



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales
Y Oceanográficas



**Detección de actividad estrogénica en compuestos presentes
en efluentes de celulosa Kraft usando *Daphnia magna* como
bioindicador**

Alumno(a) : Daniela López
Profesor(a) Tutor : Dra. Gladys Vidal

Concepción, 6 de noviembre de 2007

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCION | 3 |
| 2. HIPÓTESIS | 8 |
| 3. OBJETIVOS | 8 |
| 3.1. Objetivo general | 8 |
| 3.2. Objetivos específicos | 8 |
| 4. MATERIALES Y METODOS | 9 |
| 4.1. Efluentes y Fitoesteroles | 9 |
| 4.1.1. Efluente | 9 |
| 4.1.2. Fitoesteroles | 9 |
| 4.2. Bioensayos agudos y crónicos a través de <i>Daphnia magna</i> | 9 |
| 4.2.1. <i>Cultivos de Daphnia magna.</i> | 9 |
| 4.2.2. Determinación de toxicidad aguda del efluente en <i>D. magna.</i> | 10 |
| 4.2.3. Toxicidad aguda del β -sitoesterol y el estigmaesterol. | 10 |
| 4.2.4. Determinación de toxicidad crónica en <i>D. magna.</i> | 11 |
| 4.2.5. Metodología para evaluar la estrogénicidad en <i>D. magna.</i> | 11 |
| 5.- PLAN DE TRABAJO | 14 |
| 5.1 Carta Gantt | 14 |
| 6. RESULTADOS | 15 |
| 6.1 Resultados preliminares | 15 |
| 6.1.1 <i>Toxicidad aguda del β-sitoesterol.</i> | 15 |
| 7. REFERENCIAS | 23 |

RESUMEN

En la cuenca del Biobío Chile se encuentran 3 industrias de celulosa Kraft blanqueada, las cuales producen cerca de 1.230.000 ton/año. El efluente generado por estas industrias posee materia orgánica, color y toxicidad. Además contiene fitoesteroides, que son compuestos que pertenecen a la fracción de los extractivos de la madera liberados durante el proceso de pulpage. Estos compuestos pueden alterar la reproducción, desarrollo y crecimiento (disrupción endocrina) de organismos acuáticos expuestos a efluentes de celulosa Kraft descargados al cuerpo de agua receptor. Para mitigar el impacto generado por la descarga de fitoesteroides de las tres plantas que puede alcanzar hasta 18 Kg./d, se emplean tecnologías de tratamiento biológico a los efluentes de celulosa Kraft. Sin embargo, aunque se implementen nuevas tecnologías, existen compuestos que a bajas concentraciones pueden causar alteraciones en organismos acuáticos en los sitios donde se realizan las descargas de los efluentes tratados. Entre los compuestos que producen actividad endocrina se encuentran en mayor proporción dentro de los fitoesteroides presentes en el efluente de celulosa Kraft el β -sitosterol y el estigmasterol. Una forma de medir los efectos de este tipo de efluente y sus compuestos específicos es a través de los bioensayos con organismos bioindicadores, los cuales permiten detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente de producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Para determinar la toxicidad crónica de estos compuestos, se examinará la toxicidad del influente, efluente y de sus compuestos específicos (β -sitosterol y estigmasterol), para así poder conocer y determinar si estos compuestos presentan actividad estrogénica sobre *Daphnia magna*.

1.- INTRODUCCIÓN

La industria de la celulosa y papel es uno de los rubros más importantes a nivel mundial, principalmente por su incremento en respuesta a una alta demanda, impulsada por el crecimiento sostenido de la economía mundial.

En Chile, las condiciones de clima, suelo y pluviometría resultan favorables al desarrollo de variadas especies forestales, unidas al esfuerzo de los sectores público y privado, han permitido en las últimas 3 décadas, la creación de una considerable masa forestal en la zona sur del país (Papelnat, 2002).

La industria forestal presenta una fuerte orientación hacia la producción de celulosa Kraft, debido a la creciente demanda que existe de este producto en los mercados internacionales (Parra, 2004). Cerca de un 20% de la producción forestal chilena se emplea en la industria de celulosa Kraft blanqueada, con una producción cercana a los 2,2 millones de toneladas anualmente, lo que corresponde a un 5% de las exportaciones de celulosa de todo el mundo (Videla *et al.*, 2003).

Actualmente en nuestro país existen 13 plantas de celulosa, de éstas 9 utilizan procesos Kraft y 4 procesos mecánicos. Dentro de las industrias de celulosas Kraft, tres de las más importantes están ubicadas en la cuenca del río Biobío (González *et al.*, 1999; EULA-Chile, 2004). La industria de celulosa Kraft en general ha seguido la tendencia de los países desarrollados, aplicando mejoras tecnológicas en sus procesos y sistemas de tratamientos actuales, con el propósito de responder a las crecientes demandas ambientales, las expectativas ciudadanas y a las regulaciones gubernamentales, generando un conjunto de instalaciones productivas basadas en procesos de primer orden mundial (Videla *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque se implementen nuevas tecnologías, existen compuestos que a bajas concentraciones pueden causar alteraciones en organismos acuáticos en los sitios donde se realizan las descargas de los efluentes tratados (Vidal *et al.*, 2007).

Estos efluentes provenientes de la celulosa Kraft, presentan sólidos en

suspensión (SS), carga orgánica (demanda química de oxígeno DQO, y demanda biológica de oxígeno DBO₅), color y toxicidad. La presencia de color en los vertidos se debe a ligninas o taninos polimerizados, aunque no son tóxicos son difíciles de biodegradar (Ali and Sreekrishnan, 2001). Por otro lado, la toxicidad de estos efluentes es atribuida a compuestos extractivos de la madera (terpenos volátiles, ácidos resínicos, fitoesteroles y fenoles) (Vidal *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 1997; Vidal, 1999; Lacorte *et al.*, 2003).

La industria forestal presenta tecnologías para la eliminación de sólidos suspendidos y carga orgánica. En el caso de la eliminación de ésta última, se utilizan sistemas de tratamiento biológicos aeróbicos, ya sean de biomasa libre o adherida (Goode and Allen, 2006). Sin embargo, aún estos sistemas no dan solución a la eliminación del color y mineralización de compuestos específicos. Prueba de esto es que se han detectado mal formaciones, cambios hormonales y anomalías en organismos acuáticos presentes en las descargas de los efluentes previamente tratados (Howell *et al.*, 1980; Orrego *et al.*, 2005).

Resultados de investigaciones en peces expuestos a efluentes de blanqueado Kraft, demuestran efectos profundos, a nivel fisiológico y bioquímico, incidiendo en la reproducción, en las características sexuales secundarias, comportamiento sexual anormal, madurez sexual retrasada, reducción en la longitud de cuerpo, disminución en el tamaño de la gónada, perfiles esteroides alterados, inducción de la actividad de la ethoxiresorufin -O- deetilasa (EROD), feminización de machos, inducción de la función oxigenasa mixta (MFO), y actividades de la secreción del vitelogenina en las poblaciones masculinas y femeninas de los peces en varias especies bajo diversas condiciones (Howell *et al.*, 1980; Munkittrick *et al.*, 1994; Mattsson *et al.*, 2001). Por otro lado, en nuestro país, variados análisis realizados in situ y en laboratorio revelan que los efluentes de celulosa Kraft inducen al aumento de la vitelogenina plasmática en peces machos de *Onchorynchus mikiss* habitante en la cuenca del río Biobío, demostrando que la respuesta al efluente de celulosa Kraft es altamente estrogénica (Orrego *et al.*, 2006).

Estudios realizados por Howell *et al.* (1980), detectaron la presencia de fitoesteroles en los efluentes de celulosa Kraft y evidencia, que ellos pueden

ser causantes de tales efectos, específicamente fitoesteroles y ácidos resínicos, los cuales han sido relacionados con la toxicidad crónica en los efluentes de celulosa Kraft blanqueada, asociada a la perturbación endocrina en organismos acuáticos (Gifford, 1996; Servos, 1996).

Si bien, existen distintos fitoesteroles detectables en los efluentes de la industria de la celulosa, el β -sitoesterol es el compuesto presente en mayor cantidad (aproximadamente 50%) (Hewitt *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997). Además se encuentran el campesterol, estigmasterol, estigmastanol, campestanol, β -sitoestanol y coprostanol (Fernández *et al.*, 2007). En adición un estudio realizado por Khan and Hall (2006), a dos efluentes de celulosa ubicados en una cuenca canadiense, confirmaron la presencia de β -sitoesterol, β -sitoestanol y campesterol tanto en efluentes tratados como en los no tratados y determinaron que estos compuestos explicaban el 70% o más del contenido total de los fitoesteroles medidos.

Tradicionalmente los efectos de este tipo de efluente son medidos a través de los bioensayos con organismos bioindicadores, los cuales permiten detectar y evaluar la capacidad inherente de un agente de producir efectos tóxicos sobre los organismos vivos (EPA, 1993). Además es utilizado para evaluar la calidad toxicológica del efluente y para establecer criterios de calidad de agua. En las tres últimas décadas, un taxón de invertebrados ha emergido como grupo clave para la realización de ensayos ecotoxicológicos: los crustáceos cladóceros y más concretamente los dáfnidos (Calow, 1994).

El uso de cladóceros para test de toxicidad está ampliamente extendido porque se trata de organismos cuya amplia distribución geográfica permite disponer de ellos con facilidad, se adaptan bien a las condiciones de laboratorio, requieren poco espacio para su cultivo, su ciclo de vida es corto y, frecuentemente, son uno de los grupos de animales más sensibles a los compuestos químicos (Mokry and Hoagland, 1990). La característica más interesante es su sensibilidad a los tóxicos, ya que es capaz de acusar la presencia de, por ejemplo, 0,005 mg. del peligroso mercurio en el agua, y aún menores concentraciones de numerosos pesticidas y residuos industriales (Calow, 1994; Fernández *et al.*, 1995).

Daphnia sp. ha sido históricamente utilizada en los test de toxicidad aguda de sustancias químicas en el medio acuático (U.S. E.P.A., 1983; Fairchild *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 1995; Weyers *et al.*, 2000), así como en estudios de carácter crónico (Tong *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1999, y 2003). Además constituyen el único tipo de bioensayos con invertebrados acuáticos reconocidos por organizaciones internacionales como la U.S. *Environmental Protection Agency* (E.P.A.), la Comunidad Económica Europea (C.E.E.) y la Organisation for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.), siendo requeridos regularmente en todos los países.

Los ensayos de toxicidad agudo, son basados en respuestas letales (Mortalidad, inmovilidad) a través de la concentración letal 50 (LC₅₀), que determina la concentración del tóxico (conocido o desconocido) que es capaz de matar o inmovilizar el 50 % de la población en 48 horas. Si no se detecta una respuesta mediante un test agudo, se utilizan los test de toxicidad crónica, en los que la evaluación se basa en la capacidad reproductiva o el crecimiento de los individuos. Los cuales han adquirido gran importancia en los últimos años, debido a que ellos son orientados a examinar los efectos en el comportamiento, crecimiento, reproducción y dinámica poblacional, además son útiles para establecer, desde un punto de vista ecológico, las concentraciones de seguridad del compuesto químico ensayado para la población expuesta a sus efectos. Muchas veces, en el medio natural encontramos concentraciones de tóxico tan pequeñas que pueden resultar prácticamente inocuas a corto plazo, pero ser extremadamente peligrosas para la fauna y flora a largo plazo. De ahí la importancia de evaluar el impacto de concentraciones subletales de tóxico en poblaciones de organismos expuestas durante un periodo de tiempo suficientemente largo como para que se puedan contemplar los efectos en la capacidad de mantención, reproducción, y esperanza de vida de los organismos expuestos (Walthall and Stark, 1997).

2.- HIPÓTESIS:

H: Los compuestos presentes en efluentes de la celulosa Kraft presentan actividad estrogénica sobre *D. magna*

3.-OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Evaluar la actividad estrogénica de compuestos presentes en efluentes de la industria de la celulosa Kraft usando como bioindicador *Daphnia magna*

3.2.- Objetivos específicos

1. Evaluar la toxicidad aguda en el influente y efluente de celulosa Kraft, a si mismo los compuestos presentes en el efluente, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.
2. Evaluar la toxicidad crónica en influente y efluente proveniente de la industria de celulosa Kraft, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.
3. Determinación de la actividad estrogénica de los compuestos específicos y en el efluente de la industria de la celulosa Kraft, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.

4.- MATERIALES Y METODOS

La toxicidad puede ser determinada a nivel de laboratorio y sirve para evaluar los potenciales efectos tóxicos de los efluentes industriales tratados sobre los organismos vivos (Larraín, 1995). Estos efectos, se evalúan a través de estudios de toxicidad aguda por medio de respuestas letales (mortalidad) o a través de estudios de toxicidad crónica con respuestas subletales (fertilización, crecimiento, comportamiento).

4.1. Efluente y fitoesteroides

4.1.1. Efluente. Se trabajará con un efluente proveniente de la industria de celulosa Kraft, con sistema ECF, captado luego del tratamiento primario. Este efluente será complementado con una fuente de Nitrógeno y Fósforo en la proporción $\text{DBO}_5:100:5:1$ (Correa *et al.*, 2003). Para tal efecto se añadirá N en la forma de (NH_4Cl) y P en la forma de (K_2HPO_4) . Se neutralizará hasta llegar a un $\text{pH} = 7$ con NaOH . Los efluentes serán transportados y almacenados en bidones de 50 L, refrigerados a $4\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad.

4.1.2. Fitoesteroides. Se utilizará estigmasterol y β -sitosterol con pureza al 95 % de Merck, como patrón hormonal. Se evaluarán concentraciones entre 0.3 y 1.0 mg/L del compuesto (rango medido en un efluente local) mezclado en agua. Agitado por medio de Sonicador ELMA.

4.2.- Bioensayos agudos y crónicos a través de *Daphnia magna*

4.2.1. Cultivos de *Daphnia magna*. Para los ensayos de toxicidad aguda se empleará *D. magna* cultivadas en el laboratorio de bioensayos del centro EULA-Chile. Los cultivos serán alimentados 3 veces a la semana con una suspensión de levadura, harina de pescado y alfalfa (5,2; 12,6 y 1,0 g/L respectivamente) Además se proveerá de microalgas *Selesnastrum capricornutum* (10^6 células/mL), juntamente con cada alimentación. Los medios de cultivo se mantendrán a $20\text{ }^\circ\text{C}$ y con fotoperíodo de 16 h luz-8 h oscuridad. 9

Antes de la alimentación se cambiarán los medios de cultivo y se removerán los neonatos (USEPA, 1993). La dureza del medio será controlada en 250 ± 25 mg CaCO_3/L y el pH se mantendrá en 7 (NCh2083, 1999). La preparación del agua reconstituida, de dilución y cultivo para el bioensayo, consistirá en agua para análisis (agua destilada), a la cual se agregan sales inorgánicas NaHCO_3 (2,59 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4,93 g/L), KCL (0,23 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,76 g/L) (NCh 2083. Of 1999) y con un contenido de oxígeno disuelto mayor al 80 % (EPA, 1993). Las soluciones se preparan disolviendo las sales en forma separada en agua destilada, completada a 1L (NCh 2083. Of 1999).

4.2.2.- Determinación de toxicidad aguda del efluente en *D. magna*. Para los ensayos de toxicidad se utilizarán neonatos (organismos menores a 24 horas de vida). Ellos serán sometidos a un gradiente de concentraciones del efluente. El efluente será filtrado en membrana Whatman de porosidad $0,45 \mu\text{m}$ y su pH será ajustado a 7,0 antes de ser usado para preparar las soluciones. Se preparará un control y 5 concentraciones (6,25; 12,5; 25; 50; 100 %), a las cuales se le expondrán los neonatos en 4 replicas por concentración, en recipientes de vidrio de 70 mL, con 5 neonatos por envase (NCh 2083,1999). El ensayo se realizará sin alimentación ni renovación del medio. La respuesta a evaluar será la mortalidad, a través de la concentración letal (CL_{50}) a las 48 h, mediante el test estadístico Probit (Cooman *et al.*, 2003).

4.2.3.- Toxicidad aguda del β -sitoesterol y el estigmaesterol. Para verificar la toxicidad del β -sitoesterol y estigmaesterol en *D. magna* se prepararán soluciones entre 0,3 y 1,0 mg/L de ambos compuestos, por separados, a su vez la mezcla de ellos disueltos en agua. Por otro lado se tendrá un control (agua de reconstitución) para cada solución testada. Se usarán 4 replicas por cada concentración y 5 organismos por envase. Al final de las 48 h se analizarán los dáfnidos inmóviles. La respuesta a evaluar será la mortalidad, a través de la concentración letal (CL_{50}) a las 48 h, mediante el test estadístico Probit (Cooman *et al.*, 2003). El rango del efluente, del β -sitoesterol y el estigmaesterol, que no resulte toxico para *D. magna* será evaluado para

determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos crónicos.

4.2.4. Determinación de toxicidad crónica en *D. magna*. El ensayo crónico de reproducción con *D. magna* se realizará con gradientes de 5 concentraciones (inferiores al CL₅₀) del efluente, β -sitoesterol y estigmaesterol por separados, y la mezcla de ellos disueltos en agua y un control (agua de reconstitución) en envases de vidrio de 70 mL. Se emplearán en 10 replicas, con 1 neonato por envase, durante 21 días de exposición (ASTM, 1998). Se hará recambio del medio y se proveerá de alimentación y algas cada 48 h. El agua de recambio para *D magna* consistirá en 5 mL de alimentación (levadura, harina de pescado y alfalfa) y 10 mL de algas por 250 mL de solución (Xavier, 2006). Los ensayos se realizarán a temperatura y fotoperíodo controlados (20 ± 1 °C y 16 h luz- 8 h oscuridad). Antes del cambio del medio, se contarán y se descartarán los neonatos, los cuales serán registrados. La respuesta evaluada al final del bioensayo será la reproducción mediante la concentración a la cual no se observan efectos (NOEC) y la mínima concentración a la cual se observa un efecto (LOEC) a través de estadístico Toxtat (EPA, 1993).

4.2.5.- Metodología para evaluar la estrogénicidad en *D. magna*. Se analizará la actividad estrogénica a través del crecimiento en *D. magna* expuestas a dietilstilbestrol (Aldrich) con un ensayo crónico en 21 días de exposición. Serán empleadas 3 concentraciones de dietilstilbestrol (0.75; 1.5; 3.0 μ M). Se preparará un control, y serán empleadas 10 replicas para cada concentración, con un organismo por envase. Se prepararán 250 mL de cada solución con agua de reconstitución a la cual se añadirán 5 mL de alimento y 10 de algas. El medio será renovado cada 2 días durante los 21 días. Los dáfidos serán fotografiados a los días 7, 14 y 21 de ensayo (Xavier, 2005) Los organismos serán descartados después de ser fotografiados. *D. magna* será fotografiada con una cámara acoplada a una lupa con aumento de 2x. Se medirán la longitud (desde la cabeza hasta la base de la espina), y la cavidad abdominal (la mayor longitud lateral) de los daphnidos como se observa en la Figura 1

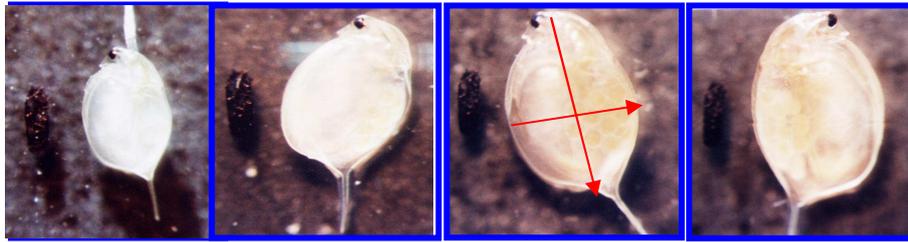


Figura 1. Medidas que se tomarán en los dáfidos expuestos a compuestos endocrinos.

Para el ensayo crónico con efluente, β -sitoesterol y estigmaesterol (separados y en mezcla), se expondrán los dáfidos durante 21 días en concentraciones inferiores al CL_{50} previamente determinado. Se emplearan 3 concentraciones y un control (agua de reconstitución), con 10 replicas por concentración y 1 daphnido por envase de 70 mL. El experimento se realizará por triplicado, y cada replica será fotografiada en un día diferente 7, 14 y 21 días. El medio será renovado cada 2 días, con solución de agua de reconstitución, alimento (5 mL) y algas (10 mL) para 250 mL de volumen. Los dáfidos serán fotografiados con 2X de aumento, después de su inmovilización sobre una placa seca. Se medirán la longitud y la cavidad abdominal de los organismos que serán fotografiados una única vez y se evaluarán los efectos de su exposición al efluente, comparativamente con los efectos observados en organismos expuestos a dietilstilbestrol. Las diferencias morfológicas serán analizadas con ANOVA STATISTICA 5.1 Statsoft Inc.1998.

5.- PLAN DE TRABAJO

Objetivo 1. Evaluar la toxicidad aguda en el influente y efluente de celulosa Kraft, a si mismo los compuestos presentes en el efluente, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.

Etapa 1.1. Evaluación de la toxicidad aguda del influente y el efluente de la industria de la celulosa Kraft.

Actividades:

1. Preparación de los cultivos de *Daphnia magna*.
2. Evaluación la toxicidad aguda, mediante el bioindicador *Daphnia magna*, del influente de celulosa Kraft.
3. Evaluación la toxicidad aguda, mediante el bioindicador *Daphnia magna*, del efluente de celulosa Kraft.
4. Interpretación de los resultados.

Etapa 1.2. Evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos específicos, presentes en el efluente.

Actividades:

1. Realización de los bioensayos con los compuestos específicos separados y en mezcla.
2. Interpretación de los resultados.

Objetivo 2. Evaluar la toxicidad crónica en influente y efluente proveniente de la industria de celulosa Kraft, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.

Etapa 2.1. Evaluación de la toxicidad crónica del influente y el efluente de la industria de la celulosa Kraft.

Actividades

1. Evaluación la toxicidad crónica, mediante el bioindicador *Daphnia magna*, del influente de celulosa Kraft
2. Evaluación la toxicidad crónica, mediante el bioindicador *Daphnia magna*, del efluente de celulosa Kraft
3. Interpretación de los resultados.

Objetivo 3. Determinación de la actividad estrogénica de los compuestos específicos presentes en el efluente de la industria de la celulosa Kraft, mediante el bioindicador *Daphnia magna*.

Etapa 3.1 Determinación de la actividad estrogénica de compuestos específicos, presentes en los efluentes.

1. Evaluación la actividad estrogénica, mediante *Daphnia magna*, de los compuestos específicos del efluente.
2. Interpretación de los resultados.

Carta Gantt

| Etapas | Meses | | | | | |
|---|-------|---|---|---|--|---|
| Objetivo 1: Evaluar la toxicidad aguda en el influente y efluente de celulosa Kraft, a si mismo los compuestos presentes en el efluente, mediante el bioindicador <i>Daphnia magna</i> . | | | | | | |
| 1.1. | x | x | | | | |
| 1.2. | | x | x | | | |
| Objetivo 2: Evaluar la toxicidad crónica en influente y efluente proveniente de la industria de celulosa Kraft, mediante el bioindicador <i>Daphnia magna</i> . | | | | | | |
| 2.1. | | | x | x | | |
| Objetivo 3: Determinación de la actividad estrogénica de los compuestos específicos presentes en el efluente de la industria de la celulosa Kraft, mediante el bioindicador <i>Daphnia magna</i> . | | | | | | |
| 3.1. | | | x | x | | |
| Escritura de tesis | | | | | | x |

6. RESULTADOS

6.1 Resultados preliminares

Toxicidad aguda del β -sitoesterol.

Para verificar la toxicidad aguda del β -sitoesterol sobre *D. magna* se prepararon soluciones entre 0,01 y 32 mg/L del compuesto puro disuelto en agua y sonicado entre 2 a 5 horas para asegurar su solubilidad en la solución. Además, se ocupó un control (agua de reconstitución) para cada bioensayo. Se usaron 4 replicas por cada concentración y 5 organismos por envase. Al final de las 48 h se analizaron los dáfidos inmóviles. La respuesta a evaluar fue la mortalidad, a través de la concentración letal (CL_{50}) a las 48 h, mediante el test estadístico Probit (Cooman *et al.*, 2003).

Las primeras soluciones del compuesto se realizaron en 100 mL de agua destilada (Solución patrón), de esta solución se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones necesarias a utilizar en cada bioensayo. Se realizaron 10 bioensayos agudos a distintas concentraciones de β -sitosterol, en los cuales no se obtuvieron las respuestas adecuadas, ya que la mortalidad no seguía una relación lineal tanto en las concentraciones bajas como en las altas. Como se observa en el gráfico 1, la mortalidad de *Daphnia magna* expuesta a concentraciones entre 0,02 y 0,3 mg/L, no presenta un patrón de mortalidad asociado al aumento de concentraciones, lo que nos estaría indicando que hay algún problema en la realización de los bioensayos probablemente esta alteración podría provenir de la mala manipulación de los organismos. Para esto, se trató de identificar la causa asociada a los problemas presentados en los test. Se realizaron cambios en la manipulación de organismos, así mismo como el lavado de viales y el tamaño de estos, además, se bajaron las concentraciones de los bioensayos. Al contrario de lo que se esperaba, los resultados de los nuevos bioensayos, utilizando las alternativas mencionadas, no presentaron un cambio favorable, es decir, los bioensayos mostraron un patrón similar a los realizados anteriormente. Con esto, se descarta que el error fuera producido por el tamaño, volumen de viales y mala manipulación de los organismos.

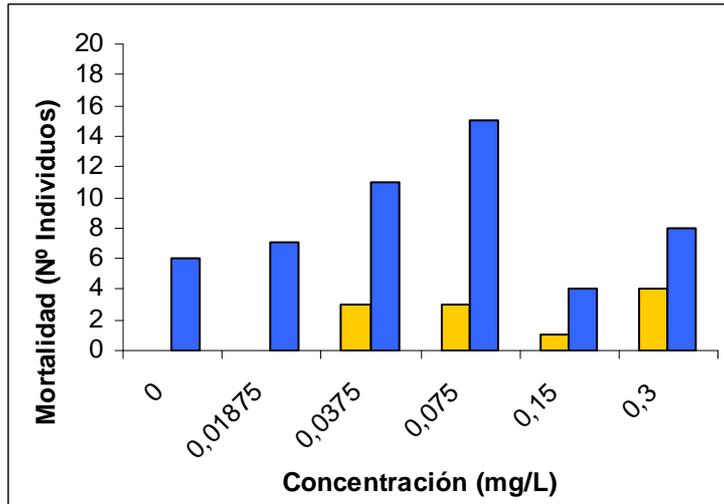


Grafico 1. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0,3 mg/L (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h).

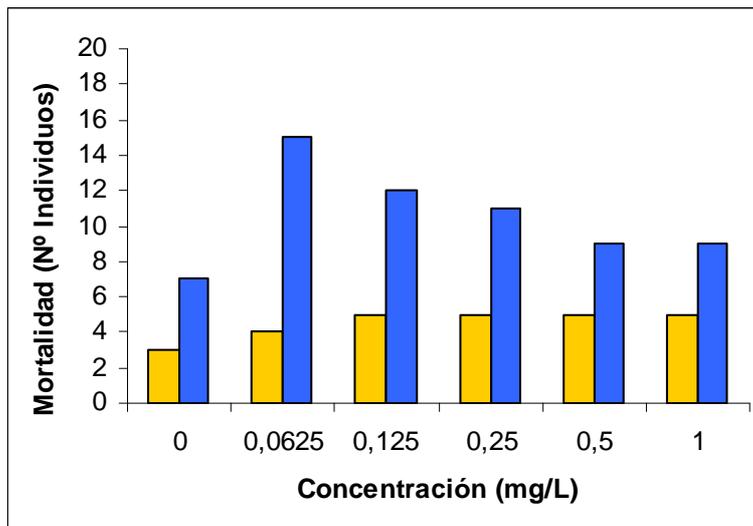


Grafico 2. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 1,0 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h).

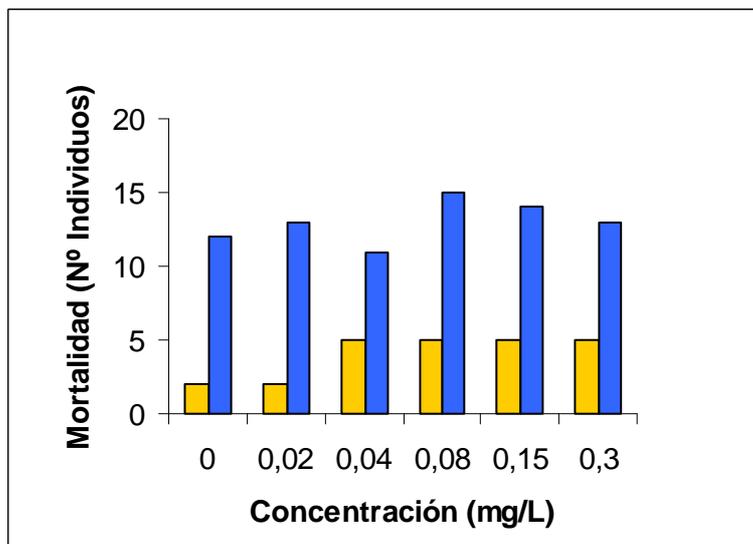


Grafico 3. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0,3 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h).

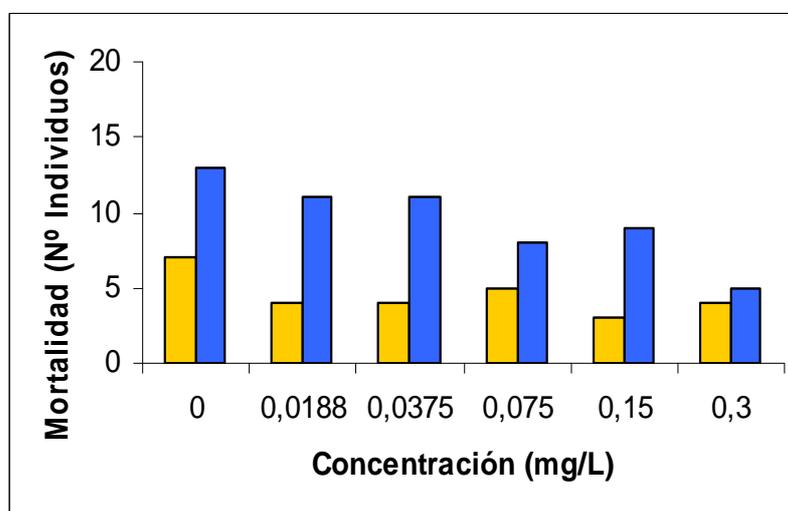


Grafico 4. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.3 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h).

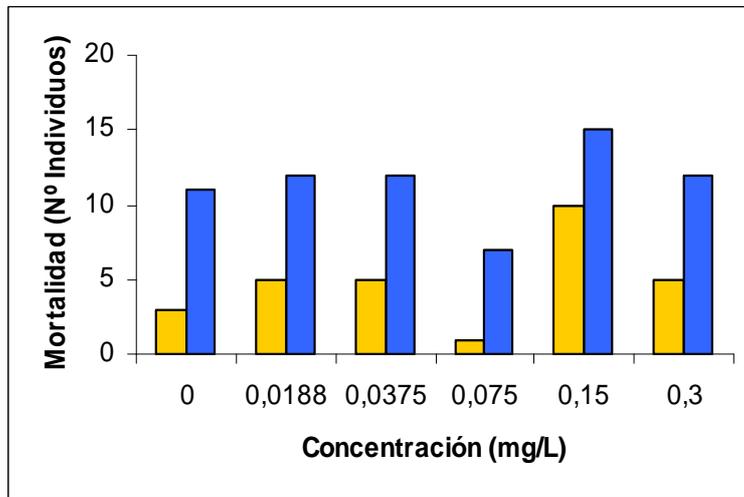


Grafico 5. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.3 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizaron en frascos chicos (30 ml).

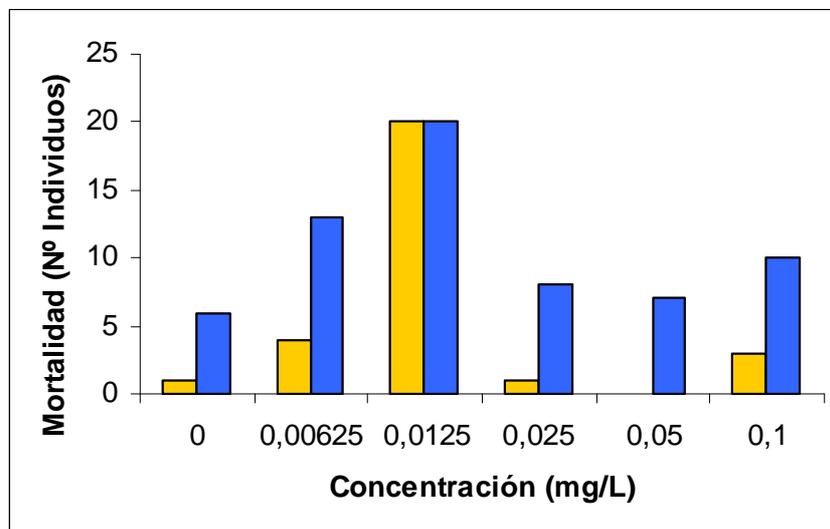


Grafico 6. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.1 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizaron en frascos chicos (30 ml).

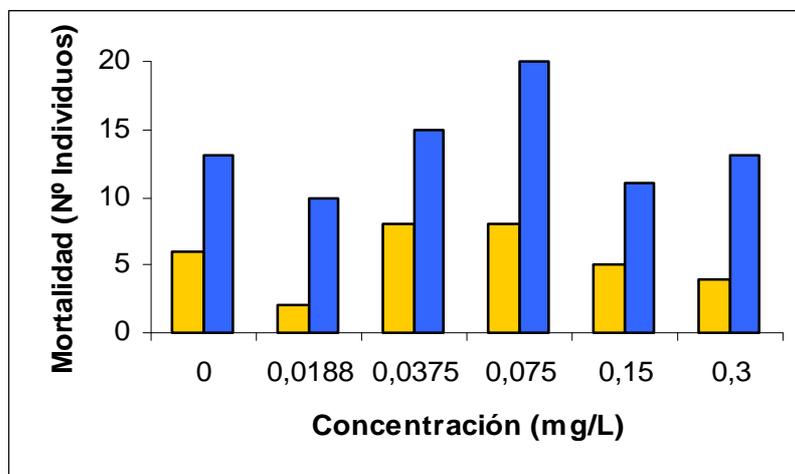


Grafico 7. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.3 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizo una modificación en la manipulación de los organismos y en frascos grandes (70 ml).

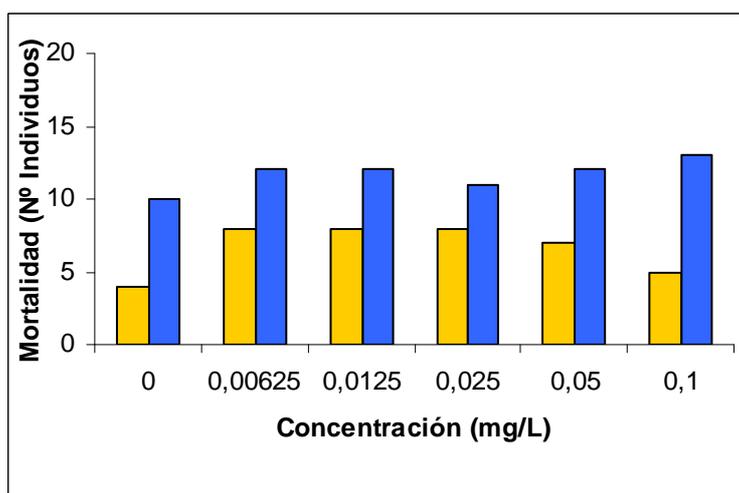


Grafico 8. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.1 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizo una modificación en la manipulación de los organismos y en frascos grandes (70 ml).

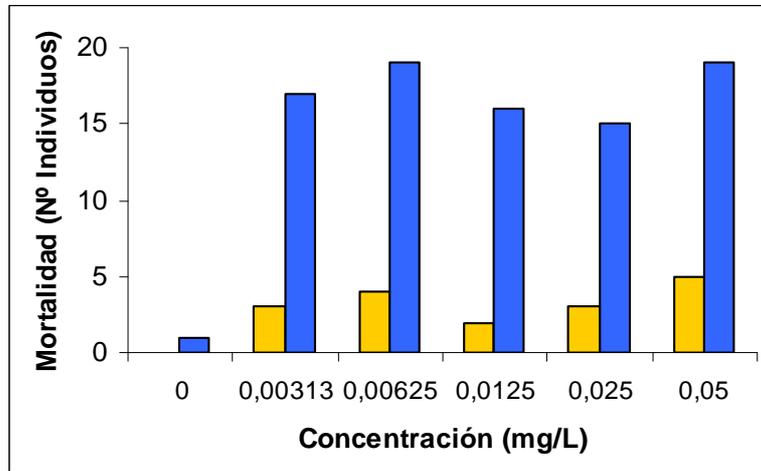


Grafico 9. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.05 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizó una modificación en la manipulación de los organismos y en frascos pequeños (30 ml).

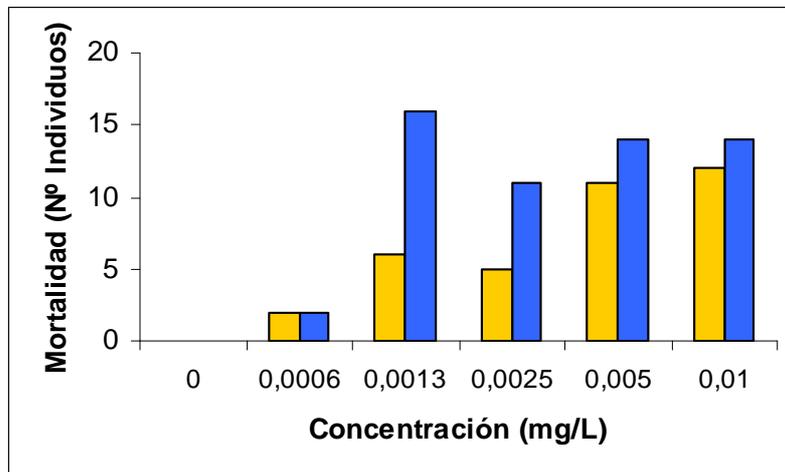


Grafico 10. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.01 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizó una modificación en la manipulación de los organismos y en frascos pequeños (30 ml).

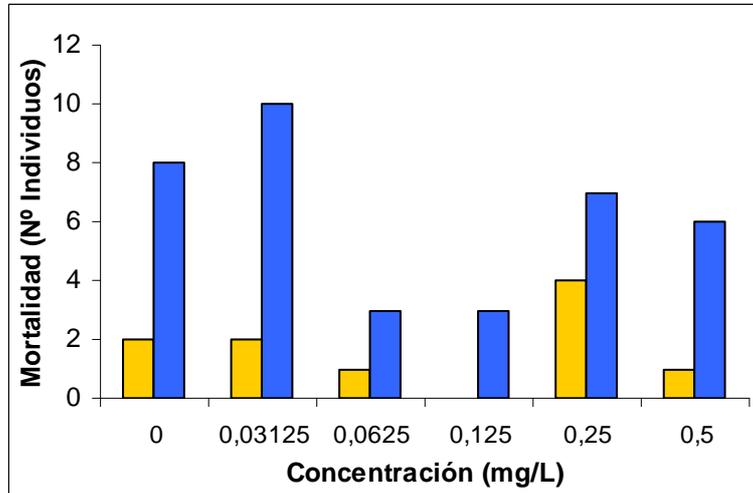


Grafico 11. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 0.5 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h). Se realizó una modificación en la manipulación de los organismos y frascos pequeños (30 ml).

Por lo anterior expuesto, se dejó en evidencia que los factores; manipulación de organismos, sonicación, lavado de frascos, tamaño y forma de viales, no fueron las causas de la mortalidad excesiva de los bioensayos. Un último procedimiento para evaluar la alteración de mortalidad, fue el aumento de volumen de la solución inicial de 100 mL a 500 mL, para poder descartar que el compuesto no estuviera bien solubilizado. Los resultados de los bioensayos realizados dentro de un rango de concentraciones entre 0.03125 hasta 32 mg/L, no mostraron mortalidad a las 24 h y 48 h del test. De lo cual se concluye que el factor determinante en la mortalidad de los organismos, fue el volumen en el cual se estaba solubilizando el compuesto.

De acuerdo a esto, no se encontró mortalidad (LC_{50}) en el rango indicado anteriormente para el compuesto β -sitosterol, determinando que las concentraciones a utilizar en los bioensayos crónicos serán determinadas por literatura adecuada al tema.

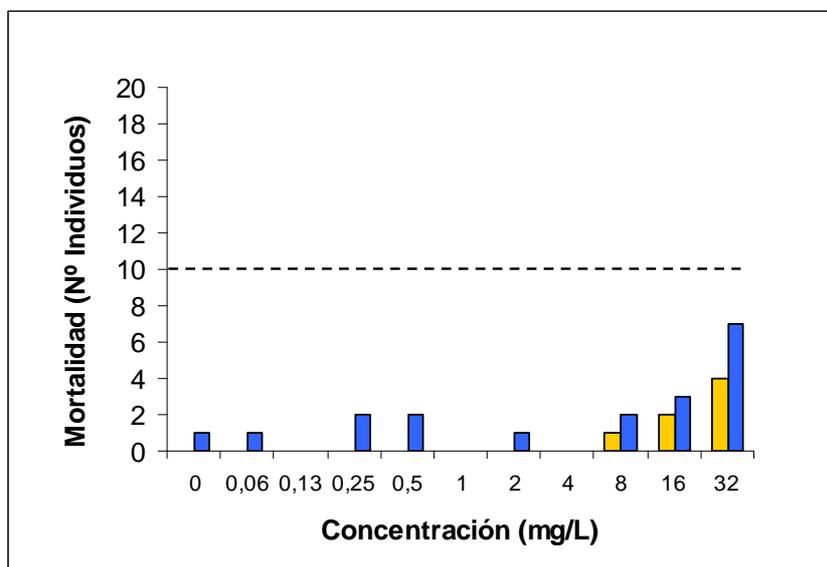


Grafico 12. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *D. magna* en presencia de β -sitosterol a una concentración de 32 mg/L. (■ Mortalidad a las 24 h; ■ Mortalidad a las 48 h).

De acuerdo a esto, no se encontró mortalidad (LC_{50}) en el rango indicado anteriormente para el compuesto β -sitosterol, determinando que las concentraciones a utilizar en los bioensayos crónicos serán determinadas por literatura adecuada al tema.

REFERENCIAS

Ali M. and Sreekrishnan T. R. (2001). Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. *Advances and Environment. Research.*, 5, 175-196.

ASTM (1998) standard guide for renewal life-cycle toxicity tests with *Daphnia magna* E1193-87. *Annual Book of American Society for Testing and Materials-ASTM Standards*. Philadelphia,PA.p 1-17.

Calow, P. (1994). "Overview with observations on risk assessment and management". En: *Handbook of Ecotoxicology*. Vol. II. P. Calow ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford. 416 pp.

C.E.E., C2. (1984). "84/449/EEC: Comission Directive of 25 April 1984 adapting to technical progress for the sixth time Council directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification packing and labelling of dangerous substances". Office for *Official publications of European Communities*. L251, **27**: 155-159.

CERTFOR,2005.reporte de Auditoria CMPC Celulosa S. A.-SGS Chile-Ltda.
www.sgs.cl

Cook, D. L., LaFleur, L., Parrish, A., Jones, J. and Hoy, D. (1997). Characterization of plant sterols from 22 US pulp and paper mills. *Water Science and Technology*, 35, 297- 303

Cooman K., Gajardo M., Nieto J., Bornhardt C., Vidal G. (2003) Tannery wastewater characterization and toxicity effects on *Daphnia spp.* *Environmental Toxicology*.17,45-51.

Correa, J., Domínguez, V. M., Martínez, M. and Vidal, G. (2003). Aerobic degradation of 2,4,6 TCF content in ECF bleached effluent. *Enviromental Internacional.*, 9 (4), 459-465.

Enviromental protection Agency (E.P.A.),1993, La Comunidad Económica Europea (C.E.E.) y la Organisation for Economic Cooperation and Development (O.E.C.D.).

EULA-Chile (2004). Programa de Monitoreo de la calidad del agua del sistema Biobío 1994-2004. Trama Impresores S.A., Concepción,CL.

Fairchild, J.F.; Little, E.E.; Huckins, J.N. (1992). "Aquatic hazards assessment of the organophosphorus insecticide fonofos". *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 22: 375-379.

Fernandez, A.; Ferrando, M.D.; Andreu, E. (1995). "Chronic toxicity of diazinon to *Daphnia magna*: effects on survival, reproduction and growth". *Toxicology Environmental Chemistry*. 49: 25-32.

Fernandez, M., Ikonomu, M. and Buchanan, I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater. *Science of the total environment*, 373, 250-269.

Gifford J.S. (1996). Recent advances in environmental fate of chemical from pulp mills. In: *Environmental Fate and Effects of Pulp and paper mill effluents*, M.R. Servos, K.R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak, (Eds.), St Lucie Press, Delray Press, FL., pp.271-280

González P. C. (1999). Desarrollo de un modelo conceptual para la toma de decisiones en Gestión Ambiental de la Industria de Pulpa Química Kraft Blanca. Tesis presentada a la Escuela de Graduados para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales, Universidad de Concepción-Chile

Goode, C.L. R., Allen, D.G. (2006) multivariate statistical analysis of a high rate biobolts process treating Kraft mill bleach plant effluent. Eight IWA symposium on Forest Industry Wastewaters, Victoria-Espiritu Santo(Brazil)

Hewitt, L. M., Carey, J. H., Dixon, D. G. and Munkittrick K. R. (1996). Examination of bleached kraft mill effluent fraction for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout. In. *Environ Fate a Effects of Pulp a Paper Mill Effluent*, M. R. Servos, K. R. Munkittrick, J. H. Carey, G. J. Van der Kraak (Eds.), *St Lucie Press, Delray Press*, FL., pp. 79-94.

Howell, W. M., Black, D. and Bortone, S. A. (1980). Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia*., 4, 676-681

Khan, Z. M. and Hall, E. R. (2003). Occurrence and removal of plant sterol in pulp and paper mill effluents. *Journal Environmental Engineering and science*., 2, 17-16.

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

Larrain, A. (1995). Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad (*) *Ciencia y Tecnología Marina. Conama* (N° Especial), 39-47.

Leal H. E., Rocha H. A., Lema J. M. (1997). Acute toxicity of hardboard mill effluents to different bioindicators. *Environmental. Toxicology and Water Quality*. 12, 39- 42.

Mattsson K., Lehtinen K. J., Tana J., Hardig J., Kukkonen J., Nakari T., Engstrom C. (2001). Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 144-154.

Mokry, L.E. and Hoagland, K.D. (1990). "Acute toxicities of five synthetic pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*". *Environmental Toxicology Chemistry*. 9: 1045-1051.

Munkittrick K.R., Van der Kraak G. J., McMaster M: E., Portt C. B., van der Heuvel M. R., Servos M. R. (1994). Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mill. II. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker. *Environmental Toxicology Chemistry*, 13, 1089-1101.

Norma Chilena Oficial, NCh 2083 Of.1999. Aguas- Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladóceras). INN-Chile.

O.E.C.D. (Organization for Economic Co-operation and Development) (2000). "Section 2. Guideline 202. *Daphnia* sp. Acute immobilisation Test and Reproduction Test". En: *Guidelines for testing chemicals*. OECD. París (Francia).

Orrego, R., Moraga, G, Gonzáles, M., Gavilán J., Valenzuela, A., Burgos, A. and Barra, R. (2005 b). Reproductive, physiological and biochemical response in juvenile female rainbow trout exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1935-1943

Sanchez, M.; Ferrando, M.D.; Sancho, E.; Andreu, E.(1999). "Assessment of the toxicity of a pesticide with a two-generation reproduction test using *Daphnia magna*". *Comparative Biochemistry and Physiology*. C124: 247-252.

Sanchez, M.; Ferrando, M.D; Andreu-Moliner, E. (2003). "Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* to the herbicide molinate". *Ecotoxicology Environmental Safety*. 59: 316-323.

Tong, Z.; Huailan, Z.; Hongjun, J. (1996). "Chronic toxicity of Acrylonitrile and acetonitrile to *Daphnia magna* in 14-d and 21-d toxicity tests". *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 57: 655-659.

U.S.EPA. (Environmental Protection Agency) (1983). *Water quality criteria, 1972*. National Academy of Sciences, U.S. E.P.A. Research series.(Washington, D.C., U.S.A.). pp.: 1-6.

Vidal G., Kennes C., Méndez R., Lema J. M. (1997). Degradación aeróbica del 2,4,6- triclorofenol en efluentes de blanqueo de pulpa de celulosa. *Afinidad*, 469, 207-212.

Vidal, G. (1999). Revisión bibliográfica sobre los compuestos orgánicos producidos en la industria de la pasta y el papel: Incidencia en la toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de sus efluentes. *Afinidad.*, 481, 152,159

Vidal, G., Belmonte, M., Calderón, M. y Chamorro, S. (2007). Significativos avances ambientales registra en Chile la industria de celulosa kraft blanqueada. *Induambiente* (in press).

Videla, S. (2003). Evolución y tendencia del tratamiento de residuos industriales líquidos en la industria de celulosa. X jornadas técnicas de la celulosa y el papel "Globalización y competitividad". Concepción, 12-14 de Noviembre.

Van den Heuvel, M. R., Ellis, R. J., Tremblay, L. A. and Stuthridge, T. R. (2002). Exposure of reproductive maturing rainbow trout to a New Zeland pulp and paper mill effluent. *Ecotoxicology Environmental Safety.*, 51, 65-75.

Walthall, W.K. and Stark, J.D. (1997). "A comparison of acutemortality and population growth rate as endpoints of toxicological effect". *Ecotoxicology Environmental Safety.* 37: 45-52.

Weyers, A.; Sokul-Kluttgen, B.; Baraibar-Fentanes, J.;Vollmer, G. (2000). "Acute toxicity data: a comprehensive comparison of results of fish, *Daphnia*, and algae tests with new substances notified in the European Union". *Environmental Toxicology and Chemistry.* 19 (7): 1931-1933.

Xavier, C., Chamorro, S. and Vidal, G. (2005). Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology.*, 75, 670–676.

Xavier, C. 2006. Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación de fitoesteroles contenidos en efluentes de celulosa kraft y en la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos, y de genotoxicidad en organismos bacterianos. Tesis doctoral, Universidad de Concepción, Centro EULA.CHILE, 165 pp.