarse en cantidades excesivas producto de alguna actividad antropogénica, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

- Los niveles de concentración de  $\alpha$ -pineno en las muestras de sedimento analizadas muestran una disminución desde el año 2005 al 2006. Encontrándose concentraciones más altas que en el resto de estuario, por lo cual se podría postular como trazador químico de contaminación.
- Las variaciones interestacionales de  $\alpha$ -pineno para las muestras prospectivas tomadas en el año 2006, mostraron que existe una distribución relativamente homogénea en el sedimento del humedal del Río Cruces.
- $\alpha$ -pineno se encuentra en concentraciones más altas que en otros sitios del estuario del río Cruces, lo que permite presumir que ha sido introducido como producto de alguna actividad antropogénica.
- $\alpha$ -pineno es un compuesto altamente reactivo, lo que pudo o puede estar provocando variadas alteraciones en el ecosistema del Santuario.

De acuerdo a lo concluido en el presente estudio, se acepta parcialmente la hipótesis, puesto que es necesario seguir evaluando el comportamiento de  $\alpha$ -pineno en el humedal del río Cruces.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Banthorpe, D.V., Le patourel, G. N.** (1972). The Biosynthesis of (+)- $\alpha$ -pinene in Pinus Species. *Biochemistry Journal.*, 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.
- Capouet, M., Müller, J.** (2006). A group contribution method for estimating the vapour pressures of  $\alpha$ -pinene oxidation products. *Atmos. Chem. Phys.*, 6: 1455–1467.
- Chen, J., Griffin, R.**(2005). Modeling secondary organic aerosol formation from oxidation of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, and d-limonene. *Atmospheric Environment*, 39.
- 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.
- Colombo, J.C.; Barreda, A.; Bilos, C.; Cappelletti, N.; Demichelis, S.; Lombarda, P. Migota, M. C.; Skorupka, C. and Suárez, G.** (2005). Oil spill in the Río de la Plata estuary, Argentina: 1. Biogeochemical assessment of waters, sediments, soils and biota. *Environmental Pollution.*, 134, 277-289.

**CONAF.** (2007). Corporación Nacional forestal, Recursos forestales, plantaciones, Chile. Disponible en [www.conaf.cl](http://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 X Región de los Lagos-Universidad Austral de Chile.146pp.

**Corma.** (2005). Relevancia de la industria de la celulosa en Chile.

**Croteau, R.** (1987). Biosynthesis and catabolism of monoterpenoides. *Chem. Rev.*, 87:929–954.

**Dasgupta, S., Lucas, R., Wheeler, D.** (1998) “Small Plants, Pollution and Poverty: New Evidence from Brazil and Mexico”, The World Bank Group, DECRG, Infrastructure/Environment Group.

**Di Marzio, W.** (2005). Santuario Carlos Anwandter (Valdivia), Misión consultiva Ramsar, Chile. Pag.5.

**Fehsenfeld, F., Calvert, J., Fall, R., Goldan, P., Guenther, A., Hewitt, C.N., Lamb, B., Liu, S. Trainer, M., Westberg, H., Zimmerman, P.** (1992). Emissions of volatile

organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Global Biogeochemical Cycles*. 6, 389-430.

**Förstner, U., Ahlf, W., Calmano, W.** (1993) Sediment quality objectives and criteria development in Germany. *Water Science Technology*. 28(8-9), 307-316.

**Guenther, A., Hewitt, C. N., Erickson, D., Fall, R., Geron, C., Graedel, T., Harley, P., Klinger, L., Lerdau, M., McKay, W. A., Pierce, T., Scholes, B., Steinbrecher, R., Tallamraju, R., Taylor, J., Zimmerman, P.** (1995). A global model of natural volatile organic compound emissions, *J. Geophys. Res.*, 100: 8873–8892.

**Hynynen, J., Palomäki, A., Meriläinen, J., Witick, A., Mánykoski, K.** (2004). Pollution history and recovery of a boreal lake exposed to a heavy bleached pulping effluent load. *Journal of Paleolimnology*. 32: 351-374.

**Jenkins, R.** (1998) “Environmental Regulation and International Competitiveness: A Review of Literature and Some European Evidence”, Discussion Paper Series #9801, The United Nations University Institute for New Technologies.

**Juuti, S., Arey, J., Atkinson, R.** (1990) Monoterpene emission rate measurements from a Monterey pine. *J. Geophys. Res.* 95(6): 7515-7519.

**Kesselmeier, J., Staudt, M.** (1999) Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *J. Atmos Chem.*, 33: 23-88.

**Kim, N., Smith, J.** (2006) Review of science relating to discharges from the Kinleith pulp and paper mill. *Env. Wait. Tec. Rep.* 2005/58.

**Kotzias, D., Fytianos, K., Geiss, F.** (1990). Reaction of monoterpenes with ozone, sulphur dioxide and nitrogen dioxide - gas-phase oxidation of SO<sub>2</sub> and formation of sulphuric acid. *Atmospheric Environment Part A -General Topics.*, 24: 2127-2132.

**Kotzias, D., Nicollin, B., Duane, M., Daiber, R., Eijk, J.V., Rogora, L. Schlitt, H.** (1991) Carbonyls in the forest atmosphere - Evidence for the monoterpene/ozone reaction. *Naturwissenschaften*, 78: 38-40.

**Lacorte, S., Latorre, A., Barceló, D., Rigol, A., Malmqvist, A., Welanders, T.** (2003). Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10): 725-737.

**Lewinsohn, E., Gijzen, M., Muzika, R.M., Barton, K., Croteau, R.** (1993) Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees. *Plant Physiol.*, 101: 1021–1028.

- Loreto, F., Förster, A., Dürr, M., Csiky, O., Seufert, G.** (1998). On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. - *Plant, Cell Environ.*, 21: 101-107.
- Lorio, P.L., Sommers, R. A.** (1986). Evidence of competition for photosynthates between growth processes and oleoresin synthesis in *Pinus taeda* L. *Tree Physiology*. 2: 301-306.
- Low, P., Yeats, A.** (1992). "Do 'Dirty' Industries Migrate?", en *International Trade and the Environment*, Washington D.C., Banco Mundial.
- Llusià, J., Peñuelas, J.** (2000). Seasonal patterns of terpene content and emission rates from seven Mediterranean woody species in field conditions. *American Journal of Botany.*, 87:133-140.
- Martel, P.H., Kovacs, T.G., Voss, R. H.** (1996). Effluents from Canadian pulp and paper mills: A recent investigation of their potential to induce mixed function oxygenase activity in fish. In *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ, (eds). St. Lucie Press , Del Ray Beach , FL , USA . pp 401-412.

**McMaster, M. E., Van Der Kraak, G. J., Munkittrick, K. R.** (1995). Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *J.Comp. Bioc and Phis.*,112 :169-178.

**McMaster, M. E., Parrott, J. L., 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.

**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.

**Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., McCarthy, L.H., Servos, M.R. Van Der Kraak, G.J.** (1998). An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents to alter reproductive parameters in fish. *Toxicol. J. Env. Health* 1: 347-371.

**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.

- Owens, M. K., Lin, C. D., Taylor, C. A., Whisenat, S.G.** (1998). Seasonal patterns of plant flammability and monoterpenoid content in *Juniperus ashei*. *J. Chem. Ecol.*, 24: 2115-2129.
- Palma, H., Quiroz, E., Keim, M.** (2006). Diagnóstico químico ambiental de la bahía de Corral y zonas aledañas del sistema estuarial Valdivia. UACH-Municipalidad de Corral. Pag: 7-13.
- Peñuelas, J., Llusà J.** (2002). Linking photorespiration, monoterpenes, and plant thermotolerance. Enviado a *New Phytologist*.
- Peñuelas, J.** (1996). Efectes globals dels incendis II: contribució del foc a l'alteració de la composició de l'atmosfera. *Ecol del foc*. . 193-194.
- Petersson, G.** (1988). High ambient concentrations of monoterpenes in a Scandinavian pine forest. *Atmospheric Environment Part A – General Topics.*, 22(11); 2617-2619.
- Pino, M., Perillo, G.M., Santamarina, P.** (1994). Residual fluxes in cross section in the Valdivia River Estuary, Chile. *Estuary, Coastal and Shelf Sciences.*, 38: 491-505.
- Saber, D. L.** (2005). Applications of forensic chemistry to environmental work. *Journal Ind Microbiololgy Biotechnology.* 32 (11-12): 665-8.

- Sharkey, T. D., Singsaas, E. L.** (1995). Why plants emit isoprene. *Nature*. 374: 769.
- Smith, R.** (2000). Xylem 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.
- Sorsa, P.** (1994). Competitiveness and Environmental Standards: Some Exploratory Results, Policy Research Working Paper 1249, Washington D.C., Banco Mundial.
- Stringer, R., Johnston, P.** (2001). Chlorine and the Environment: An Overview of the Chlorine Industry. Kluwer Academic Publishers. 5, 107-126.
- Strömvall, A. M., Petersson, G.** (1993). Photooxidant-forming monoterpenes in air plumes from kraft pulp industries. *Environmental Pollution.*, 79,219-223.
- Taylor, D.** (2004). Environmental Forensic files, Innovative technologies. *Environmental health perspectives.*, 112 (2),88-89.
- Terry, G. M., Stokes, N. J., Hewitt, C. N., Mansfield, T. A.** (1995). Exposure to isoprene promotes flowering in plants. *J. Exp. Bot.* 46: 1629-1631.
- 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.

**Tolocka, M., Heaton, K., Zordan, C., Johnston, M.** (2006). Chemistry of Particle Inception and Growth during  $\alpha$ -Pinene Ozonolysis. *Environ. Sci. Technol.*, 40,1843-1848.

**Tortorelli, M., Hernández, D.** (1995). Calidad de agua de un ambiente acuático sometido a efluentes contaminantes. Ecosistemas de aguas continentales. Tomo I. Ediciones Sur. La Plata – Argentina. 217- 230.

**U.S. EPA,** (2000). Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. EPA 823-B-00-007.

**U.S. Environmental Protection Agency.** (1998). EPA's contaminated sediment management strategy. EPA- 823-R-98-001. Office of Water, Washington, DC.

**Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster , M.E. , Portt, C.B., Chang, J.P.** (1992). Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *J Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115:224-233.

**Williams, T.G., Carey, J.H., Burnison, B.K., Dixon , D.G., Lee, H. B.** (1996). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* ) mixed function oxygenase responses caused by

unbleached and bleached pulp mill effluents: A laboratory-based study. In Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents, Servos MR, Munkittrick KR, Carey JH, Van Der Kraak GJ (eds). St. Lucie Press , Del Ray Beach , FL , USA . pp 379-389.

## **ANEXOS**

## Figuras

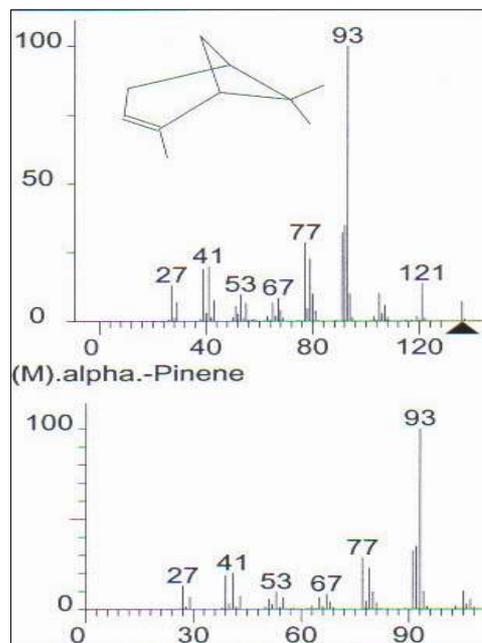


Figura 1. Estructura y espectro de  $\alpha$ -pineno.

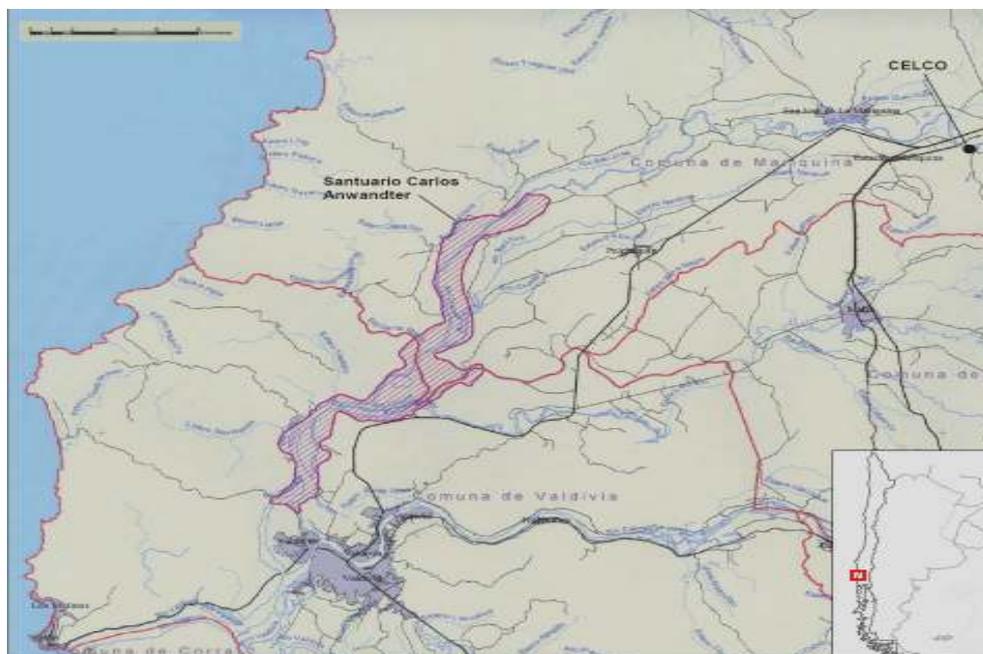


Figura 2. Ubicación del Santuario Carlos Anwandter en el río Cruces.



Figura 3. Fotografía satelital de las estaciones de muestreo (FSL: Fuerte San Luis, N1:Nanihue1, N2: Nanihue 2, N3: Nanihue 3, N4: Nanihue 4, N4-5: Nanihue 4-5, N5: Nanihue 5, N6: Nanihue 6, N7: Nanihue 7, PN: Puente Nanihue, SB: Salida Bañados, SM: San Martín, SMa: Santa María, B: Belloto, PC: Puente Cudico, C1: Cudico 1, C2: Cudico 2, C3: Cudico 3, BIR: Bajo Isla Rialejo).



Figura 4. Fotografía satelital de las estaciones de muestreo (Bahía Corral, Punta Castillito, Las Coloradas, carboneros).

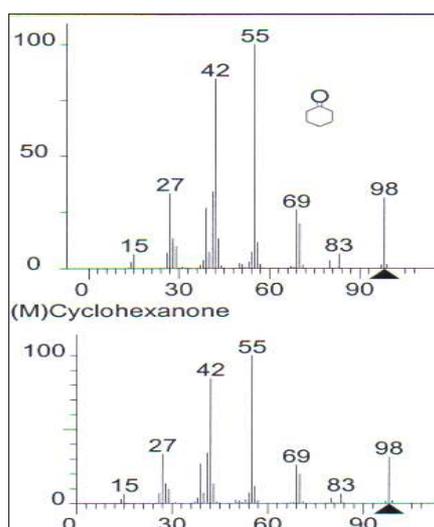


Figura 5. Estructura y espectro del estándar interno Ciclohexanona.

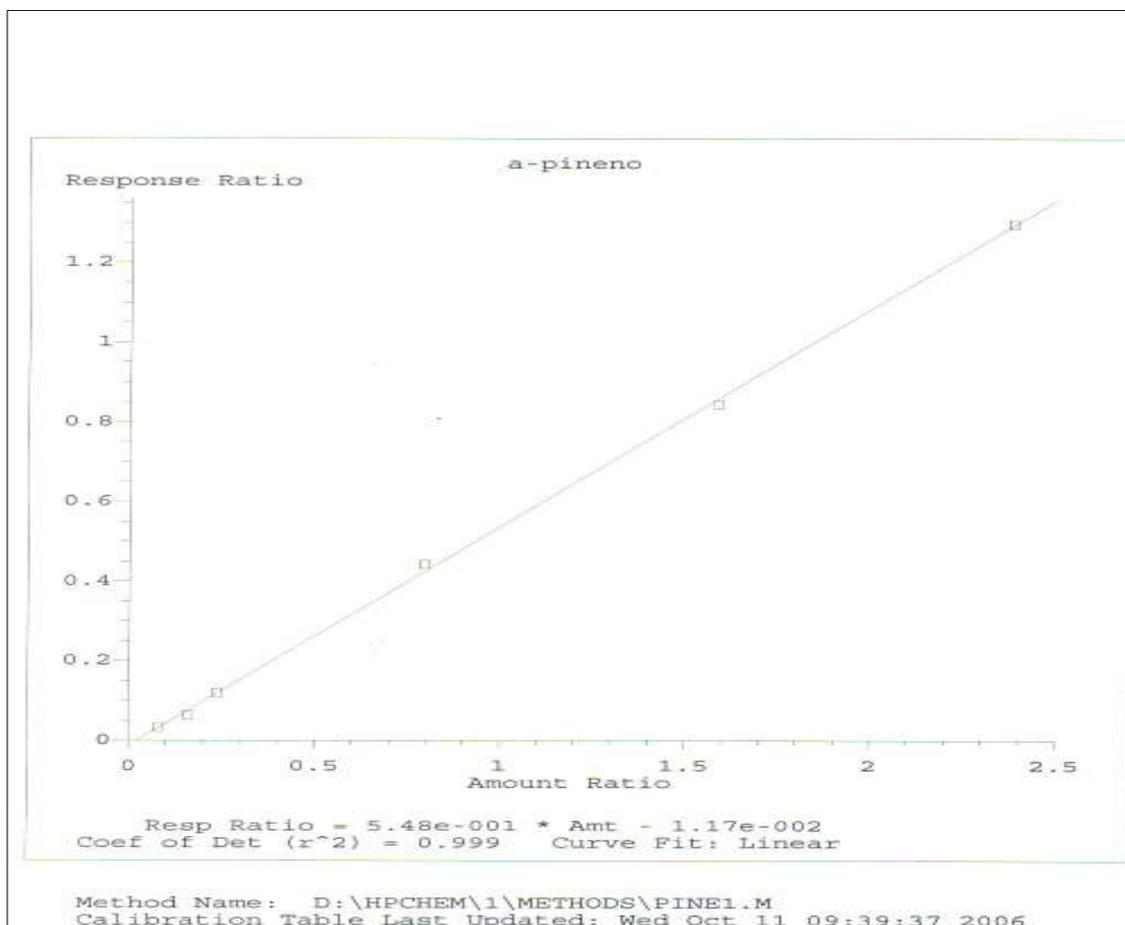


Figura 6. Curva de calibración de  $\alpha$ -pineno.

$$LD = \frac{C_{qnt} * M_{moc} * V_f * D_f}{V_i * W_s * D}$$

Figura 7. Formula de límite de detección para cuantificación de  $\alpha$ -pineno en cromatógrafo de gas-masa.

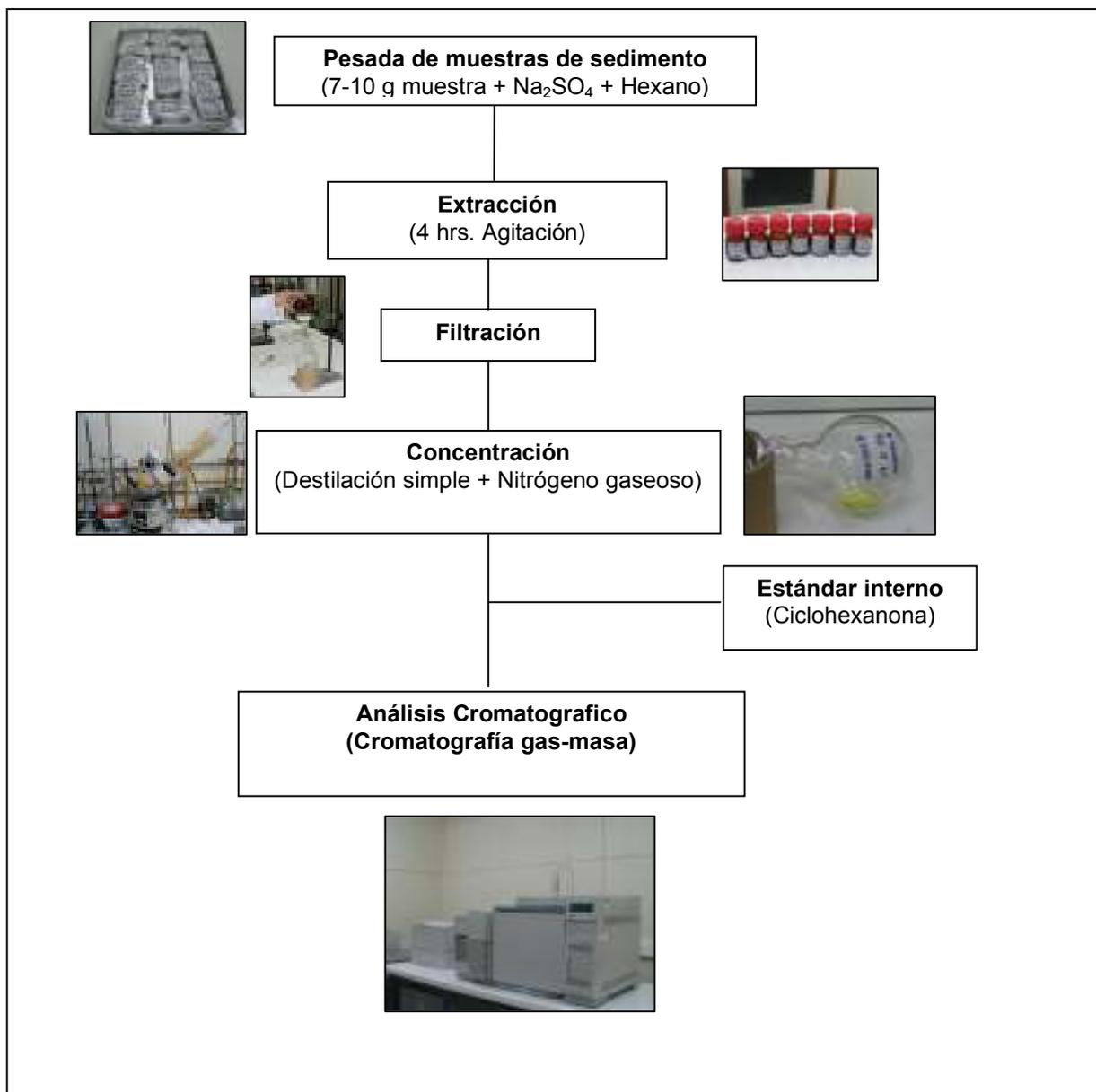


Figura 8. Diagrama del procedimiento para el análisis de muestras de sedimento.



Figura 9. Cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masa (modelo HP 6890).

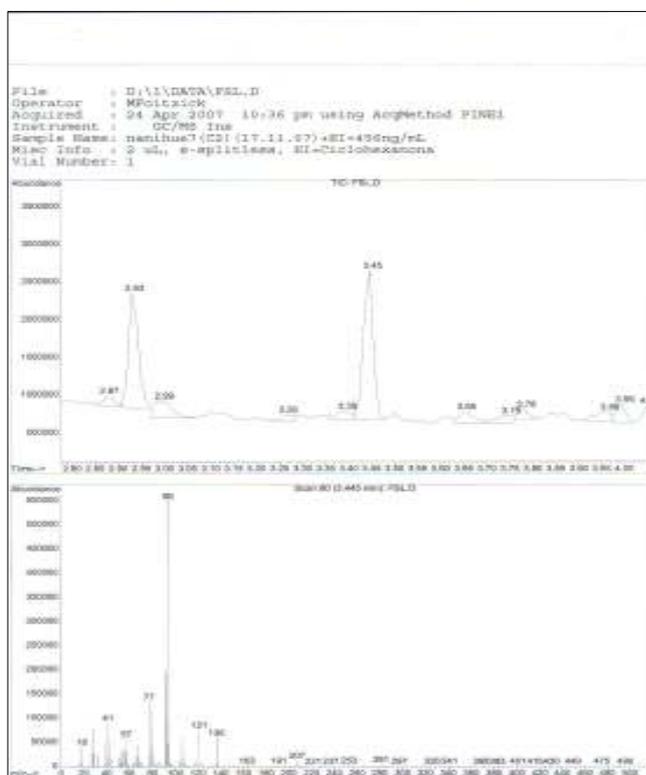


Figura 10. Ejemplo de cromatograma de muestra de sedimento.

alfa-pineno (16-2-1006 ng/mL) = 456 ng/mL ST				
Calibration Last Updated: Thu Nov 23 12:17:54 2006				
Quantitation Report - Summary				
Information from Data File:				
File	D:\1\DATA\PSL.D			
Operator	MPoltrick			
Acquired	24 Apr 2007 10:35 pm using AcqMethod FINE1			
Sample Name	nanihue7(C2)(17.11.07)+ST=456ng/mL			
Misc Info	2 uL, 8-splitless, ST=Ciclohexanona			
Vial Number	1			
CurrentMeth	D:\HP\CHEM\1\METHODS\PCNN1.M			
Quantitation Settings:				
Reference Peak Window:	10.00 Percent			
Non-Reference Peak Window:	5.00 Percent			
Correlation Window:	0.02 Minutes			
Default Multiplier:	1.00			
Default Sample Concentration:	0.00			
Peak Type Decoding:	* -> True Reference Peak R -> Manually re-integrated XXX -> Compound reference ISTD			
#	Compound	Ret. Time	Concentration	Peak Type
1	Ciclohexanona	2.93	456.0 ng/mL	*ISTD14
2	$\alpha$ -pineno	3.40	11.8 ng/mL	#
END OF REPORT				
# Qualifiers Not Satisfied				
Tue Apr 24 22:45:05 2007				

Figura 11. Datos entregados por el cromatógrafo de gas de la concentración de  $\alpha$ - pineno.

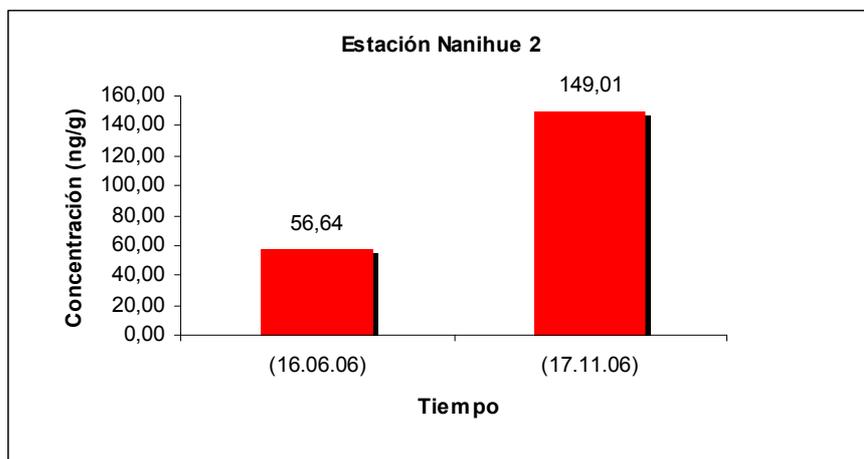


Figura 12. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 2.

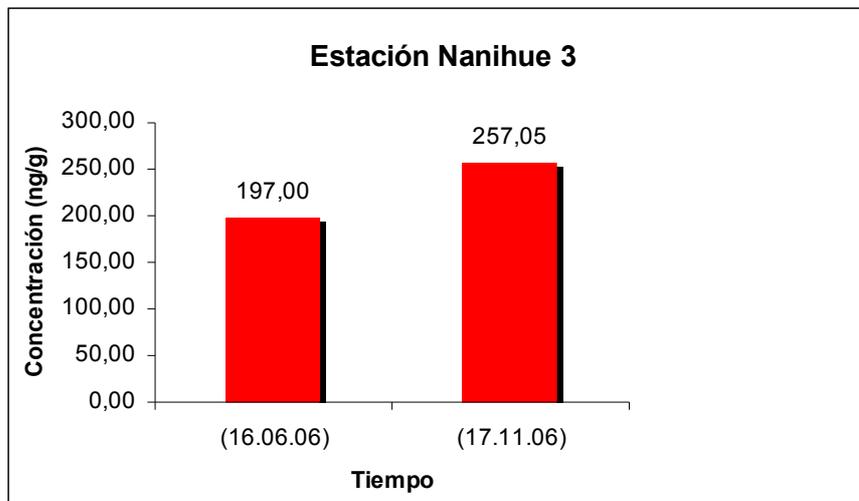


Figura 13. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 3.

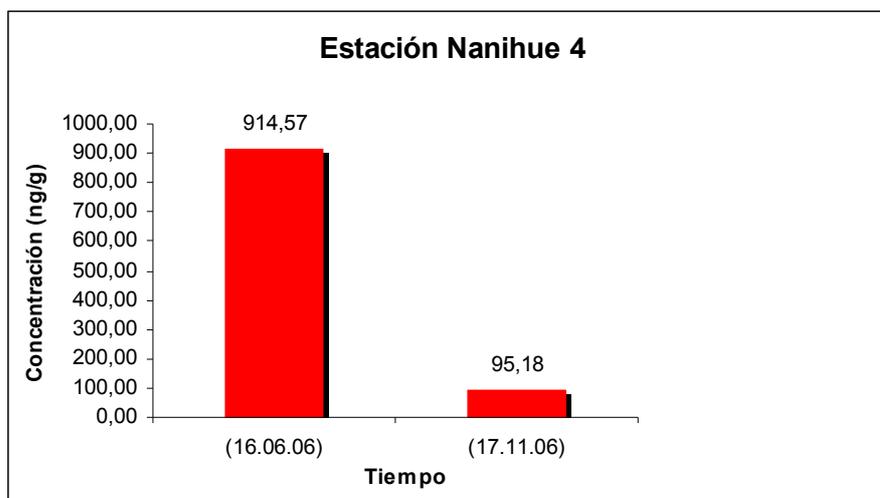


Figura 14. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 4.

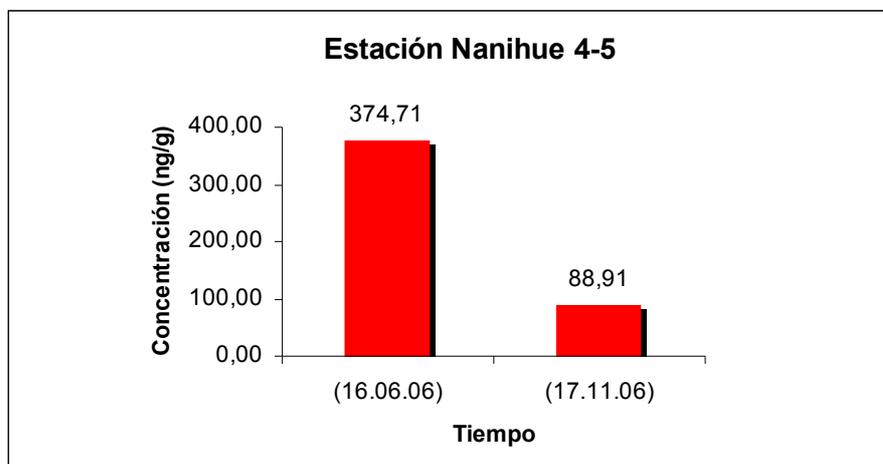


Figura 15. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 4-5.

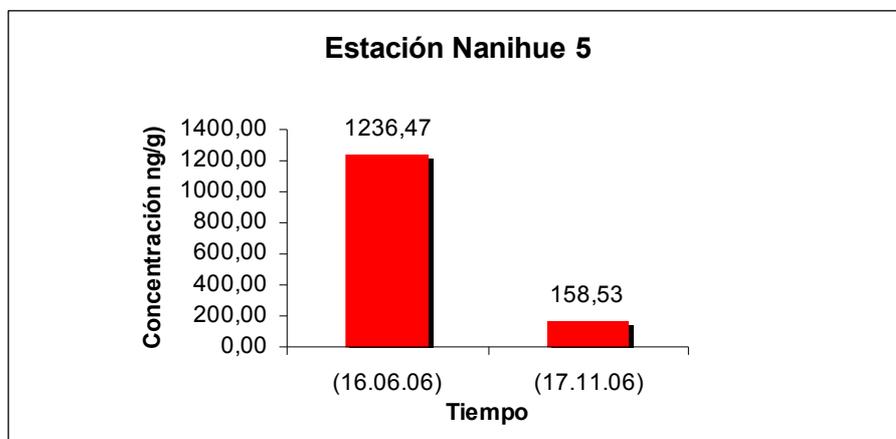


Figura 16. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 5.

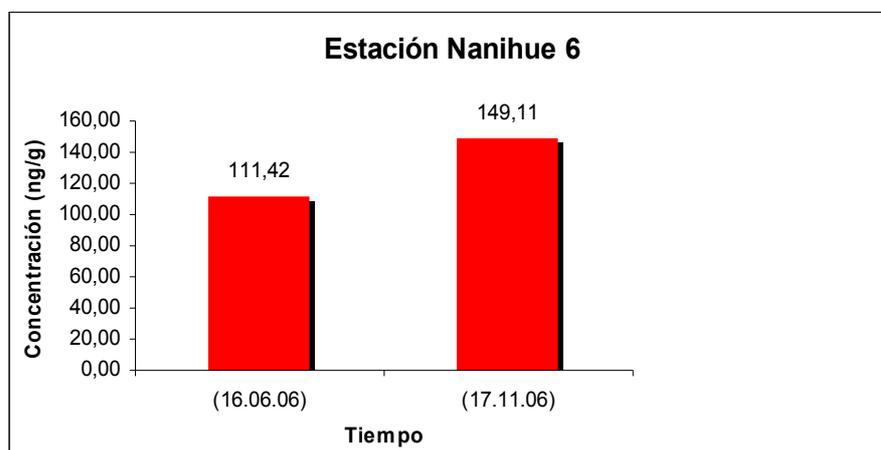


Figura 17. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 6.

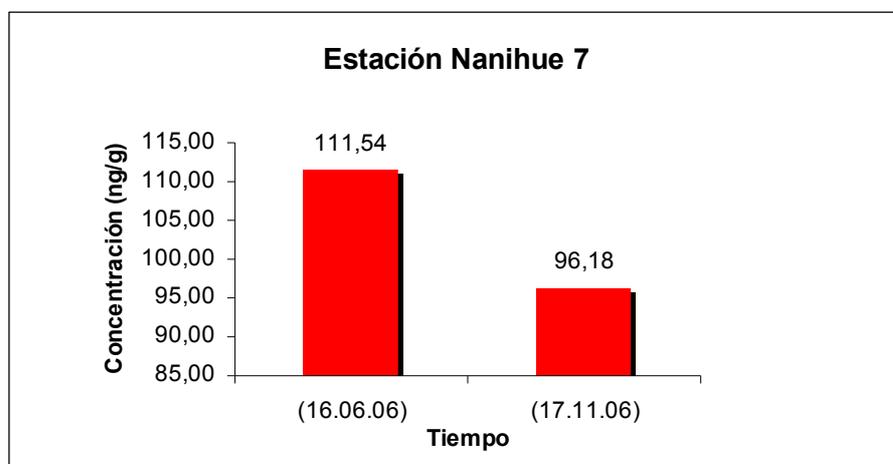


Figura 18. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Nanihue 7.

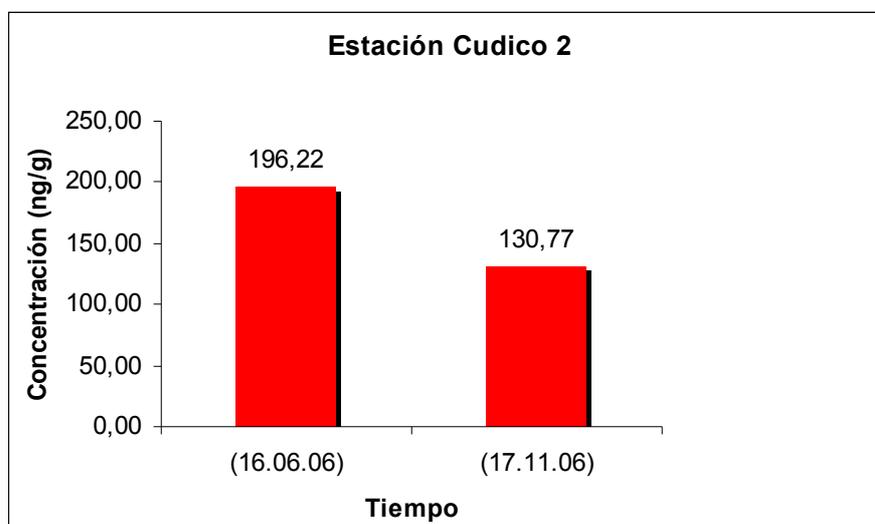


Figura 19. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Cudico 2.

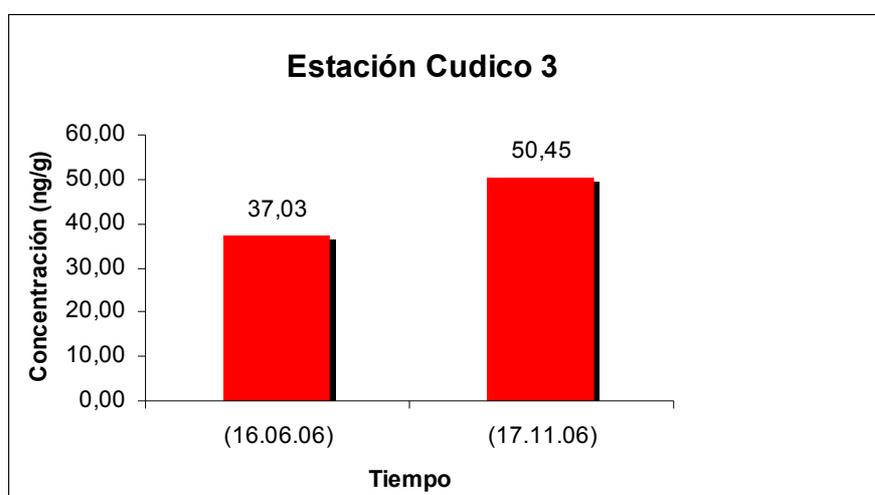


Figura 20. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Cudico 3.

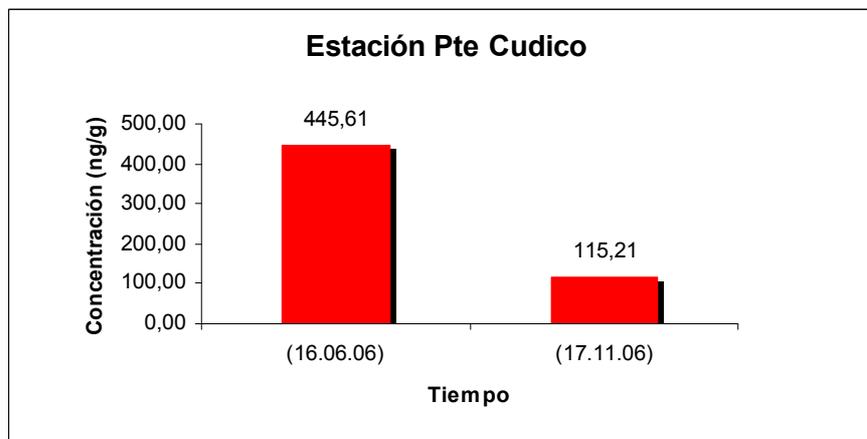


Figura 21. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Puente Cudico.

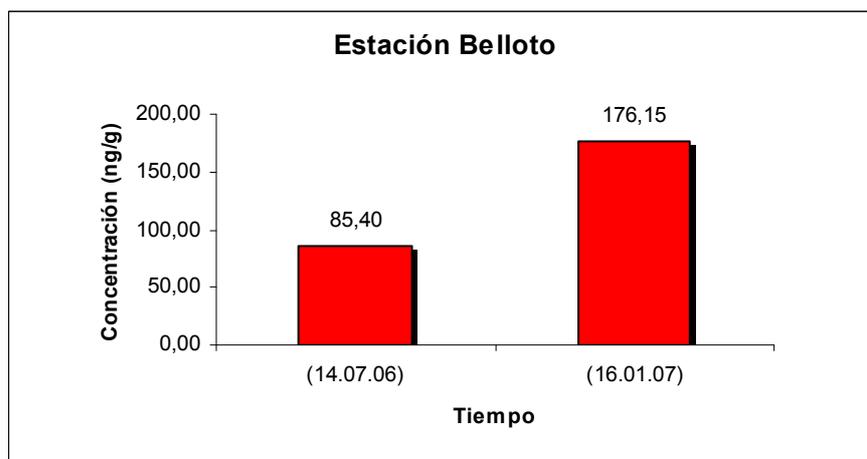


Figura 22. Gráfico de variación temporal del promedio de la concentración de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s. para la estación Belloto.

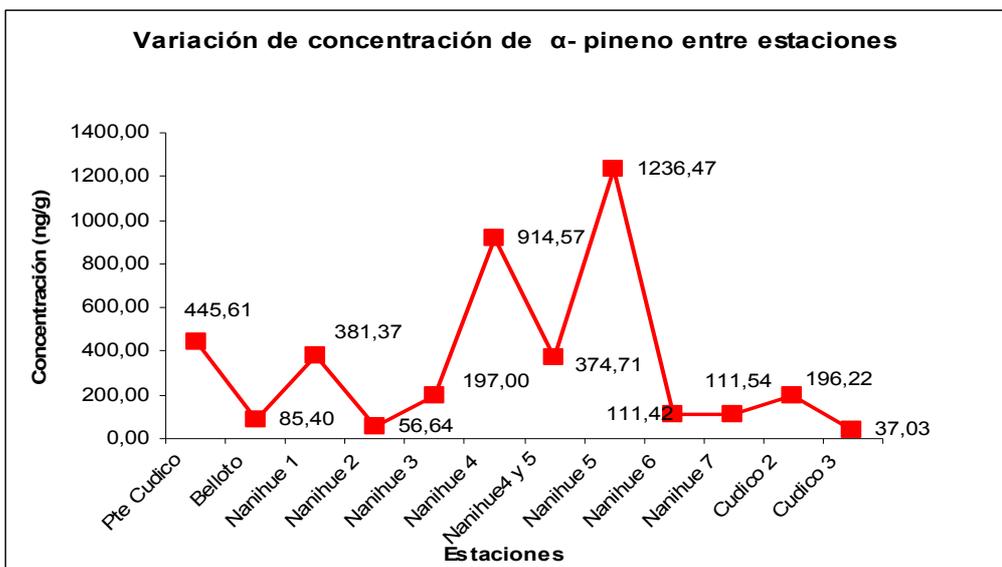


Figura 23. Gráfico de variación de concentraciones promedio de  $\alpha$ -pineno entre las estaciones del muestreo del 16.06.06.

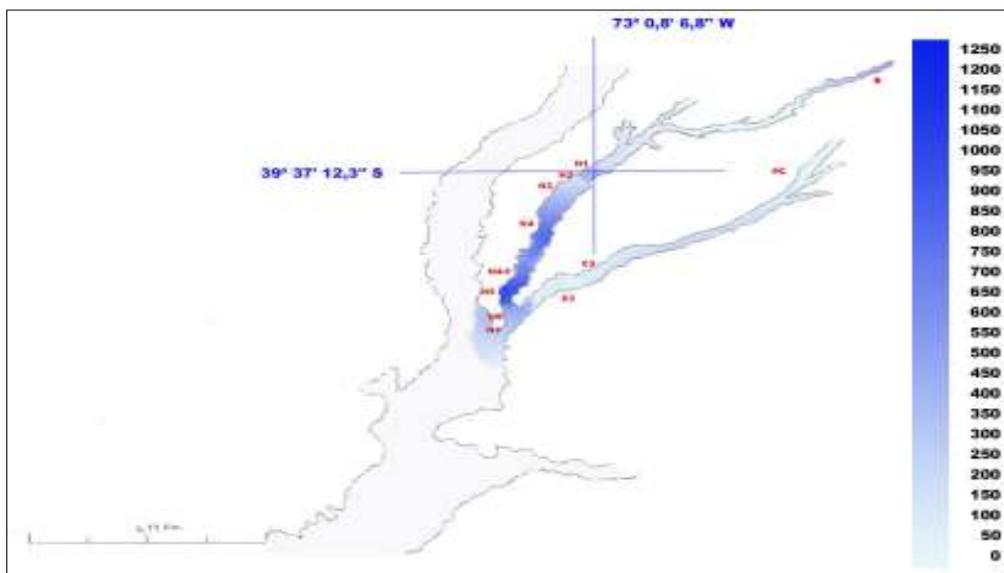


Figura 24. Concentración (ng/g) de  $\alpha$ -pineno, representada por intensidad de coloración en las diferentes estaciones del muestreo realizado el 16.06.2006.

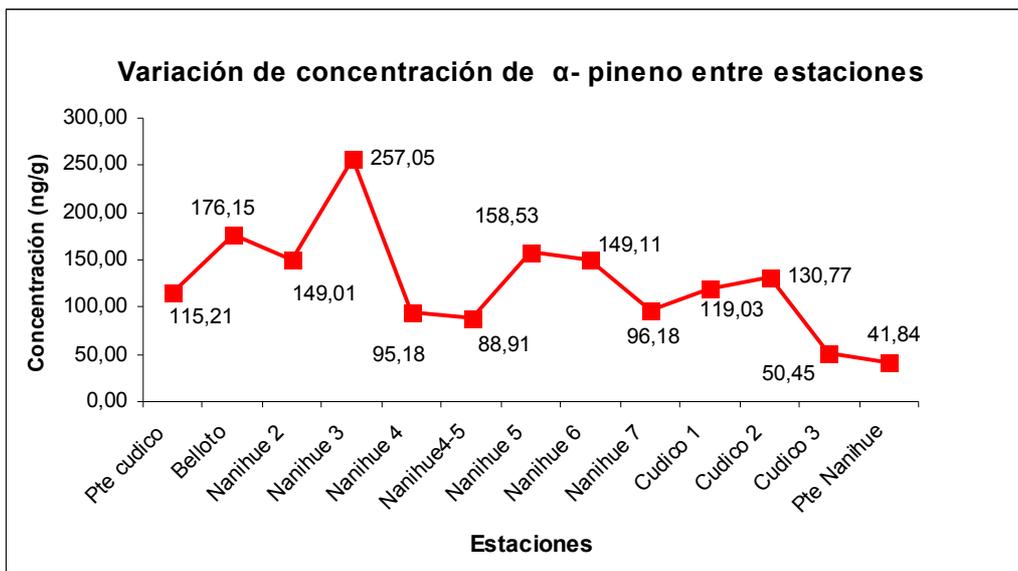


Figura 25. Gráfico de variación de concentraciones promedio de  $\alpha$ -pineno entre las estaciones del muestreo del 17.11.06.

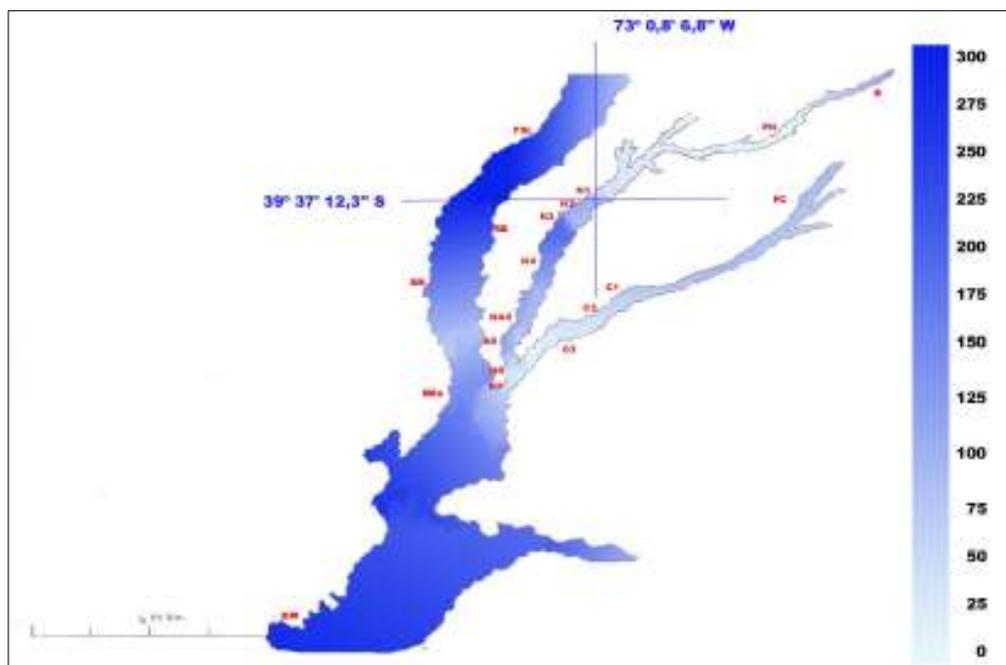


Figura 26. Concentración (ng/g) de  $\alpha$ -pineno, representada por intensidad de coloración en las diferentes estaciones del muestreo realizado el 17.11.2006.

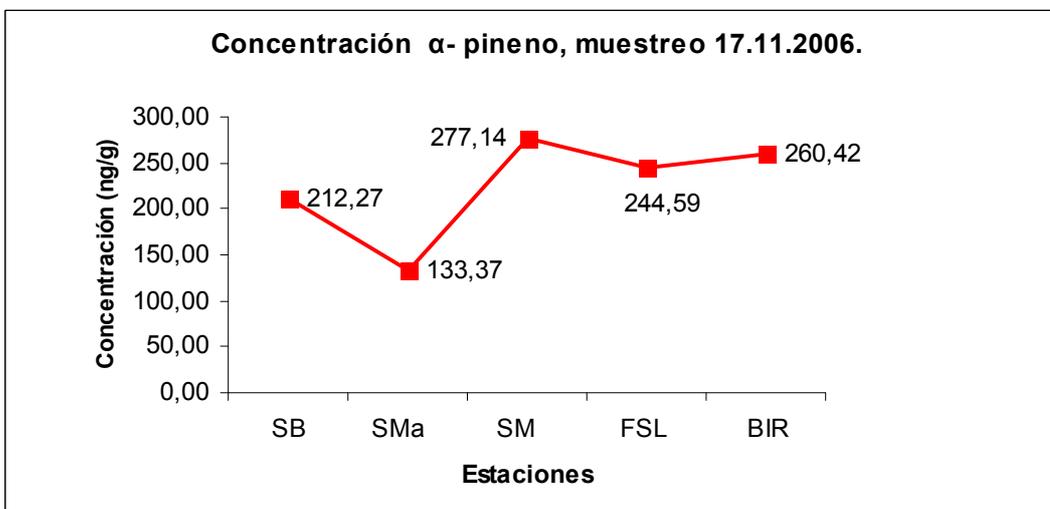


Figura 27. Gráfico de variación de concentraciones promedio de  $\alpha$ -pineno entre otras estaciones muestreadas el 17.11.06.

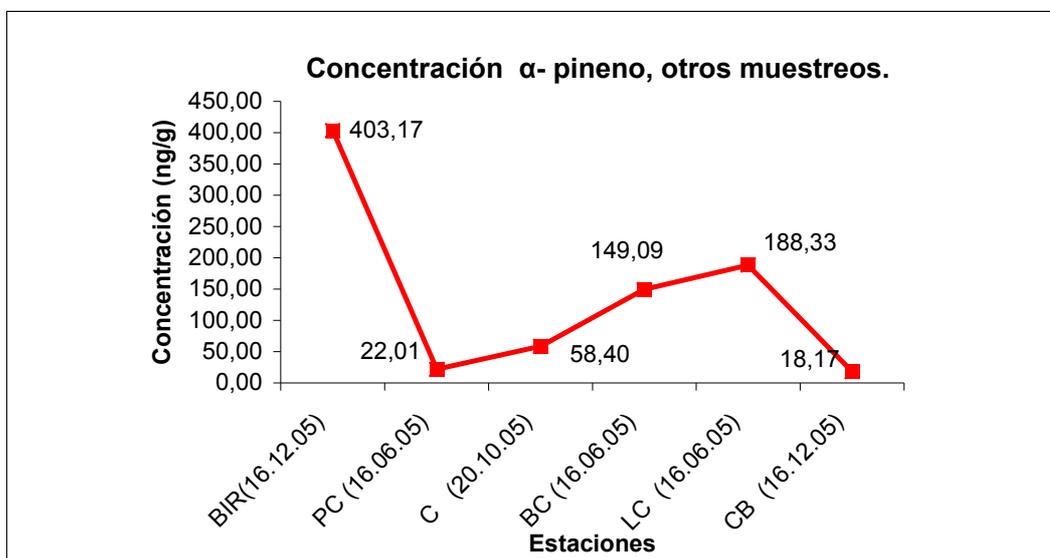


Figura 28. Gráfico de variación de concentración de de  $\alpha$ -pineno en muestreos del año 2005.

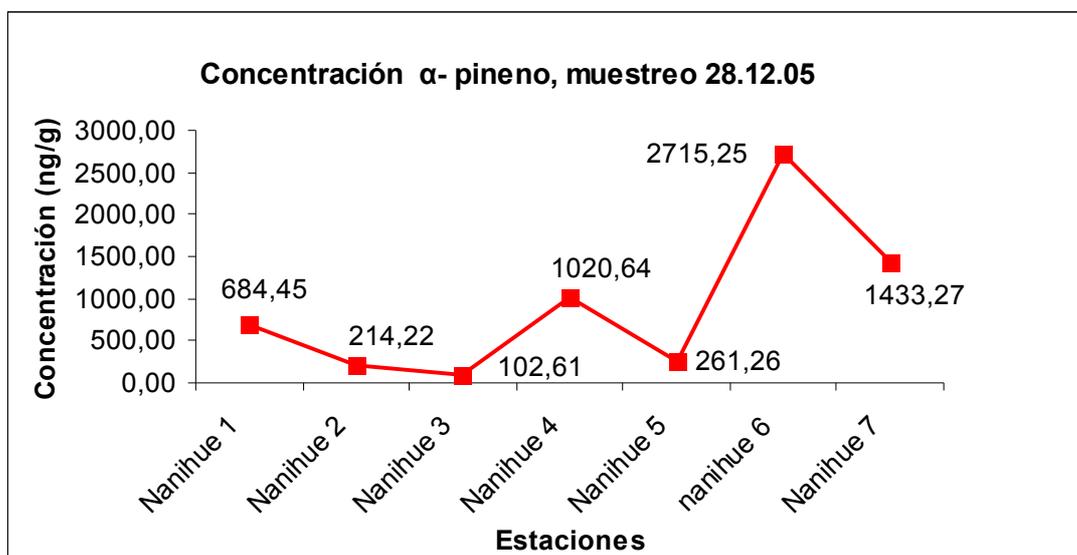


Figura 29. Gráfico de concentraciones de  $\alpha$ -pineno en ng/g.p.s., correspondiente a un muestreo realizado el 28.12.05 en el río Nanihue.

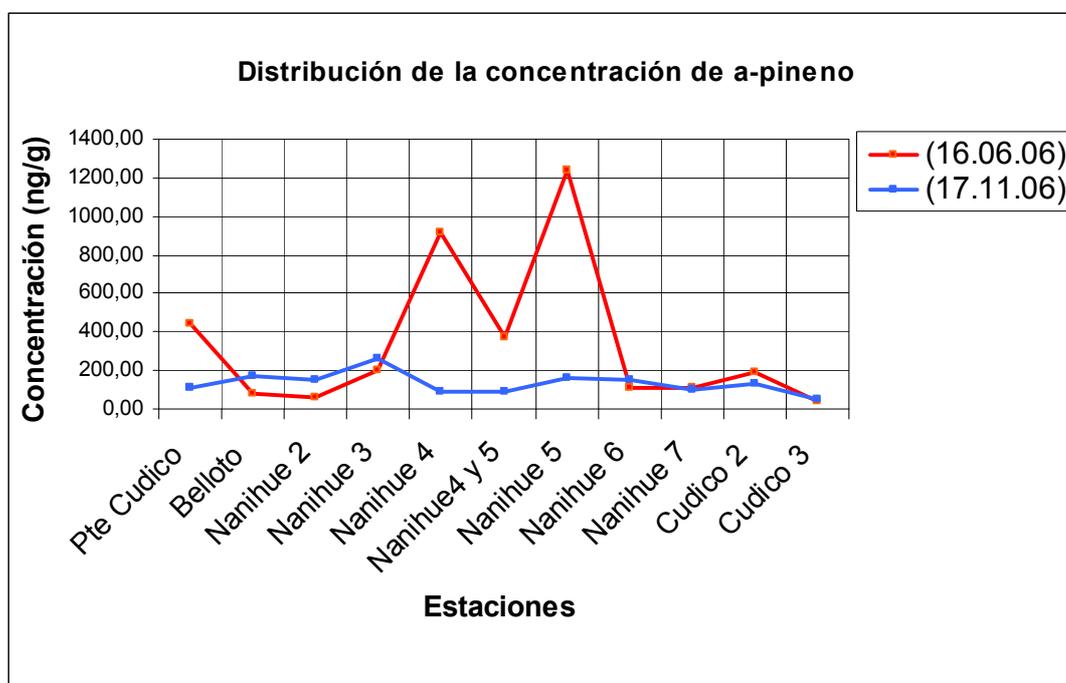


Figura 30. Gráfico de concentraciones promedio de  $\alpha$ -pineno, correspondiente a cada una de las estaciones para los dos muestreos prospectivos.

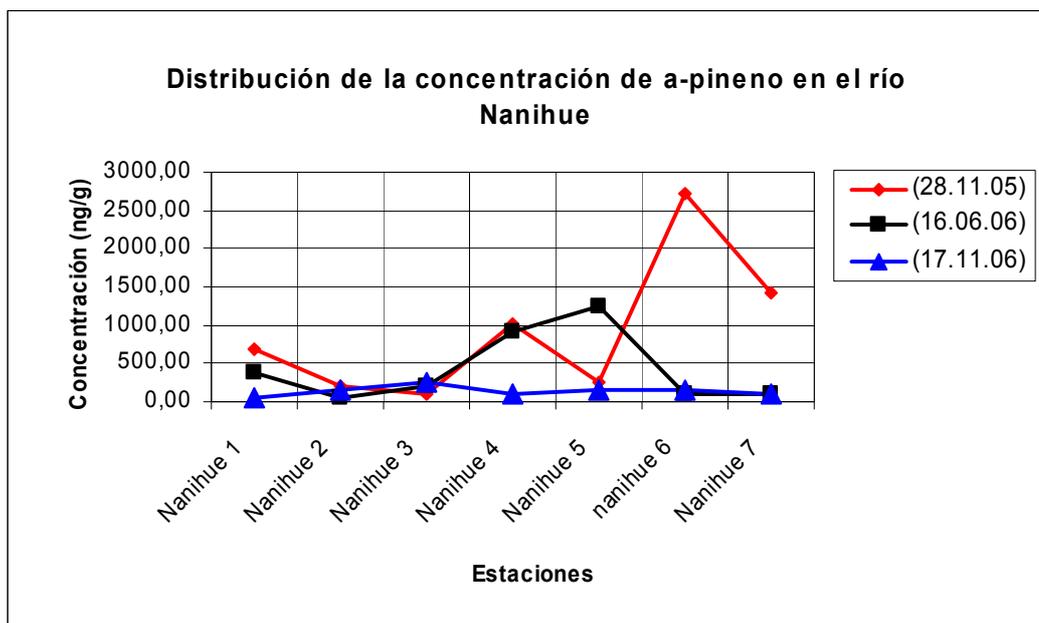


Figura 31. Gráfico de la distribución espacio temporal de la concentración de  $\alpha$ -pineno en el río Nanihue.

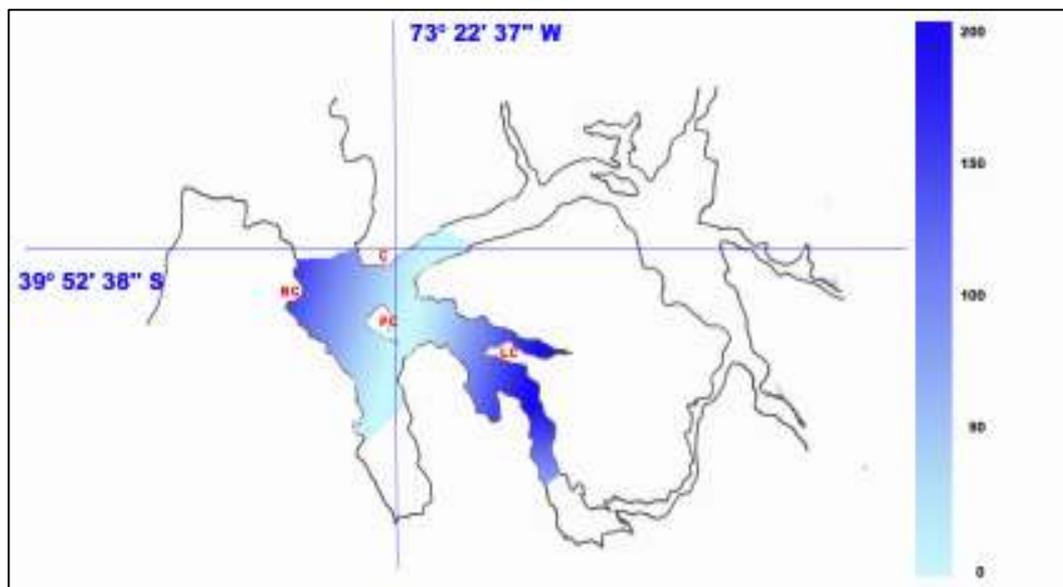


Figura 32. Concentración (ng/g) de  $\alpha$ -pineno, representada intensidad de coloración en las diferentes estaciones de muestreo del año 2005 (sector Bahía Corral y alrededores).

$$X \text{ (ng/g p. seco)} = \frac{Y \text{ (ng/g p. Húmedo)}}{1 - \frac{\% \text{ Humedad}}{100}}$$

**X** = nanogramos de  $\alpha$ -pineno por gramos de peso seco de la muestra.

**Y** = nanogramos de  $\alpha$ -pineno por gramo de peso húmedo de la muestra.

Figura 33. Formula de reconversión a peso seco de muestras.

## Tablas

Tabla 1. Georeferenciación de las estaciones de muestreo.

<b>Estaciones de Muestreo</b>	
1) Nanihue 1	W 73° 0.8' 6.8'' S 39° 37' 12.3''
2) Nanihue 2	W 73° 0.8' 17.2'' S 39° 37' 17.3''
3) Nanihue 3	W 73° 0.8' 37.3'' S 39° 37' 28.1''
4) Nanihue 4	W 73° 0.8' 57.8'' S 39° 38' 8.4''
5) Nanihue entre 4 y 5	W 73° 0.9' 25.4'' S 39° 38' 52.4''
6) Nanihue 5	W 73° 0.9' 50.5'' S 39° 37' 13.3''
7) Nanihue 6	W 73° 0.9' 40.6'' S 39° 39' 40.1''
8) Nanihue 7	W 73° 0.9' 51.1'' S 39° 39' 52.3''
9) Cudico 1	W 73° 0.7' 31.5'' S 39° 38' 38.1''
10) Cudico 2	W 73° 0.7' 48.2'' S 39° 38' 48.6''
11) Cudico 3	W 73° 0.8' 37.3'' S 39° 39' 6.9''
12) Belloto	W 73° 0.2' 40'' S 39° 35' 37''
13) Puente Cudico	W 73° 0.4' 8.2'' S 39° 37' 19.2''
14) Puente Nanihue	W 73° 0.2' 26.9'' S 39° 36' 17.7''
15) Bajo Isla Rialejo	W 73° 13' 18.2'' S 39° 43' 17.8''
16) Fuerte San Luis	W 73° 0.8' 56.8'' S 39° 36' 16.7''
17) Salida Bañados	W 73° 10' 26.6'' S 39° 37' 37.8''
18) San Martin	W 73° 11' 2.9'' S 39° 38' 23.8''
19) Santa Maria	W 73° 10' 45.1'' S 39° 34' 56.6''
20) Pta Castillito	W 73° 23' 12'' S 39° 53' 34''
21) Carboneros	W 73° 22' 37'' S 39° 52' 38''
22) Bahía Corral	W 73° 25' 29.2'' S 39° 53' 8.9''
23) Las Coloradas	W 73° 19' 55'' S 39° 54' 44''
24) Cabo Blanco	W 73° 25' 35.6'' S 39° 46' 65.5''

Tabla 2. Porcentaje de humedad para todas las muestras.

Análisis de humedad			
	Pi(g)	Pf(g)	<b>PS (%)</b>
Puente Cudico (14.07.06)	5,200	3,222	<b>61,96</b>
Belloto (14.07.06)	3,126	2,470	<b>79,17</b>
Nanihue1 (16.06.06)	4,511	1,379	<b>30,57</b>
Nanihue2 (16.06.06)	4,619	2,611	<b>56,53</b>
Nanihue3 (16.06.06)	3,278	0,966	<b>29,47</b>
Nanihue4 (16.06.06)	3,092	0,981	<b>31,73</b>
Nanihue5 (16.06.06)	3,990	1,684	<b>42,21</b>
Nanihue6 (16.06.06)	4,167	1,444	<b>34,65</b>
Nanihue7 (16.06.06)	6,663	2,470	<b>37,07</b>
Cudico2 (16.06.06)	4,468	1,419	<b>31,76</b>
Cudico3 (16.06.06)	6,237	2,810	<b>45,05</b>
Nanihue4 y 5 (16.06.06)	5,271	1,745	<b>33,11</b>
Bajo Isla Rialejo (16.12.05)	6,482	2,580	<b>39,81</b>
Punta Castillito (16.06.05)	6,132	4,931	<b>80,41</b>
Carboneros (20.10.03)	5,445	3,914	<b>71,88</b>
Bahía Corral (16.06.05)	4,350	2,959	<b>68,02</b>
Las Coloradas (16.06.05)	9,548	7,648	<b>80,10</b>
Cabo Blanco (16.12.05)	7,497	4,479	<b>59,74</b>
Cudico 1 (17.11.06)	3,713	1,116	<b>30,06</b>
Cudico 2 (17.11.06)	4,052	1,848	<b>45,61</b>
Cudico 3 (17.11.06)	4,354	1,381	<b>31,72</b>
Nanihue 2 (17.11.06)	2,784	0,975	<b>35,02</b>
Nanihue 3 (17.11.06)	5,202	1,565	<b>30,08</b>
Nanihue 4 (17.11.06)	4,131	1,421	<b>34,40</b>
Nanihue4-5 (17.11.06)	4,086	1,344	<b>32,89</b>
Nanihue 5 (17.11.06)	4,445	1,802	<b>40,54</b>
Nanihue 6 (17.11.06)	5,288	1,967	<b>37,20</b>
Nanihue 7 (17.11.06)	3,599	1,415	<b>39,32</b>
Nanihue 8 (17.11.06)	5,197	2,463	<b>47,39</b>
Nanihue 9 (17.11.06)	4,288	1,586	<b>36,99</b>
Nanihue 10 (17.11.06)	4,170	1,758	<b>42,16</b>
Nanihue 11 (17.11.06)	4,850	2,478	<b>51,09</b>
Nanihue 12 (17.11.06)	4,715	1,790	<b>37,96</b>
Puente Nanihue (16.01.07)	6,611	5,181	<b>78,37</b>
Belloto (16.01.07)	3,758	1,688	<b>44,92</b>
Pte Cudico (16.01.07)	8,681	6,831	<b>78,69</b>

Tabla 3. Concentración de  $\alpha$ - pineno ajustado a peso seco de muestra para muestreo realizado 16.06.06.

Estaciones	Conc. $\alpha$ - pineno 1 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ - pineno 2 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ - pineno 3 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. promedio $\alpha$ - pineno ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Pte. Cudico</b>	0,712	0,365	0,260	<b>0,446</b>
<b>Belloto</b>	0,0258	0,144	0,0869	<b>0,0854</b>
<b>Nanihue1</b>	0,246	0,666	0,231	<b>0,381</b>
<b>Nanihue2</b>	0,0335	0,109	0,279	<b>0,0567</b>
<b>Nanihue3</b>	0,145	0,423	0,0234	<b>0,197</b>
<b>Nanihue4</b>	0,328	2,13	0,287	<b>0,915</b>
<b>Nanihue 4-5</b>	0,111	0,940	0,0730	<b>0,375</b>
<b>Nanihue5</b>	0,450	1,92	1,34	<b>1,24</b>
<b>Nanihue6</b>	0,124	0,116	0,0940	<b>0,111</b>
<b>Nanihue7</b>	0,0442	0,0742	0,216	<b>0,112</b>
<b>Cudico2</b>	0,0214	0,510	0,0576	<b>0,196</b>
<b>Cudico3</b>	0,0478	0,0304	0,0329	<b>0,0370</b>

Tabla 4. Concentración de  $\alpha$ - pineno ajustada a peso seco de muestras recolectadas el 17.11.06 y 16.01.07.

Estaciones	Conc. $\alpha$ -pineno 1 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ -pineno 2 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ -pineno 3 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. Promedio $\alpha$ - pineno ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Pte Cudico (16.01.07)</b>	0,139	0,0963	0,110	<b>0,115</b>
<b>Belloto (16.01.07)</b>	0,197	0,149	0,183	<b>0,176</b>
<b>Nanihue 2 (17.11.06)</b>	0,0468	0,129	0,313	<b>0,149</b>
<b>Nanihue 3 (17.11.06)</b>	0,0550	0,501	0,216	<b>0,257</b>
<b>Nanihue 4 (17.11.06)</b>	0,153	0,0297	0,103	<b>0,0952</b>
<b>Nanihue 4-5 (17.11.06)</b>	0,131	0,0714	0,0640	<b>0,0889</b>
<b>Nanihue 5 (17.11.06)</b>	0,200	0,115	0,162	<b>0,159</b>
<b>Nanihue 6 (17.11.06)</b>	0,126	0,181	0,140	<b>0,149</b>
<b>Nanihue 7 (17.11.06)</b>	0,0107	0,815	0,196	<b>0,962</b>
<b>Cudico 1 (17.11.06)</b>	0,0931	0,146	0,118	<b>0,119</b>
<b>Cudico 2 (17.11.06)</b>	0,0848	0,0900	0,218	<b>0,131</b>
<b>Cudico 3 (17.11.06)</b>	0,0640	0,0401	0,0472	<b>0,0505</b>
<b>Pte. Nanihue (16.01.07)</b>	0,0197	0,0554	0,0505	<b>0,0418</b>

Tabla 5. Concentración de  $\alpha$ - pineno ajustada a peso seco de muestras tomadas en el año 2006.

Estaciones	Conc. $\alpha$ - pineno 1 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ - pineno 2 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ - pineno 3 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. Promedio $\alpha$ - pineno ( $\mu\text{g/g}$ )
Salida Bañados (17.11.06)	0,0451	0,142	0,449	<b>0,212</b>
Santa Maria (17.11.06)	0,0800	0,235	0,157	<b>0,133</b>
San Martín (17.11.06)	0,307	0,270	0,254	<b>0,277</b>
Fuerte San Luis (17.11.06)	0,469	0,000	0,264	<b>0,245</b>
Bajo Isla Rialejo (17.11.06)	0,276	0,163	0,343	<b>0,260</b>

Tabla 6. Concentración de  $\alpha$ - pineno ajustada a peso seco de muestras tomadas en el año 2005.

Estaciones	Conc. $\alpha$ -pineno 1 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. $\alpha$ -pineno 2 ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. Promedio $\alpha$ - pineno 1 ( $\mu\text{g/g}$ )
Bajo Isla Rialejo(16.12.05)	0,711	0,0957	<b>0,403</b>
Pta. Castillito (16.06.05)	0,0198	0,0242	<b>0,0220</b>
Carboneros (20.10.05)	0,0472	0,0696	<b>0,0584</b>
B. Corral (16.06.05)	0,0859	0,212	<b>0,149</b>
Las Coloradas (16.06.05)	0,188		<b>0,188</b>
Cabo Blanco (16.12.05)	0,0330	0,00330	<b>0,0182</b>

Tabla 7: Concentración de  $\alpha$ - pineno ajustada a peso seco de muestras tomadas en el Río Nanihue en el año 2005.

<b>Muestreo 28.12.05</b>	<b>Conc. <math>\alpha</math>-pineno (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<b>Nanihue 1</b>	0,684
<b>Nanihue 2</b>	0,214
<b>Nanihue 3</b>	0,103
<b>Nanihue 4</b>	1,02
<b>Nanihue 5</b>	0,261
<b>nanihue 6</b>	2,72
<b>Nanihue 7</b>	1,43