



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Departamento de Oceanografía



# CARACTERIZACION QUIMICA Y TOXICOLOGICA DE UN EFLUENTE DE LA ETAPA E1 DE BLANQUEO DE CELULOSA KRAFT MEDIANTE UNA TECNICA DE FRACCIONAMIENTO

**Francisco Javier Reyes Torres**

**Profesor Guía: Dra. Gladys Vidal**

**Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile**

SEMINARIO DE TITULO PRESENTADO A LA FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES Y OCEANOGRAFICAS PARA OPTAR AL TITULO DE BIOLOGO  
MARINO

Concepción, Chile 2006

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La industria de la Celulosa en Chile

En Chile la industria forestal ha experimentado un acelerado desarrollo durante las últimas décadas adquiriendo una innegable importancia a nivel económico como social, evolucionando cada vez mas hacia un comportamiento amigable con el medioambiente, lo que conlleva al uso sustentable de los recursos madereros.

Durante las décadas pasadas la producción de celulosa se consumía esencialmente dentro de nuestro país, pero en la actualidad cerca de un 30% de la producción de *Pinus radiata* se destina para la exportación (Xavier, 2006).

Esto es no menos relevante si consideramos que esta industria representa cerca del 15% del total de exportaciones nacionales, generando retornos por mas de 1100 millones de dólares al año, solo considerando pulpa de celulosa kraft (Prochile, 2006).

Este sector productivo genera mas de 150.000 empleos directos, correspondiendo en un 48% al subsistema industrial (aserrío, pulpa, astillas) y el 40% al subsistema silvícola, cifra que va en un directo asenso alcanzando casi los 200.000 para el año 2007, según proyecciones, esto debido a que en los últimos 20 años el gobierno ha estimulado los programas extensivos de nuevas plantaciones de pinos (González, 1999; Xavier, 2006).

En el país la superficie total plantada, con especies de crecimiento rápido (pino y eucalipto), para uso industrial es de 2 millones de hectáreas, de las cuales el 74% corresponden a *Pinus radiata* y el 26% restante a *Eucaliptus globulus* y otras especies (Xavier, 2006).

Actualmente en Chile se producen cerca de 2,9 millones de toneladas de celulosa al año, ubicándolo en el segundo lugar en Latinoamérica después de Brasil y décimo a nivel

mundial aportando el 5% de las exportaciones de celulosa de todo el mundo (Papernet, 2002; Xavier, 2006).

En la actualidad existen 13 plantas productoras de pulpa de celulosa en Chile, mas específicamente se ubican entre las regiones VII y X, de las cuales solo 4 utilizan procesos mecánicos y 9 proceso kraft, siendo el mayor recurso utilizado el pino o árbol de madera blanda (Xavier, 2006).

Varias son las ventajas que ofrece nuestro país con respecto a los demás países productores de celulosa kraft, la más trascendental es la rápida renovación de la madera, que por el clima templado se produce con extremada rapidez, y la cercanía de las industrias respecto a sus plantaciones lo que abarata los costos de transporte. Por el contrario en los países del hemisferio Norte las condiciones climáticas son muy adversas durante el invierno y por lo general los centros de procesamiento están muy distantes de sus plantaciones. Todo esto hace que en Chile se produzca a bajo costo, cifras que van entre los US\$197 – US\$220 por tonelada, mientras que en el hemisferio Norte los rangos van de US\$300 – US\$480 por tonelada (Lignum, 2004).

## **1.2. La materia prima para la industria de celulosa**

Los principales recursos explotados para la producción de pulpa de celulosa son el pino (*Pinus radiata*) y el eucalipto (*Eucalyptus globulus*), clasificándolos en árboles de madera blanda y madera dura respectivamente, siendo el tamaño de la fibra de celulosa, larga y corta, que la constituye, el parámetro para diferenciarlas (Xavier, 2006; Papernet, 2002; Zaror, 1998). En otros países se utilizan también otros tipo de plantas tales como pastos, bambúes, bagazos, algodones, linos y cáñamos, pero que solo representan un 10% del total de fuentes de fibra para la obtención de pulpa de celulosa (Papernet, 2002).

La actividad silvícola permite obtener el recurso madera, materia prima para la producción de pulpa celulósica, esta industria utiliza una fracción de la madera obtenida de las plantaciones forestales, el resto es consumida por la industria de aserrío y en la generación

de energía, cabe señalar que existe una estrecha relación entre estos tres destinos de la madera puesto que los chips obtenidos en el aserrío y la energía producida sirven para la producción de celulosa (González, 1999)

La madera esta constituida principalmente de celulosa (40 – 45%) un polisacárido lineal que consiste en unidades  $\beta$ -D-glucopiranosas unidas por enlaces (1-4)-glucosídicos, hemicelulosa (20 – 30%) compuesta de diferentes unidades de carbohidratos, lignina (20 – 30%) un polímero complejo tridimensional que consiste en unidades no repetidas de alcoholes fenilpropílicos, unidos por enlaces carbono-carbono y éter, y compuestos extractivos (2 – 5%) como: terpenos, fenoles polares, ácidos grasos, ácidos resínicos y esteroides (fitoesteroides) (Mellanen *et al.*, 1996; Lema *et al.*, 1998; Vidal, 1999; Diez *et al.*, 2002; van del Heuvel *et al.*, 2002; Xavier, 2006).

Dependiendo del uso final que se le dará a la madera, los bosques de pino son cosechados entre los 18 y 20 años cuando su destino es celulosa, entre los 20 y 25 años cuando el uso de la madera es aserrable, y entre 25 y 30 años cuando la madera se destina a la producción de trozos de exportación. Los bosques de eucalipto, en cambio, son cosechados entre los 12 y 15 años y su madera se destina principalmente a la producción de la celulosa (Papelnat, 2002)

Además, cabe señalar que las empresas en Chile han logrado un alto grado de especialización en investigación genética, sobre todo en monocultivos homogéneos, que permite una variación muy pequeña en cuanto a la calidad de la madera, al poder tratar un bosque en donde sean todos iguales con respecto a la edad (Lignum, 2004).

### **1.3. Proceso de Producción de pulpa de celulosa**

El proceso de producción de celulosa consiste en remover la lignina y la hemicelulosa en forma selectiva, utilizando compuestos químicos que permiten disolver estos constituyentes de la madera original en orden a facilitar la separación de estas fibras de la celulosa. En Chile se utiliza principalmente el proceso kraft que permite recuperar los reactivos,

obteniéndose además, una completa integración energética (Zaror, 2002). Existen diferentes alternativas para la obtención de pulpa de celulosa, destacando los siguientes procesos:

- **Pulpaje mecánico:** Estos procesos trituran la madera y liberan las fibras. El rendimiento de la pulpa es muy alto, entre 90 – 95%, pero de muy baja calidad puesto que conserva la lignina, dándole un color amarillento al papel, y es de fibras muy cortas. Este tipo de pulpa se emplea principalmente para papel de periódico y otros productos en los que la calidad de impresión no es tan importante (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

- **Pulpaje Químico:** La madera primeramente es transformada en pequeñas astillas (chips) y luego es sometida a cocción con productos químicos, a altas temperaturas y presión. La extracción química separa la lignina de la celulosa, para que esta quede como subproducto final. El rendimiento de la pulpa por este proceso es alrededor del 40 – 50% de la madera original. Este tipo de pulpaje es llevado a cabo en dos medios: alcalino y ácido. Según el tipo de compuesto químico utilizado se tiene, el proceso kraft donde las astillas son cocidas en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S), más conocido como licor blanco, este es el proceso más ampliamente usado. Además existe el proceso al sulfito, donde las astillas son cocidas en una mezcla de ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) e iones bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), para disolver la lignina (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

- **Pulpaje termo-mecánico (TMP):** El proceso envuelve cocción al vapor de la materia prima bajo presión por un corto periodo antes y durante el refinamiento. El proceso termo-mecánico es además modificado usando productos químicos durante la etapa de cocción al vapor, llamándolo así proceso químico termo-mecánico (CTMP). (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

- **Pulpaje químico-mecánico:** El material crudo es sometido primeramente a un tratamiento químico y sometido a un drástico tratamiento mecánico para separar las fibras, la eficiencia de la pulpa obtenida está en el rango de 85 – 90% y la calidad de la pulpa es mucho mejor que la que se obtiene por proceso mecánico (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

Durante la cocción las astillas se ponen en contacto con el licor blanco a una temperatura de entre 160°C - 180°C y también a altas presiones, posteriormente el sólido se somete a un exhaustivo lavado y filtrado, como resultado se obtiene una pulpa de fibras ricas en celulosa (pulpa cruda) y un residuo líquido llamado licor negro, que es una mezcla de compuestos orgánicos y reactivos que posee un alto valor energético, ya que por medio de quema en caldera de recuperación, se obtiene energía calórica (vapor y energía eléctrica) y los reactivos para el licor blanco (Lema *et al.*, 1998; Zaror, 1998).

#### **1.4. Blanqueo de la pulpa kraft**

Una vez terminado el proceso de pulpaje aun quedan adheridas restos de lignina a las fibras de celulosa las que debe ser eliminada a través de oxidación química, por lo que se requiere la acción de agentes oxidantes mas selectivos como el oxígeno (O<sub>2</sub>) compuesto 4 veces más oxidante que el cloro, y permite una reducción sustancial en la utilización de compuestos químicos (Zaror, 1998; Papelnet, 2002). En general la pulpa kraft de madera dura es mas blanca que la pulpa de madera blanda por efecto de las diferentes cantidades de compuestos químicos presentes en cada tipo de pulpa (Zaror, 1998; Ragnar, 2003).

Sin embargo la decoloración de la pulpa kraft se realiza en una serie de etapas generalmente con un lavado entre cada una de ellas, esto se conoce como secuencia de blanqueo, optimizándose cada etapa con el fin de contribuir a la remoción, solubilización y decoloración del material remanente, para alcanzar cierto nivel de blancura no comprometiendo las propiedades físicas de la madera (Parra, 2001).

Si bien es cierto la industria de celulosa se caracteriza por generar un alto impacto ambiental, en lo que se refiere a la gran cantidad de agua que requieren los respectivos procesos (35 – 80 m<sup>3</sup>/ton), y la eliminación de efluentes con una alta carga orgánica y de compuestos organoclorados entre otros, la tendencia actual es disminuir este impacto producto de las exigencias del mercado como medio ambientales.

De esta forma los procesos convencionales de blanqueo de celulosa kraft con cloro se han ido reemplazando por procesos que mejoran los resultados de operación, proporcionan una óptima calidad de la pulpa producida y un comportamiento amigable con el medio ambiente, esto es, la utilización de procesos que ocupan dióxido de cloro, o proceso ECF (Elementary Chlorine Free), y procesos que utilizan oxígeno, peróxido de hidrógeno, ozono, enzimas etc., llamados TCF (Totally Chlorine Free), siendo el primero el proceso más utilizado por la industria de celulosa kraft (Parra, 2001).

Tabla 1. Principales compuestos químicos utilizados en el blanqueo de pulpa de celulosa kraft.

Compuesto Químico	Fórmula	Símbolo	Aplicación y funciones
Cloro <sup>1</sup>	Cl <sub>2</sub>	C	Gas presurizado; Oxidar y clorar lignina
Ozono <sup>1</sup>	O <sub>3</sub>	Z	Mezcla de gases presurizado; aire u oxígeno (10 - 12% O <sub>3</sub> en O <sub>2</sub> ): oxida lignina
Oxígeno	O <sub>2</sub>	O	Oxígeno en medio alcalino; oxida lignina
Peróxido de Hidrógeno <sup>1</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	P	2 – 5% solución en agua; oxida lignina y tiene efecto blanqueante
Peróxido de sodio <sup>1</sup>	Na <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Dióxido de Cloro	ClO <sub>2</sub>	D	7 – 10 g/l solución en agua; efecto blanqueante, oxida lignina y produce derivados de lignina clorada
Hipoclorito de sodio <sup>1</sup>	NaOCl	H	40 – 50 g/l en agua; efecto blanqueante, oxida lignina
Hipoclorito de calcio <sup>1</sup>	Ca(OCl) <sub>2</sub>		
Tiosulfato de sodio <sup>2</sup>	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Y	Solución de hidrosulfito o solución preparada <i>en situ</i> con NaBH <sub>4</sub> , NaOH y SO <sub>2</sub>
Tiosulfato de zinc <sup>2</sup>	Zn <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
Hidróxido de sodio <sup>3</sup>	NaOH	E	5 – 10% en solución; extrae lignina, hidroliza lignina clorada
Dióxido de azufre <sup>3</sup>	SO <sub>2</sub>	S	Solución; Tratamiento ácido realizado después de etapa final con D, H o para destruir agentes blanqueantes residuales, remover iones metálicos y ajustar el pH para favorecer la estabilidad de la blancura
Enzimas <sup>3</sup>	Xilanasas	X	Cataliza la hidrólisis de xilano y facilita la remoción de lignina durante las etapas subsecuentes de blanqueo
Quelantes <sup>3</sup>	EDTA DTPA	Q	Remueve iones metálicos, especialmente utilizado antes de la etapa P

(Extraído: Parra, 2001). <sup>1</sup>Oxidantes; <sup>2</sup>Reductores, <sup>3</sup>Auxiliares

Para tener una mejor visión de la secuencia de blanqueo, en la Figura 1 se muestran las diferentes etapas por las cuales la pulpa cruda debe pasar para lograr una blancura óptima, esta secuencia se caracteriza por presentar una etapa de extracción alcalina y tres etapas de adición de dióxido de cloro.

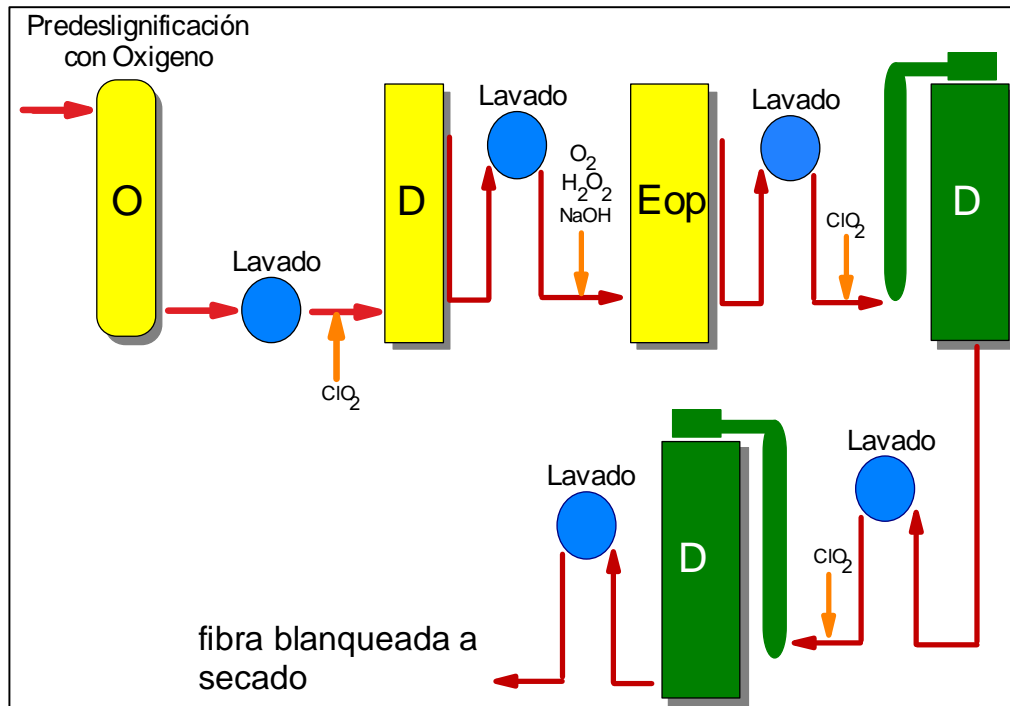


Figura 1. Secuencia de blanqueo en un proceso ECF moderno.

El blanqueo de la pulpa de celulosa kraft, en un sistema ECF, se obtiene principalmente en cuatro o más etapas, donde en primer lugar se somete a una pre-designificación con oxígeno, una etapa con dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), un proceso de extracción alcalina con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y finalmente se vuelve a tratar con  $\text{ClO}_2$ . Siendo la pulpa sometida a un lavado después de cada tratamiento. Este proceso se realiza con la ayuda de varios compuestos químicos, en la Tabla 1 se describen los principales compuestos utilizados en el proceso de blanqueo kraft.



Además dentro de estas modificaciones están la inclusión de compuestos que actúan como catalizadores de la reacción de deslignificación, el pretratamiento con enzimas tendiente a reducir el contenido inicial de la madera, la variación del perfil de concentración de los reactivos y temperatura durante la cocción y la utilización de reactivos no tradicionales para hacer más selectiva la deslignificación (Melo, 2001).

### **1.5. Características del efluente de celulosa kraft**

Cada proceso de pulpaje utiliza grandes cantidades de agua ( $60 \text{ m}^3 / \text{t}$ ), la que a su vez retorna en forma de efluente con una gran cantidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos, y que difieren en su carga dependiendo del proceso productivo. Las mas importantes fuentes de contaminantes en el proceso de obtención de pulpa de celulosa son la preparación de la madera, el pulpaje propiamente tal, lavado de la pulpa y blanqueo. En la Figura 2 se muestra un esquema con las diferentes etapas de una industria de celulosa kraft y las características generales de los efluentes generados. La etapa de blanqueo aporta con la mayor cantidad de sustancias tóxicas debido a que utiliza compuestos clorados en su proceso (Xavier, 2006; Pokhrel and Viraraghavan, 2004).

Las características de las aguas residuales derivadas de estos procesos dependerán de factores tales como: tipo de madera, tecnología aplicada al proceso, prácticas de administración, recirculación interna de el efluente para su recuperación, y la cantidad de agua utilizada en el proceso particular, siendo el pulpaje químico el que utiliza la mayor cantidad de agua (Pokhrel & Viraraghavan, 2004).

En general los efluentes provenientes de la industria de celulosa kraft causan un importante impacto ambiental debido a su alto contenido de sólidos suspendidos (SS), alta carga orgánica (DBO<sub>5</sub>: Demanda Biológica de Oxígeno y DQO: Demanda Química de Oxígeno), color y toxicidad, mas específicamente en estos últimos parámetros el color se debe a la presencia de ligninas o taninos no polimerizados y que aunque no son tóxicos son de difícil biodegradación, y la toxicidad se atribuye a compuestos extractivos de la madera, como

terpenos, ácidos resínicos, esteroides (fitoesteroides) y compuestos fenólicos, mientras que la DBO<sub>5</sub> es originada por la presencia de compuestos fácilmente biodegradables.

Sin embargo algunos de esos compuestos se encuentran naturalmente como extractivos de la madera, y otros son compuestos xenobióticos formados durante el proceso de pulpage. La mayoría de los compuestos clorados que se forman son recalcitrantes resistentes a la degradación y tienden a persistir en la naturaleza (Vidal, 1999; Ali and Sreekrishnan, 2001; Xavier, 2006).

Los taninos son, por definición, polímeros fenólicos polares y son altamente reactivos con proteínas, se encuentran presentes en efluentes de la etapa de descortezado, y contribuyen con el 50% de la DQO, además los taninos afectan las propiedades del agua provocando una absorción mayor de luz y calor, y una menor retención de oxígeno, siendo altamente tóxicos para microorganismos encargados de la degradación aeróbica y en concentraciones bajas producen inhibición de la actividad metanogénica, acción que es compartida con los ácidos grasos de cadena larga (Vidal, 1999; Ali and Sreekrishnan, 2001).

Los ácidos resínicos son diterpenos tricíclicos que están presentes naturalmente en las resinas de la madera de los árboles, son ácidos hidrofóbicos débiles y tóxicos para peces en pequeñas concentraciones (0,008–1,36 mg/l), los ácidos resínicos más comunes que han sido monitoreados son: ácido abietico, dehidroabietico, neoabietico, pimárico, levopimárico y palústrico, siendo el ácido isopimárico el más tóxico de todos los ácidos resínicos (Ali and Sreekrishnan, 2001).

Las ligninas y monómeros derivados de estos compuestos, son los responsables del color del efluente, en procesos de pulpage convencionales el cloro reacciona con la lignina residual formando compuestos organoclorados, que son altamente tóxicos para los organismos que habitan los cuerpos de agua receptores de estos efluentes. Así, los efluentes que provienen de la etapa E1 de blanqueo son altamente coloreados y contribuyen con el 80% del color, 30% de la DBO y 60% de la DQO, a la carga total de contaminantes del efluente (Ali and Sreekrishnan, 2001).

Las ligninas, son compuestos de alto peso molecular que presentan resistencia a la degradación biológica, debido a que en medios ácidos tienden a autocondensarse, representando la fracción recalcitrante de la DQO. En conjunto con compuestos clorofenólicos son los responsables del color del efluente, y aunque no presentan toxicidad, se ha demostrado que fracciones de lignina de bajo peso molecular son tóxicas (Vidal, 1999; Chamorro, 2005).

Los efluentes de la industria de la celulosa kraft contienen numerosos tipos de compuestos fenólicos desde simples monómeros hasta polifenoles de alto peso molecular que son generados durante el proceso de degradación de la lignina y la reacción de estas con agentes químicos clorados durante la etapa de blanqueo. Los clorofenoles son compuestos altamente tóxicos e inhiben la actividad metanogénica bacteriana en concentraciones bajas que fluctúan entre los 0,04 y 2 mg/l, sin embargo los fenoles de bajo peso molecular son biodegradables y su concentración puede disminuir por tratamientos anaeróbico (Rintala & Lepistö, 1992a; Vidal, 1999; Vidal *et al.*, 2001).

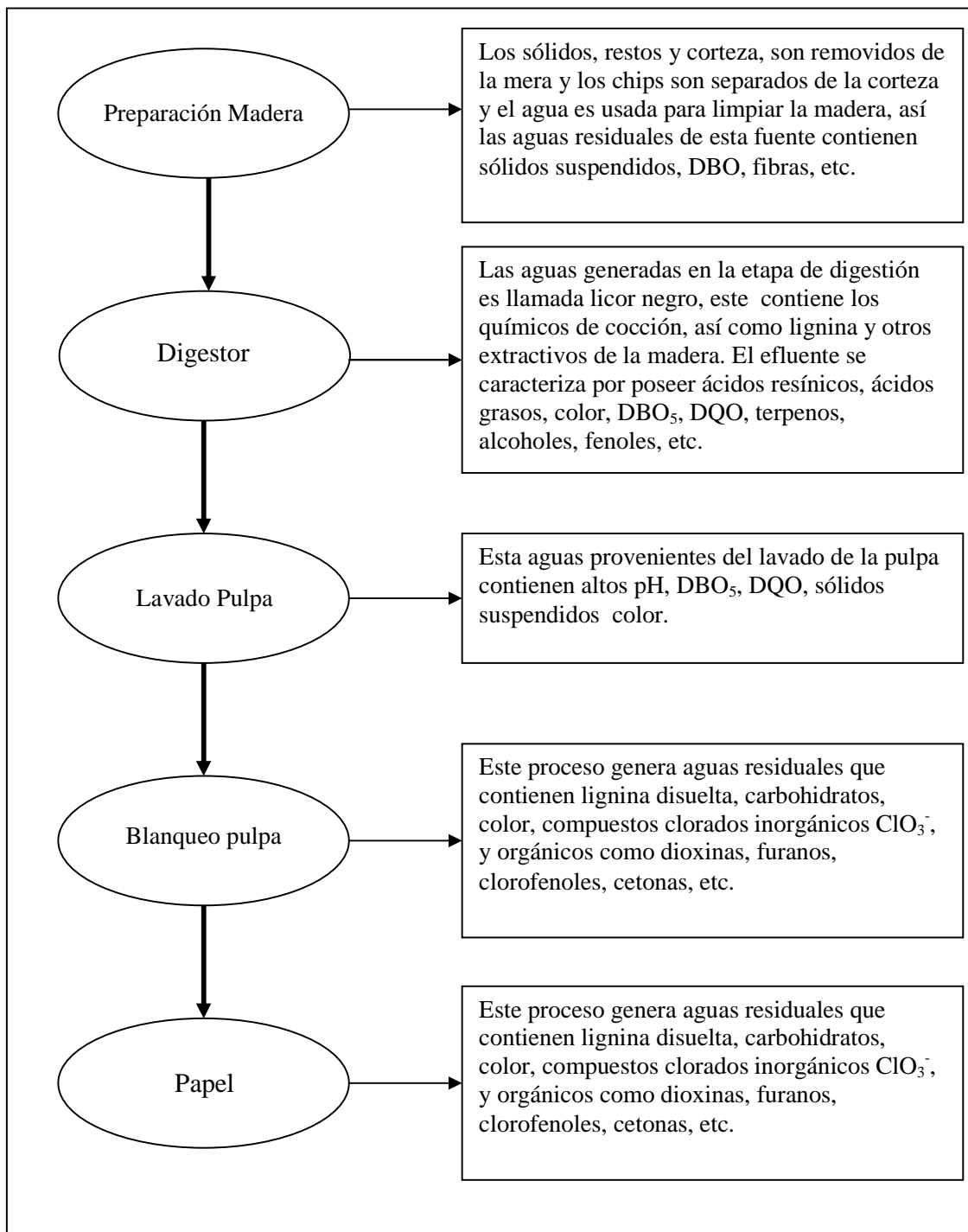


Figura 2. Contaminantes provenientes de varias fuentes en la producción de pulpa y papel. (Extraído: Pokhrel & Viraraghavan, 2004.)

En la Tabla 2 se muestran valores de concentración de distintos compuestos y parámetros medidos en efluentes de celulosa kraft, mientras que en la Tabla 3 se muestran distintos tipos de compuestos mas comunes encontrados en estos efluentes.

Tabla 2. Caracterización de efluentes provenientes de la producción de pulpa kraft.

<b>Parámetros</b>	<b>Rangos</b>	<b>Autor</b>
pH	3,5 – 10,7	Rintala & Lepistö, (1992a); Larrea <i>et al.</i> , (1989); Stauber <i>et al.</i> , (1996)
DQO (mg/l)	446 – 4112	Stauber <i>et al.</i> , (1996); Rohella <i>et al.</i> , (2001); Çeçen, (2003)
DBO <sub>5</sub> (mg/l)	180 – 630	Larrea <i>et al.</i> , (1989); Rintala & Lepistö, (1992b); Çeçen, (2003); Stauber <i>et al.</i> , (1996)
Sólidos suspendidos totales (g/l)	1,2 – 3,1	Vidal <i>et al.</i> , (2001)
Sulfatos (mg/l)	213	Rintala & Lepistö, (1992b)
Cloratos (mg/l)	71,3 – 100	Malmqvist & Gunnarsson, (1993); Malmqvist & Welander, (1994); Stauber <i>et al.</i> , (1996)
Fosfatos (mg/l)	0,4 – 2,18	Thompson <i>et al.</i> , (2001); Vidal <i>et al.</i> , (2001)
Conductividad (µS/cm)	0,08 – 0,98	Gaete <i>et al.</i> , (1999)
Compuestos fenolicos totales (mg/l)	190 – 350	Vidal <i>et al.</i> , (2001); Diez <i>et al.</i> , (2002)
Fenoles (g/l)	0,9 – 1,2	Vidal <i>et al.</i> , (2001)
Color (440 nm)	0,110 – 0,142	Çeçen, (1993)
Acidos resínicos (mg/l)	3 – 6	Liver and Hall (1996)
Lignina (mg/l)	44,0 – 64,0	Vidal <i>et al.</i> , (2001); Diez <i>et al.</i> , (2002)
Derivados de Lignina (254 nm)	1,325 – 1,689	Çeçen, (1993)

Los esteroides vegetales (fitoesteroides) son parte de los compuestos extractivos de la madera, cuya estructura molecular es similar a los esteroides hormonales de vertebrados, compuesta principalmente por un anillo esterol y una cadena lateral, participan en las rutas endocrinas y tienen importancia en la formación y mantención de membranas celulares (Kostamo and Kukkonen, 2003; Chamorro, 2005).

Tabla 3. Compuestos específicos que se han determinado en efluentes de celulosa kraft.

<b>Grupos</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Referencias</b>
Clorofenoles	2,4,6-triclorofenol	Crooks and Sikes, 1990; Correa <i>et al.</i> , 2006
	2,4-diclorofenol	Crooks and Sikes, 1990; Vidal, 1999
	4,5-diclorofenol	Vidal, 1999;
	Pentaclorofenol	Vidal, 1999;
	Dicloroguaicoles	Crooks and Sikes, 1990
	Diclorocatecol	Crooks and Sikes, 1990
	3,4,5-triclorocatecol	Crooks and Sikes, 1990
	Tetraclorocatecol	Crooks and Sikes, 1990
	Tricloroguaiacoles	Crooks and Sikes, 1990
	Tetracloroguaicol	Crooks and Sikes, 1990
Acidos grasos	Dicloroestearico	Crooks and Sikes, 1990
	Epoxyestearico	Crooks and Sikes, 1990
	Linoleico	Crooks and Sikes, 1990
	Linolenico	Ali and Sreekrishnan, 2001
	Oleico	Crooks and Sikes, 1990
Esteroles	$\beta$ -sitoesterol	Xavier <i>et al.</i> , 2005; Chamorro, 2005
	Sitoesterol	Xavier <i>et al.</i> , 2005; Chamorro, 2005
	Estigmaesterol	Chamorro, 2005
	Campesterol	Chamorro, 2005
	Stigmastanol	Chamorro, 2005
	17 $\beta$ -estradiol	Doyle and Lim, 2002
Asidos resínicos	Acido abiético	Liver and Hall, 1966; Belmonte <i>et al.</i> , 2005
	Acido dehidroabiético	Liver and Hall, 1966; Belmonte <i>et al.</i> , 2005
	Acido neoabiético	Werker and Hall, 1999.
	Acido pimárico	Liver and Hall, 1966; Hall and Liver, 1996;
	Acido isopimárico	Liver and Hall, 1966; Hall and Liver, 1996;
	Acido sandaracopimarico	Werker and Hall, 1966.
	Acido levopimarico	Liver and Hall, 1966; Hall and Liver, 1996;
	Acido palustrico	Liver and Hall, 1966; Hall and Liver, 1996;

La presencia de compuestos tóxicos inorgánicos como metales pesados, es determinada principalmente en procesos productivos TCF, en donde la utilización de peróxido de hidrógeno provoca una gran reacción de oxidación, actuando como agente corrosivo. Este proceso contribuye con el 30% de cadmio, 30% de plomo, 20% de cromo, 20% de níquel, y con el 10% de cobre y hierro a los cuerpos receptores de sus efluentes (Eklund *et al.*, 2002).

### **1.6. Efectos del efluente de pulpa kraft**

Los efectos de los residuos industriales líquidos provenientes de la industria de pulpa de celulosa kraft sobre los ambientes acuáticos que reciben sus descargas han sido examinados por décadas, no obstante sus efectos directos solo han sido estudiados desde fines de 1970, durante este periodo de tiempo, se han implementado varias regulaciones a las que la industria ha debido responder, resultando en una significativa reducción del impacto ambiental (Hewitt & Marvin, 2005).

Sin embargo otras respuestas ambientales han persistido y han resultado en el mayor interés de las investigaciones con respecto a este tipo de industrias, tal es el caso de los clorobencenos y otros compuestos clorados, que causan toxicidad aguda en peces que habitaban cerca de las descargas de estos efluentes (Hewitt & Marvin, 2005).

Dentro de los compuestos de bajo peso molecular, que son los más relevantes de estudiar, puesto que tienen una mayor probabilidad de alcanzar un sitio de acción tóxica en un organismo, están los ácidos resínicos, los compuestos fenólicos donde se incluyen los compuestos organoclorados formados durante el proceso de blanqueo y los esteroides. Además los compuestos de elevado peso molecular difícilmente cruzan la barrera biológica, por lo que ejercer una potencial acción tóxica para este tipo de compuesto es más difícil, aunque no se deben descartar en la evaluación de los efectos ecosistémicos (Barra, 2004).

Históricamente uno de los aspectos centrales en la evaluación de los efectos de las descargas de plantas de celulosa, fue detectar la presencia de compuestos organoclorados elevadamente tóxico tales como dioxinas y furanos, y por consiguiente la mayor parte de los efectos tóxicos observados eran atribuibles a estos compuestos, en particular cuando se descubre que ellos son formados en el proceso de blanqueo, debido a la utilización de cloro elemental (Barra, 2004).

Muchos autores han reportado la presencia de compuestos tóxicos en peces o el efecto sobre este grupo de organismo, entre los principales se encuentra: estrés respiratorio, toxicidad crónica y aguda, daño al hígado y gónadas, efectos genotóxicos y mutagénicos, disrupciones endocrinas, incremento en la actividad Monooxigenasa de Función Mixta (MFO) y alteraciones reproductivas como retardo de la maduración sexual, tamaño de la gónada y huevo, disminución en los niveles de hormonas y capacidad de biosíntesis esteroideal en las gónadas. Uno de los efectos mas característicos en peces expuestos a efluentes de celulosa kraft blanqueada, es la aparición de características sexuales masculinas en hembras, como el desarrollo de gonopodio en el pez mosquito, asociando este metamorfosis a compuestos androgénicos como la andostrenodiona (Barra, 2004; Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Gilman *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2003; Orrego, 2005).

Los ácidos resínicos son los compuestos que contribuyen de mayor manera a la toxicidad aguda del efluente en peces, cuyos valores de  $LC_{50}$  96 h en trucha arcoiris esta en el rango de 0,4 a 1,1 mg/l a pH 7,0, a demás de causar alteraciones fisiológicas, reproductivas y bioquímicas. Para *Daphnia magna* se observan valores de toxicidad aguda de  $LC_{50}$  24h entre 10,19 a 15 mg/l, mientras que un efecto subletal se observa en concertaciones mayores a 4 mg/l (Kamaya *et al.*, 2005).

Culp *et al.*, (2003) establecieron los efectos de los efluentes de la industria de pulpa sobre ecosistemas bentónicos, indicando la incorporación de estos efluentes industriales altera su estructura comunitaria, principalmente en abundancia y riqueza taxonómica, de quironómidos, oliquetos, hydras y algas. Señalan a demás que el mayor impacto sobre el



ecosistema es la incorporación de nutrientes, provocando un aumento de la tasa de producción primaria.

El color del efluente, si bien está constituido por compuestos que no presentan toxicidad, afecta de gran manera la inhibición de los procesos naturales de fotosíntesis debido a que absorbe la luz solar, esto provoca una cadena de efectos adversos sobre el ecosistema acuático inhibiendo la producción primaria así como también el crecimiento de consumidores primarios, secundarios y terciarios (Sahoo and Gupta, 2006).

Muchos de estos compuestos orgánicos vertidos son altamente genotóxicos, Maria *et al.*, (2003) hacen referencia principalmente del ácido abiético, ácido dehidroabiético y reteno como causantes de este efecto. Los principales compuestos y sus efectos se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Efectos posibles en sistemas acuáticos receptores de efluentes de celulosa kraft

<b>Parámetros</b>	<b>Efectos</b>	<b>Referencias</b>
AOX	Agudo	Schnell <i>et al.</i> , 2000
Dioxinas y Furanos	Agudo	Orrego, 2005
Materia Orgánica	Eutroficación	Karrasch <i>et al.</i> , 2006
Nutrientes	Eutroficación	<i>Karrasch et al.</i> , 2006
Color	Cambios biodiversidad	Culp <i>et al.</i> , 2003; Sahoo and Gupta, 2006.
Acidos resínicos	Agudos y Crónicos	Belmonte <i>et al.</i> , 2006; Liver and Hall 1996
Esteroles	Crónicos	Cody and Bortone, 1997; Xavier <i>et al.</i> , 2005.
Acidos Grasos de cadena larga	Crónicos	Sierra-Alvarez and Lettinga, 1990
Flavonoides	Crónicos	Cody and Bortone, 1997

## **1.7. Identificación compuestos contaminantes específicos y ensayos de toxicidad**

Las descargas de los desechos de la industria de celulosa kraft sobre cuerpos de agua receptores requiere de la identificación de compuestos específicos que causan la toxicidad de los efluente, uno de los métodos usados es la técnica de fraccionamiento conocida como proceso de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE), método desarrollado por la U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) para monitorear y controlar estas descargas (Mount & Hockett, 2000).

Este procedimiento ha resultado ser una herramienta efectiva par caracterizar e identificar tóxicos en muestras de efluentes, sedimentos, ambientes acuáticos y otras mezclas complejas, siendo también una guía para el tratamiento de sus efluentes (Besser *et al.*, 1998; Mount & Hockett, 2000; Hongxia *et al.*, 2004).

Esta técnica combina pruebas toxicológicas (bioensayos) con diversas técnicas de fraccionamiento selectivo y análisis para detectar, identificar y confirmar los compuestos causantes de la toxicidad aguda y/o crónica de un efluente, debido a que los fraccionamientos permiten eliminar ciertos compuestos tóxicos con las mismas características de manera que ya no sean biodisponibles (Gajardo, 2001).

El procedimiento TIE consta de tres fases: 1) Caracterización, 2) Identificación y 3) Confirmación. En la primera etapa se determinan la características físico-químicas del efluente tales como: solubilidad, volatilidad, especificidad, etc., de los constituyentes tóxicos, a través de la combinación de los fraccionamientos con las pruebas toxicológicas.

La primera fase permite clasificar los compuestos tóxicos en las siguientes categorías: cationes, aniones, metales quelantes, compuestos orgánicos apolares, compuestos volátiles, materia filtrable ó material particulado y oxidantes, para lo cual es necesario una comparación entre la toxicidad antes y después de cada fraccionamiento (EPA, 1988).

En la fase 2 se identifica y separan los compuestos xenobióticos, basado en los resultados de la etapa anterior, se separan las fracciones tóxicas de las no tóxicas, se realizan los análisis químicos y se comparan las concentraciones obtenidas con los valores de toxicidad aguda (LC<sub>50</sub> 24h) de los tóxicos sospechosos (EPA, 1989a). En la última etapa se confirman el ó los compuestos tóxicos responsables de la toxicidad observada mediante diferentes técnicas de confirmación como: correlación entre la concentración de los compuestos tóxicos sospechosos y la toxicidad observada, observación de síntomas del organismo expuesto a compuestos tóxicos y por último se comparan estos resultados, con los obtenidos cuando esta expuesto a la muestra original (EPA, 1989b).

Dentro de los diversos estudios que se ha utilizado este procedimiento están la identificación de amonio tóxico y su potencial disminución de la toxicidad utilizando zeolita, la confirmación de metales pesados en sedimentos, la evaluación de aguas residuales municipales, caracterización lodos activados con aportes industriales, evaluación de los constituyentes persistentes y no persistentes de sedimentos marinos, evaluar los puntos de impacto de polucionantes, caracterizar las descargas industriales en ambientes marinos, y también la identificación de iones tóxicos (Karuppiah & Gupta, 1996; Burgess *et al.*, 1995; Van Sprang & Janssen, 1997; Tietge *et al.*, 1997; Besser *et al.*, 1998; Hongxia *et al.*, 2004; Stronkhorst *et al.*, 2003; Pessala *et al* 2004; Guzzella *et al.*, 1996; Burgess *et al.*, 2003).

Las pruebas toxicológicas o bioensayos más tradicionales se basan en el efecto provocado por la presencia de los vertidos sobre organismos acuáticos como por ejemplo *Daphnia magna* (Ramos, 1996), especie que ha sido usada extensivamente como importante representante de la trama trófica dulceacuícola, para evaluar la toxicidad de los compuestos químicos que proponen algún riesgo para el ambiente a través de la producción, uso ó disposición de estos (Olmstead & LeBlanc, 2000).

Las poblaciones de *D. magna* se reproducen por partenogénesis cíclica, incluyendo reproducción sexual y asexual, por lo que los cultivos de laboratorio son típicamente mantenidos en ese estado, ya que la evaluación principal de la toxicidad sobre el ciclo de

vida de los cladóceros incluye solo efectos en ese tipo de reproducción, esto debido principalmente a que la reproducción sexual involucra una fertilización de los huevos, provocando un intercambio genético, en respuesta a cambios en el medio, como puede ser la presencia de contaminantes (Olmstead & LeBlanc, 2000).

Los bioensayos han sido desarrollados y estandarizados por agencias internacionales de protección ambiental (USEPA). En años recientes estas pruebas de toxicidad han sido incorporadas a cuerpos legales para otorgar los permisos de descargas de efluentes en sistemas acuáticos. La utilización de *D. magna*, se debe a que es un consumidor primario y se caracteriza por presentar una alta tasa de sensibilidad a bajas concentraciones de compuestos tóxicos. En general las respuestas que se evalúan en los dáfnidos son la movilidad, mortalidad y reproducción (Cáceres, 1998; Olmstead & LeBlanc, 2000; Gajardo, 2001).

Los test con *Daphnia magna* 24-48 horas (bioensayo toxicidad aguda) son requerido por las autoridades internacionales, como un criterio para la evaluación de la toxicidad de aguas, y para la notificación de nuevas sustancias, permitiendo evaluar efectos letales y subletales sobre la población, mas específicamente sobre la muerte y reproducción, y a la vez obtener información sobre la Concentraciones Letal y Efectiva (LC<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub>) (Radix *et al.*, 1999).

## **2. HIPÓTESIS**

La técnica de fraccionamiento TIE, permitirá identificar potenciales compuestos tóxicos presentes en un efluente de la industria de celulosa kraft proveniente de la etapa E1 de blanqueo, considerando caracterizaciones físico-químicas y toxicológicas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Identificar el o los compuestos causantes de la toxicidad aguda en un efluente industrial de celulosa kraft, proveniente de la etapa de E1 de blanqueo, a través de la evaluación y caracterización química y toxicológica de estas descargas, usando la técnica de fraccionamiento TIE.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar la toxicidad aguda de un efluente de la etapa de blanqueo E1 de celulosa kraft utilizando *Daphnia magna*.
- Fraccionar el efluente de la etapa de blanqueo E1 de celulosa kraft usando la técnica de fraccionamiento TIE.
- Determinar las características físico-químicas y toxicológicas de las diferentes fracciones del efluente de la etapa de blanqueo E1 de celulosa kraft.

## **4. METODOLOGÍA**

El efluente a evaluar proviene de la etapa E1 de blanqueo kraft, de un proceso productivo EFC, en donde se utiliza Dióxido de cloro en la etapa de blanqueo propiamente tal y se adiciona sulfito de sodio ( $\text{NaSO}_3$ ) e hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) como método de extracción alcalina (Pokhrel & Viraraghavan, 2004; Lema *et al.*, 1998; Diez *et al.*, 2002). En el laboratorio a la muestra se le realizan análisis físico-químico y toxicológico, directamente sin aplicar ningún tipo de tratamiento, esta caracterización del efluente nos entrega la información para poder comparar los parámetros una vez que se haya realizado la técnica de fraccionamiento propuesta por USEPA (1988, 1989a y 1989b), en donde el efluente es sometido a diferentes tratamientos permitiendo separar las fracciones tóxicas de los no tóxicas.

### **4.1. Procedimiento de Identificación y Evaluación de la Toxicidad (TIE)**

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) desarrolló esta técnica para identificar de manera rápida, relativamente menos costosa y segura los compuestos tóxicos presentes en muestras complejas. Cabe señalar que durante el fraccionamiento se anotan todos los cambios observados, como precipitación, turbiedad, cambio de color, etc. (EPA, 1988).

La técnica TIE (Identification Evaluation), combina pruebas toxicológicas con diversas técnicas de fraccionamientos selectivos y análisis, para detectar, identificar y confirmar los compuestos causantes de la toxicidad. Esta combinación permite que un grupo de compuestos tóxicos con las mismas características se eliminen de tal forma que ya no sean biodisponibles.

El conocimiento de las características físico-químicas permite desarrollar en forma más fácil un plan de manejo para reducir la toxicidad, considerando los fenómenos de especiación, sinergismo o antagonismo, que juegan un papel importante en la biodisponibilidad y la toxicidad de la muestra de contaminantes.

Este procedimiento consta de tres fases:

**Fase 1 Caracterización:** En esta etapa se determinan las características físicas y químicas (como solubilidad, volatilidad, filtrabilidad, etc.) de los constituyentes tóxicos a través de la combinación de los fraccionamientos con las pruebas toxicológicas. Al comparar la toxicidad antes y después de cada fraccionamiento se puede caracterizar los compuestos tóxicos y ordenar por las siguientes categorías: cationes, aniones, metales quelantes, compuestos orgánicos apolares, componentes volátiles, materia filtrable o material particulado y oxidantes.

**Fase 2 Identificación:** Identifica y separa los compuestos xenobióticos. Basado en los resultados de la fase 1, primero se separan los compuestos tóxicos de los no tóxicos, después de los fraccionamientos se efectúan los análisis químicos, cuantificando la concentración de los contaminantes sospechosos se comparan con los valores de toxicidad aguda ( $LC_{50}$ ).

**Fase 3 Confirmación:** Confirma si los compuestos tóxicos identificados son responsables de la toxicidad observada, existen diferentes técnicas de confirmación, entre las cuales se encuentran:

- correlaciones: se investiga si hay una correlación entre la concentración de los compuestos tóxicos sospechosos y la toxicidad observada.
- Observación de síntomas: se compara los síntomas del organismo indicador expuesto a los compuestos tóxicos sospechosos con los síntomas cuando está expuesto al efluente. Cuando se observan síntomas diferentes, se concluye que se trata probablemente de compuestos diferentes.
- Spiking: se investiga si un aumento en la concentración de los compuestos tóxicos sospechosos tiene como consecuencia un aumento proporcional de la toxicidad observada.

En la mayoría de los casos, un solo método no es suficiente o adecuado y se recomienda utilizar diferentes alternativas. La fase de confirmación es necesaria por las consiguientes razones: mostrar que los compuestos tóxicos sospechosos causan la toxicidad observada,

también garantizar que la toxicidad es permanente en el tiempo para que se puedan planificar las medidas adecuadas.

Después de la confirmación, se pueda planificar medidas específicas para reducir la toxicidad a un nivel aceptable, por ejemplo ajustando el proceso de producción (medida preventiva) o eligiendo un tratamiento adecuado (medida curativa).

Se puede concluir que la técnica TIE. Con los conceptos toxicológicos es el procedimiento más adecuado para identificar los compuestos tóxicos de efluentes complejos. La técnica es relativamente rápida, fácil en su realización, y es confiable, debido a la combinación con ensayos toxicológicos y análisis físico-químicos.

4.1.1. Fase de Caracterización: Esta primera fase del procedimiento TIE se divide en 2 partes principales, análisis ecotoxicológicos a través de bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (EPA, 1993) y medición de parámetros físico-químicos según protocolo APHA (1989).

#### **- Protocolo de Bioensayo Agudo**

Se define como bioensayo al método utilizado para evaluar la potencia relativa de un agente químico sobre organismos vivos, a través de la comparación de ese agente con el efecto de una solución patrón o estándar. Las condiciones generales se detallan en la Tabla 5.

Para la realización de los bioensayos (crónico y agudo) se utilizan cladóceros de la especie *Daphnia magna*, organismos que son ampliamente usados debido a que son de amplia distribución y representantes importantes de las comunidades zooplanctónicas y de los ecosistemas dulceacuícola, son de fácil mantención en condiciones de laboratorio, se reproducen partenogénicamente, asegurando uniformidad de respuestas a determinadas condiciones ambientales y presentan generaciones cortas y con alto número de crías, pudiendo generar estudios sobre generaciones sucesivas (EPA, 1993)



Los dafnidos utilizados son obtenidos de cultivos del Laboratorio de Bioensayos de Centro EULA-Chile de la Universidad de Concepción, siendo alimentados con microalgas (suplemento) del genero *Selenastrum capricornutum* y alimento YCT (en base a levadura, harina de pescado y alfalfa). Son mantenidos en envases de cultivo de 1 l y se les provee con alimento y algas 3 veces por semana. Con recambio de agua cada 48 h. Cultivos y experimentos son mantenidos a 20 °C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Estas condiciones de laboratorio mantienen a los daphnidos en ciclo partenogénico.

Tabla 5. Resumen de las condiciones y criterios de aceptabilidad de la prueba de toxicidad aguda con *Daphnia magna*.

Variable	Especificación
Tipo de Bioensayo	Estático sin recambio
Tiempo de exposición	24 o 48 h
Temperatura	20 ± 0,2 °C
Fotoperíodo	16 h luz, 8 h oscuridad
Tamaño Cámaras	30 ml
Volumen solución	20 - 25 ml
Edad organismos	Neonatos < 24 h
Nº replicas por concentración	4
Nº concentraciones mas control	6 mas el control
Nº organismos por concentración	20
Alimentación	Hasta una hora antes del ensayo
Aireación	80% saturación O <sub>2</sub>
Agua dilución	Reconstituida
Respuesta	Mortalidad, movilidad
Criterio aceptabilidad	Sobrevivencia control ≥ 90%

La toxicidad aguda consiste en una exposición de juveniles de *D. magna* a diferentes concentraciones de una agente toxico (efluente industrial celulosa kraft) por un periodo de 24 horas. En general es utilizado para determinar la concentración de un material testo o toxico determinado que produce un efecto adverso sobre un porcentaje especifico de organismos durante una corta exposición (NCh 2083, 1999).

Se establecen rangos de concentración del tóxico a estudiar que pueden afectar negativamente a la especie de prueba. El objetivo de este test es determinar la magnitud de las concentraciones a las cuales se debe trabajar, para poder obtener las curvas de concentración-respuesta y los valores de EC<sub>50</sub> 24h. Para determinar estos valores se

emplean cinco o más concentraciones con rangos establecidos de dilución 100, 50, 25, 12,5 y 6,25%.

#### **- Análisis estadístico de resultados: Método de Spearman-Kärber**

Es un procedimiento estadístico no paramétrico para estimar la  $LC_{50}$  y el intervalo de confianza del 95% asociado a ella, surgido como modificación del método tradicional. Este método estima la media de la distribución  $\log_{10}$  de la tolerancia al tóxico, si las proporciones de la respuesta no crecientes respecto del incremento de la concentración, los datos son corregidos y ajustados, el uso de este método se reserva cuando existen mortalidades parciales en las soluciones de ensayo pero no se ajustan al modelo Probit (EPA, 1993).

Este programa desarrolla automáticamente las siguientes funciones:

Ajuste de los datos observados;

Ajustes respecto de la mortalidad en los controles

Cálculo de la  $LC_{50}$  y  $EC_{50}$ .

Cálculo del intervalo de confianza del 95% (EPA, 1993).

#### **- Caracterización físico-química del efluente de celulosa kraft**

Previo a la prueba toxicológica inicial, se deben efectuar análisis físico-químicos como: pH,  $DBO_5$ ,  $DQO$ , sólidos suspendidos totales (SST), conductividad, sulfatos, cloratos, nitratos, fosfatos, absorbancia para medir el color (440 nm), ácido lignosulfónico, lignina, derivados de lignina y compuestos fenólicos totales.. Los diferentes métodos para medir estos parámetros son los siguientes:

##### **Medida del pH**

Se realiza la medida directamente con un peachimetro marca Inolab modelo pH level 1 y dependiendo de la característica del análisis se utiliza NaOH o HCl para neutralización. El pH inicial de un efluente se llamara en lo sucesivo  $pH_i$  y juega un papel muy importante en

la técnica de fraccionamiento. Por conveniencia se fijó este valor de pH en 7,5 para todo tipo de prueba que requiera análisis a pH.

### **Demanda Biológica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>)**

La prueba DBO<sub>5</sub> estima el oxígeno gastado en la descomposición biológica actual de una muestra residual, y es, efectivamente, una simulación del proceso microbiano de autopurificación. La determinación de la demanda bioquímica de oxígeno es un test empírico que consiste en determinar el consumido por microorganismos, cuando se incubaba una muestra en la oscuridad a 20 °C, durante 5 días, en botellas de 200 – 300 ml con tapa de vidrio esmerilada, utilizando sellos de agua, evitando que queden burbujas de aire dentro de la botella. Posteriormente se llevan a las cámaras de incubación, BSB-Controller Modell 1020T, excluyendo toda fuente de luz para evitar la producción de oxígeno por fotosíntesis. A cada botella se le agregan 4 ml de la muestra previamente filtrada, 0,3 ml de solución de buffer fosfato, 0,3 ml de sulfato de magnesio, 0,3 ml de cloruro de calcio y 0,3 ml de cloruro férrico. Se llenan las botellas con agua destilada previamente aireada al menos durante 8 horas. Se determina el oxígeno inicial y final (después del periodo de incubación) utilizando el método de Winckler azida modificada. En el experimento se utiliza como referencia una botella blanco que contiene los nutrientes y agua donde el oxígeno consumido no debe ser mayor a 0,2 mg O<sub>2</sub> /l. Para calcular la demanda de oxígeno de la muestra se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$DBO_5 = \frac{V_t \times 8000 \times 300 \times 0.025}{100 \times V_m} = mgO_2 / l,$$

donde:

$V_t$  = Diferencia entre la cantidad inicial y final de oxígeno medidos ( $V_i - V_f$ )

$V_m$  = Volumen de alícuota tomada de muestra.

### **Demanda Química de Oxígeno (DQO)**

La demanda química de oxígeno corresponde al equivalente de la materia orgánica de una muestra que es susceptible a la oxidación por un fuerte oxidante químico. Casi todas las sustancias orgánicas se oxidan virtualmente en su totalidad por este procedimiento, con la excepción de ciertos compuestos aromáticos. El valor DQO da por tanto una idea del contenido orgánico total de un residuo, es o no biodegradable. Para obtener la DQO en un tubo de digestión se colocan 2,5 ml de muestra, diluida si su valor sobre pasa los 900 mg/l, del mismo modo se prepara un blanco con 2,5 ml de agua destilada, cada tubo se prepara con una replica. Posteriormente se le agregan 1,5 ml de solución digestora y 3,5 ml de solución catalítica. Se cierran los tapos y se agitan para homogeneizar la muestra y se mantienen durante 2 horas a 150 °C, luego se dejan enfriar a temperatura ambiente. El cálculo del valor DQO se obtiene con la lectura de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm y cuyo valor se multiplica por el factor de dilución. El valor se expresa en mg O<sub>2</sub> / l.

### **Determinación sulfatos**

Se basa en que una muestra filtrada es expresado el color en términos de longitud de onda predominante, el grado de brillantez por luminiscencia y la saturación por grado de pureza. La mejor manera de obtener estos valores de concentración de sulfatos es por medio de la transmisión de luz, característica de las muestras filtradas, medidas por espectrofotometría. Esta técnica posee un valor mínimo detectable para la concentración de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, que es de 1 mg/l. La longitud de onda para medir los sulfatos es de 420 nm. El procedimiento es por medio de la formación de turbidez por sulfato de bario, se miden 25 ml de muestra filtrada y diluida en caso de tener color (anotar el factor de dilución) en un vaso precipitado de 100 ml y se adiciona sulfato de bario, se agita por 1 minuto a velocidad constante, después que el período de agitación ha terminado, se coloca solución en la cubeta de vidrio y se mide en el espectrofotómetro a 5 ± 0,5 minutos. Previamente se realiza una curva de calibración en un rango de 0 a 40 mg/l.

### **Determinación Cloratos ( $\text{ClO}_3^-$ )**

Consiste en hacer reaccionar el ión clorato en medio ácido con bromuro de sodio, para luego reaccionar el bromo formado con yoduro de potasio, de esta forma el yodo libre formado se valora con tiosulfato de sodio 0,1 N, usando almidón como indicador. Para la determinación de cloratos se colocan 1 a 1,5 ml de muestra en un matraz erlenmeyer de 125 ml, se le agregan 2 ml de NaBr al 10 % y 10 ml de HCl concentrado. Se agita la muestra y deja reposar por 5 minutos. Posteriormente se adicionan 40 ml de agua destilada y luego 2 ml de KI al 10%. Para finalizar se agregan 0,5 ml de almidón y se titula con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0025N. El valor de la concentración de cloratos se obtiene de la siguiente manera:

$$\text{NaClO}(\text{mg/l}) = \frac{A \times 8,345 \times 0,0025N \times 1000}{V \times 6 \times 0.1}$$

donde:

A: volumen de titulación.

V: volumen de muestra.

### **Determinación de Compuestos Fenólicos Totales**

El objetivo de este método es la obtención mediante un análisis rápido de la cantidad de compuestos aromáticos presentes en el efluente. Este método consiste en la realización de una prueba de espectrofotometría UV a una longitud de onda de 215 nm, en un espectrofotómetro Termo Spectrónica Genesys 10w, longitud a la cual existe un máximo de absorción para este tipo de compuestos aromáticos, por tanto podemos relacionar la concentración con la medida de absorbancia. La muestra a la cual se le practica el análisis se debe filtrar para luego poner en una cubeta de cuarzo 2 ml de buffer y 100 microlitos de la muestra problema previamente. Los valores de absorbancia obtenidos deben estar en el rango 0,2 a 0,8, de no ser así, adecuar la dilución correcta de la muestra.

### **Determinación del Color**

Se basa en que en una muestra filtrada es expresado el color en términos de absorbancia a una longitud de onda determinada, luego de ajustar el pH 9 para permitir una mayor resonancia de los dobles enlaces conjugados, y por lo tanto un incremento aparente del color. Primero se ajusta el pH de la muestra a 9. Se filtra la muestra a través de papel filtro GC 50 de 47 ó 24 mm de diámetro y se mide por espectrofotometría a 440 nm en cubeta de vidrio, usando agua destilada o desionizada como blanco.

### **Determinación de Sólidos Suspendidos Totales**

El residuo suspendido total corresponde al residuo que queda luego de que una muestra de agua o RIL puesta en una cápsula de porcelana es evaporada y secada a 103-105° C. El incremento del peso de la cápsula representa los sólidos suspendidos totales. Se registra el peso en gramos de una cápsula de porcelana limpia y seca. Se adiciona un volumen medido de muestra sobre la cápsula de porcelana. Se coloca la cápsula de porcelana con la muestra a evaporar y secar en una estufa de secado de 103-105 °C durante 24 h. Posteriormente se retira la cápsula desde la estufa y se coloca en desecador para luego pesar la cápsula. El valor de los sólidos suspendidos totales se determina de la siguiente manera:

$$\text{SolidosSuspendidosTotales}(g/l) = \frac{(B - A) \times 1000}{V(ml)}$$

donde:

A: peso (g) de la cápsula vacía.

B: peso (g) de la cápsula más el residuo.

V: volumen de muestra (ml)

### **- Fraccionamientos**

**Test de Aireación:** Con este test se busca caracterizar los compuestos volátiles, oxidante y/o tensoactivos. La muestra se deja airear por una hora en matraces Erlenmeyer de 500 ml con bombas aireadoras y pipetas Pasteur en tres medidas de pH 3,0 – 7,5 – 11. Se procura medir a intervalos de tiempo constante para controlar posibles variaciones de este.

**Test de intercambio aniónico:** Este test utiliza una resina de aniones (Amberlita 4400 OH. Sigma) que reemplaza los aniones por OH<sup>-</sup>. La resina usada no es específica para ciertos químicos, reemplaza muchos diferentes aniones y también funciona como filtro molecular.

**Test de intercambio catiónico:** La muestra pasa por una resina catiónica (Amberlita ir-120 plus. Sigma) de iones de Na<sup>+</sup>, en donde los cationes se reemplazan por estos iones. De este modo los cationes tóxicos se eliminan de la muestra que influencia la toxicidad. Al no ser la resina específica para ciertos químicos, reemplaza muchos cationes diferentes, funcionando a la vez como filtro molecular.

**Test de carbón activado:** Este test se desarrolla para conocer si compuestos que causan la toxicidad son orgánicos apolares o complejos de metales. La muestra fluye a través de columna de un adsorbante octodecil y los compuestos orgánicos reaccionan según su solubilidad y polaridad de tal manera que se pueden haber extraído del efluente.

**Test de Filtración:** Este fraccionamiento informa por un lado sobre la interacción física entre los contaminantes y el material hidrófobo (algodón Hidrófobo), de filtración y por otro lado sobre la eliminación de los compuestos tóxicos que resulta de la precipitación y filtración. Muchos factores influyen el grado de la adsorción de entre ellos: el pH, la carga de superficie, la polaridad, la solubilidad, la matriz de la muestra, por lo que el test se realiza en tres medias de pH diferentes: 3,0 – 7,5 – 11.

**Test de Adaptación:** este test muestra la influencia del pH sobre la toxicidad de los contaminantes. Cambios de pH pueden influir en gran medida por ejemplo en la solubilidad, la polaridad, la volatilidad, la estabilidad, la especiación y el estado iónico de los compuestos tóxicos y por consiguiente la toxicidad observada de la muestra. Para la realización de este test se cambio el pH de la muestra a 3 y a 11 por cuatro horas y posteriormente se ajusto a pHi.

**Test de Quelantes (test EDTA):** El test de Quelantes se realiza con EDTA (etilenodiaminotetracetico) un quelante para muchos cationes. Se observa que el complejo

EDTA-metal en muchos casos es menos tóxico que el metal no-complejado. Entonces a través de este test, se puede determinar si la toxicidad se atribuye a cationes o no. La acción del EDTA depende del pH de la solución, el tipo y la especiación del metal, la presencia de otros ligandos y la afinidad de combinación del metal con EDTA. Los metales mas importantes que forman quelante con EDTA son : Al, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn(+II), Ni, Sr y Zn, sin embargo no forma quelantes con aniones como cromato y cromato hídrico.

**Test de Graduación:** el objetivo es conocer si la toxicidad se debe a componentes cuya actividad depende del pH. De estos componentes sólo nos interesan los que tienen un pKa que admite una disociación suficiente entre el intervalo del pH aceptable para el organismo. Además, la forma disociada y la no-disociada deben tener una toxicidad diferente que sea detectable por el bioindicador. Algunos compuestos orgánicos y el  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CN}^-$ , tienen estas características.

Para la realización de los fraccionamientos se utilizaran columnas de vidrio de 35 x 2,5 cm dentro de las cuales se colocaron 25 g de resinas de intercambio catiónico y aniónico, 20 g de carbón activado y el algodón hidrofóbico. Por medio del uso de una bomba peristáltica Master flex Cole Parmer 7553-85 de flujo 1,2 ml / minuto, se hizo pasar 400 ml de muestra del efluente, para cada uno de los tratamientos y se almacenaron en recipientes de plástico a temperaturas menor a 4 °C. Para los test de adaptación, aireación, graduación y EDTA se realizaron en vasos precipitados de 500 ml, durante 4, 1, 1 y 2 hora respectivamente.

#### - Análisis de resultados

Una vez obtenidas las concentraciones a las cuales se obtuvo el nivel de efecto para *Daphnia magna* de cada fraccionamiento y el test de referencia se transforman a unidad de toxicidad (UT) por medio de la siguiente expresión:

$$UT = \left( \frac{1}{EC_{50}} \right) \times 100$$



Si se comparan las UT de los fraccionamientos con las unidades del test de referencia obtenemos el porcentaje de reducción de la toxicidad (%RT):

$$\% RT = \left( 1 - \left( \frac{UT_{FRACCIONAMIENTO}}{UT_{REFERENCIA}} \right) \right) \times 100$$

Luego se obtiene el perfil de reducción de la toxicidad (PRT) poniendo cada fraccionamiento en abscisa y la RT en la ordenada.

Comparando estos perfiles con la literatura se puede obtener el o los contaminantes sospechosos de cada muestra (EPA, 1988).

4.1.2. Fase de Identificación: Este estudio realiza su fase de identificación por medio del análisis de cluster o agrupamiento entre el perfil de reducción de la toxicidad de la muestra y de diferentes afluentes artificiales, los efluentes artificiales son soluciones de tóxicos puros, estos análisis de cluster se aplican, cuando uno debe organizar y clasificar una base de datos para obtener información mas concreta y practica. Por medio de algoritmos, los datos mas similares se agrupan primero para formar un cluster, luego se comparan este cluster con los demás datos y los datos que tienen mas similitudes se asocian, se realiza cada vez un nuevo cluster hasta que todos los datos estén unidos entre ellos la distancia de unión es una medida de similitud entre los datos. Cuanto mas pequeña la distancia de unión, mas similitudes entre los grupos de datos. En concreto, el PRT de cada fraccionamiento de la muestra se agrupa en diferentes clases, cabe destacar que los fraccionamientos que no eliminan los contaminantes sospechosos y solamente cambian la biodisponibilidad, no se incluyen en los análisis de cluster.

4.1.3. Fase de Confirmación: Se compara fraccionamiento se realizan análisis químico y toxicológico y se observan los contaminantes sospechosos caracterizados e identificados. Se compara la concentración del contaminante sospechoso (análisis químico) de cada fraccionamiento con la concentración del contaminante en la referencia.

El porcentaje de Reducción del Contaminante (%RC), se calcula:

$$\%RC = (1 - (\text{Contaminante}_{\text{fraccionamiento}} / \text{Contaminante}_{\text{referencia}})) \times 100$$

Por cada fraccionamiento, se compara la toxicidad teórica del contaminante o los contaminantes con la toxicidad observada de la muestra, suponiendo que los compuestos se encuentran 100% biodisponibles. La concentración de los contaminantes individuales se expresa como fracción de su valor LC<sub>50</sub> 24h, es decir, la toxicidad teórica del contaminante sospechoso se expresa en unidades tóxicas.

$$UT_{\text{teórica}} = (C_i / LC_{50i} \text{ 24 h})$$

#### - Análisis de cromatografía de gases acoplado masa (GC/MS)

Con el fin de confirmar el compuesto sospechoso, a las muestras de los tratamientos que fueron más efectivos en la reducción de la toxicidad, se les realiza análisis cromatográfico de gases acoplado masa, utilizando la siguiente metodología:

Al cromatógrafo se le inyecta un volumen de inyección de 1 µL de muestra en el inyector que se encuentra a una temperatura de 280°C, con un flujo de gas portador de 50 ml/minuto y una temperatura de la interfase de 325°C. la columna de inyección es de DB-5, con una longitud de 30 m y un diámetro de 0,25 µm DI, el solvente es DCM siendo la muestra no derivatisada.

El programa de temperatura del horno se presenta en la siguiente tabla

Tabla 6. Resumen de las temperaturas del horno y el tiempo de exposición

Rate (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
-	60	1.0
3	80	1.0
4	240	1.0
3	300	1.0

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterización físico-química de la muestra y toxicidad

El alto valor de pH (10,53) se debe a que el efluente proviene de la etapa de extracción alcalina, donde utilizan peróxidos como compuestos químicos principales (NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc.) para aumentar la remoción de lignina remanente. Además este efluente se caracteriza por una DQO promedio de 1348 mg/l, indica alta cantidad de materia orgánica oxidable químicamente presente en el efluente. Congruentemente el valor de DBO<sub>5</sub> (397,5 mg/l) señala también que el efluente posee gran cantidad de materia orgánica biodegradable como ácidos grasos, ácidos resínicos, etc. El color de efluente esta compuesto principalmente por ligninas oxidadas, sus derivados y taninos polimerizados (Zhang and Chuang, 2001), su concentración es la medida de la absorbancia a un longitud de onda de 440 nm, e indica la presencia de estos compuestos en pequeñas cantidades en el efluente. En la Tabla 7 se muestran las características físico-químicos y de toxicidad del efluente de celulosa kraft analizado en laboratorio

Tabla 7. Características físico-químicas del efluente de pulpa kraft y valor LC<sub>50</sub> 24 h

<b>Parámetros</b>	<b>Valor</b>	<b>Rangos</b>
pH	10,53	10,3 – 10,8
DQO (mg/l)	1348,8	1340 – 1350
DBO <sub>5</sub> (mg/l)	397,50	320 – 430
Sulfatos (mg/l)	23,93	21,3 – 30,6
Cloratos (mg/l)	13,91	5,65 – 22,3
Fosfatos (mg/l)	< 0,16	-
Conductividad (μS/cm)	0,14	0,08 – 0,98
Compuestos fenólicos totales (mg/l)	853,7	802,5 – 905,6
Color (440 nm)	0,204	0,197 – 0,212
Acido lignosulfónico (346 nm)	0,138	0,130 – 0,142
Lignina (280 nm)	0,703	0,685 – 0,710
Lignina (272 nm)	0,772	0,735 – 0,810
Derivados de Lignina (254 nm)	0,937	0,905 – 1,231
Toxicidad LC <sub>50</sub> (%) 24 h	27,56	20,35 – 31,6

Los compuestos fenólicos totales se encuentran en altas concentraciones en el efluente llegando casi a los 900 mg/l, estos compuestos generados por residuos de lignina,

contemplan una gran variedad de compuestos de alto peso molecular como los clorofenoles y también moléculas más simples, aunque no poseen toxicidad aguda están contribuyendo de manera directa en el color de la muestra (Chamorro, 2005).

El análisis de absorbancia entrega valores de la concentración de lignina, derivados de lignina y ácidos lignosulfónicos, y muestra que las mayores concentraciones pertenecen a los dos primeros compuestos (0,772 y 0,937 1 x 1 cm respectivamente). En cuanto a los compuestos inorgánicos, como sulfatos, cloratos y fosfatos, compuestos que derivan principalmente de las reacciones con los químicos utilizados en la fase de cocción y en la primera etapa de blanqueo donde se utiliza dióxido de cloro, están en concentraciones bajas que no representan toxicidad aguda para *D. Magna*, y por debajo de los valores encontrados por diversos autores que indican concentraciones para cloratos y sulfatos entre 71,3 y 213 mg/l y para fosfatos entre 0,4 y 2,18 mg/l (Rintala & Lepistö, 1992a; Stauber *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2001).

En particular, Rosemarin *et al.* (1994) y Wijk and Hutchinson (1995), señalan valores de concentración de cloratos en efluentes de celulosa kraft de 53 mg/l, a demás muestran valores de LC<sub>50</sub> para *D. magna* y *Oncorhynchus mikyss* de 880 mg/l y 3294 mg/l respectivamente, demostrando que la concentración de ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> encontradas en nuestro efluente no representaría a la fracción que causa la toxicidad de la muestra.

El ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, muestra un valor de LC<sub>50</sub> 24h de 27,51% (rango 20,35 – 31,6%), valor que nos indica que el efluente proveniente de la etapa E1 (extracción alcalina) de blanqueo es altamente tóxico. En ensayos de luminiscencia se ha demostrado que la toxicidad de un efluente de celulosa kraft tiene un valor de 44% medido como %I (Porcentaje de inhibición de la luminiscencia). Debido a la gran cantidad de compuestos que contiene este efluente, no es fácil indicar que compuesto es el que causa esta toxicidad (Rigol *et al.*, 2004). Aunque los compuestos orgánicos producen toxicidad, se ha demostrado en literatura que es a nivel crónico, especialmente en peces expuestos a este tipo de efluentes (Xavier, 2006; Chamorro, 2005). Sin embargo se ha determinado que el ácido abiético tiene un efecto agudo sobre *D. magna* con un LC<sub>50</sub> de 7,98 mg/l (Kamaya

*et al.*, 2005), no obstante Belmonte *et al.*, (2006) reportaron concentraciones muy inferiores a ese valor (1,4 mg/l) en efluentes de celulosa kraft con proceso ECF. En general se han determinado valores de LC<sub>50</sub> para compuestos por separado como ácidos resínicos y ácidos grasos utilizando *D. magna* y peces cuyos valores tienen un rango de 0,4 a 1,7 mg/l y de 2,0 a 8,0 mg/l respectivamente (Rigol *et al.*, 2004).

## 5.2. Efectos de los tratamientos sobre los parámetros físico-químicos.

Una vez caracterizado el efluente, la muestra fue sometida a diferentes fraccionamientos para observar sus efectos sobre las características físico-químicas medidas inicialmente. En la Figura 3 se observa, que sólo los test de Adaptación tuvieron una disminución considerable con respecto a la muestra inicial, lo que indica que los compuestos que constituyen la DQO son afectados drásticamente por la variación de pH, indicando que son altamente volátiles e inestables y que este cambio de pH pudo afectar su polaridad, solubilidad y estado iónico, disminuyendo la toxicidad de la muestra (Cooman *et al.*, 2000; Gajardo, 2001). Otro test que permite observar el efecto del pH es el tratamiento de Adaptación, que disminuye la DQO, aunque en menor cantidad, indicando que los compuestos poseen las características antes mencionadas y además que son altamente oxidantes y/o tensoactivos, ya que esta muestra es sometida a una continua aireación a intervalos de tiempo controlado.

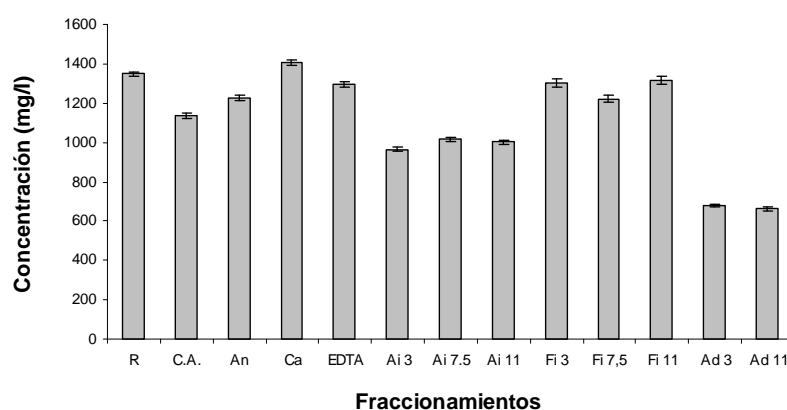


Figura 3. Comparación de la variación de la DQO entre los distintos fraccionamientos y el test de Referencia. C.A.= Test Carbón activado; An= Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai= Test Aireación; Ad= Test Adaptación y Fi = Test Filtración.

Los demás fraccionamientos no lograron reducir la DQO, a pesar de que el test con carbón activado permite retener una gama muy amplia de compuestos químicos (orgánicos e inorgánicos) solo disminuye en un 15%, sin embargo, la fracción que no se retuvo no presenta toxicidad como se verá mas adelante cuando se analice la incidencia de los fraccionamientos sobre la toxicidad de la muestra.

En el caso de la DBO<sub>5</sub>, se observa que el tratamiento de intercambio aniónico fue el que redujo en mayor cantidad la materia orgánica desde 397,5 mg/l a 120 mg/l (Figura 4), indicando que los compuestos orgánicos degradables presentan una alta tasa de intercambio aniónico (compuestos clorados) cambiando su biodisponibilidad debido al cambio de sus aniones (i.e. Cl<sup>-</sup>) por grupos OH<sup>-</sup>. También se observa que el tratamiento de con carbón activado produce una disminución en la concentración de DBO<sub>5</sub>, ya que este soporte retiene los compuestos orgánicos de la muestra, que son los principales constituyentes de este parámetro. Otro tratamiento a destacar es el test de intercambio catiónico que al igual que los dos fraccionamientos anteriores disminuye la DBO<sub>5</sub> en un 51%, indicando la presencia de compuestos catiónicos, que intercambian sus grupos catiónicos por Na<sup>+</sup>, disminuyendo su toxicidad.

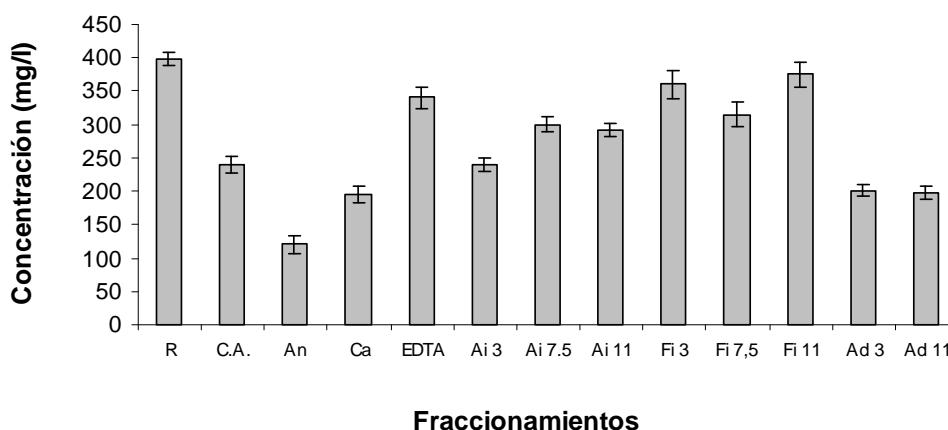


Figura 4.- Muestra el cambio en la Demanda Biológica de Oxígeno, una vez tratada la muestra con los diferentes fraccionamientos. En donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración

El test de adaptación demuestra que alguno de los compuestos que constituyen la DBO<sub>5</sub> son muy volátiles y poco estables, lo que es característico de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular, logrando disminuir su concentración en un 50%. El test con EDTA no muestra mayor disminución en la concentración de DBO<sub>5</sub>, esto debido a que es específico para acomplejar metales pesados.

Los compuestos fenólicos totales comprenden a la familia compuestos lignínicos presentes en el efluente de la industria de la celulosa, como se aprecia en la Figura 5 estos compuestos son sensibles a los cambios de pH, razón por la cual en el test con EDTA hay una disminución en la concentración de estos compuestos ya que este tratamiento se realiza a pH ácido (3,5), indicando que este tratamiento no es efectivo en la eliminación de este tipo de compuesto, sino más bien es el cambio de pH. Esto se demuestra al observar que en todos los tests en donde se varió el pH se logró una disminución de la concentración de los compuestos fenólicos totales. Esto indica que este tipo de compuestos son muy volátiles, polares y tensoactivos. También se caracterizan por no ser tóxicos en su forma disociada (e. g. pentaclorofenol) y además son compuestos que se adsorben en presencia de material hidrófobo.

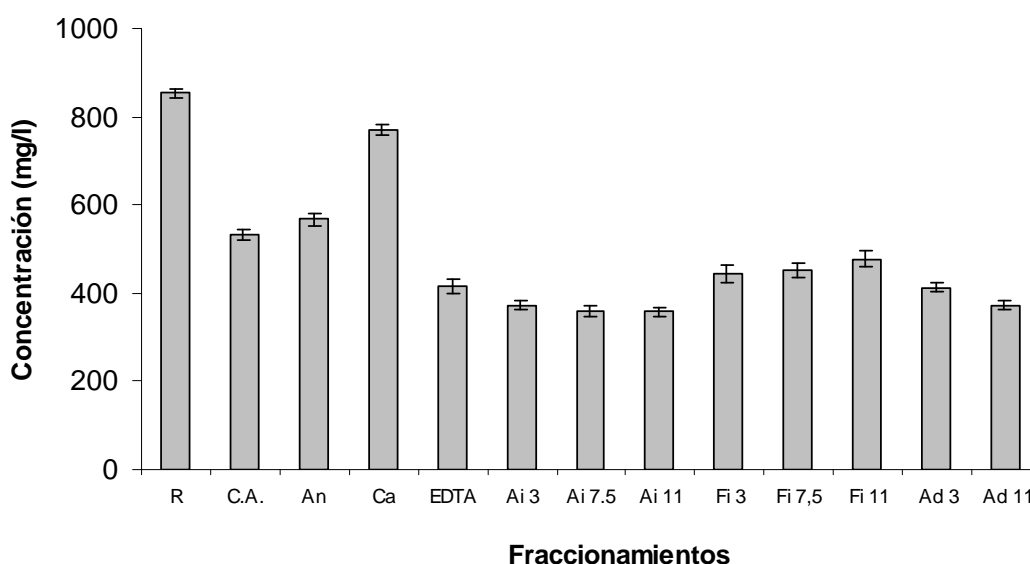


Figura 5. Concentración de Compuestos Fenólicos Totales, donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Cationico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración

El tratamiento con carbón activado provoca una disminución en la concentración de este tipo de compuestos, debido principalmente, a que es un soporte que retiene compuestos orgánicos, observando el test de aniones se indica una presencia de compuestos fenólicos que pueden intercambiar sus grupos aniónicos por  $\text{OH}^-$ , un grupo característico pueden ser compuestos fenólicos clorados.

El tratamiento menos efectivo fue el test de intercambio catiónico, debido a que es una resina cuyo principio es el de intercambio con iones de  $\text{Na}^+$ , no va a reaccionar con estos compuestos que se encuentran mayor mente en forma apolar.

Generalmente los compuestos fenólicos de bajo peso molecular son degradados por procesos biológicos anaeróbicos, rangos entre 80 – 90% de remoción de estos compuestos se logran por tratamientos con lodos activados (Schnell *et al.*, 2000). Lo que demuestra que estos tratamientos secundarios son más efectivos que al aplicar algún tipo de resina de intercambio o con carbón activado.

Por otra parte, la mayor remoción de cloratos se produce por el tratamiento de intercambio aniónico, debido principalmente a que la forma iónica de esta resina es en base a grupos  $\text{OH}^-$  lo que permite reemplazar todos los aniones presentes en la muestra por este grupo funcional, reteniendo los aniones de  $\text{Cl}^-$ .

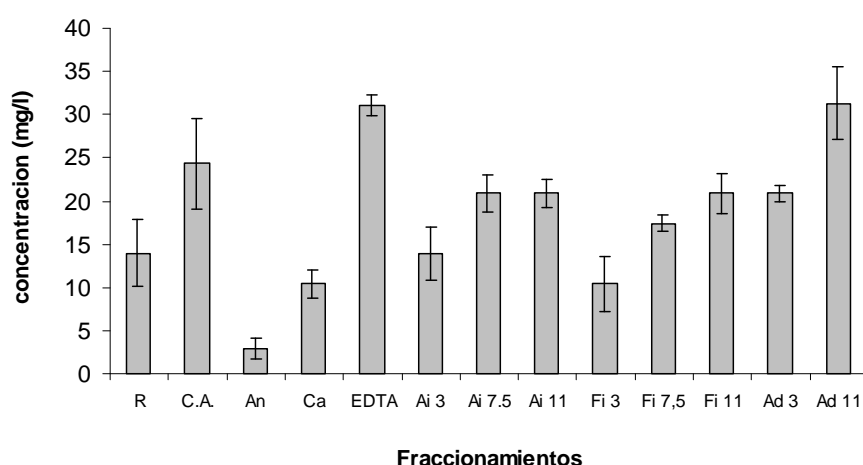


Figura 6. Determinación de cloratos en el efluente de celulosa kraft, donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración.



El clorato es formado durante la etapa de blanqueo por uso de  $\text{ClO}_2$ , y es un compuesto altamente tóxico para las plantas acuáticas y algas pardas en concentraciones superiores a 0,2 y 0,5 mg/l respectivamente (van Wijk *et al.*, 1998), por lo que los valores encontrados en nuestro efluente pueden producir efectos tóxicos, si embargo estos compuestos son altamente solubles en agua (95,7 g / 100 ml a 20°C), encontrando concentraciones en agua superficial entre 0,02 – 0,04 mg/l (van Wijk and Hutchinson, 1995).

Ikehata and Buchanan (2000), demostraron la efectividad de una resina de intercambio aniónico en la reducción de cloratos provenientes de un efluente de celulosa kraft con proceso ECF. Esta resina con cuya forma iónica es hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), logró reducir la concentración de cloratos en casi un 100%. Además los cloratos pueden ser removidos por tratamientos químicos con dióxido de azufre y biológicos en condiciones anaeróbicas (Malmqvist and Gunnarsson, 1993; van Wijk and Hutchinson, 1995).

A pesar de que la mayoría de los tratamientos aumento la concertación de cloratos en la muestra, no sobrepasan las concentraciones que pueden producir efectos tóxicos, sin embargo van Wijk *et al* (1998) y van Wijk and Hutchinson (1995), sugieren que metabolitos del clorato como cloritos ( $\text{ClO}_2^-$ ) y cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) son los causantes de la toxicidad en microorganismos, en pequeños invertebrados y peces, que derivan de degradación enzimático (Nitrato reductasa) o de la oxidación del  $\text{ClO}_3^-$ .

Este aumento de concentración de cloratos se debe a que el carbón activado presenta impurezas ( $\text{Cl}^-$  0,01%) que puede estar aportando iones de cloro a la muestra, mientras que con el test de EDTA, el aumento de cloratos se debe a la reacción de este compuesto con el  $\text{ClO}_2$  que forma metabolitos de cloritos y cloratos (Sullivan and Douek, 1998).

Como se muestra en la Figura 7, los sulfatos se caracterizan también por estar presentes en el efluente en concentraciones bajas que no representan toxicidad aguda para *Daphnia magna*, y no supera los 23 mg/l. Estos compuestos aumentan su concentración en el test de carbón activado debido a que este soporte, de la misma manera que para los cloratos, presente un porcentaje de impurezas ( $\text{SO}_4^{2-}$  0,01%) alcanzando valores por sobre los 75

mg/l, pero que no aporta toxicidad a la muestra debido a que el test de carbón activado logró reducir la toxicidad del efluente.

El test de filtración a pH 3 muestra un aumento en la cantidad de sulfatos (67,68 mg/l) pero que no se considera tóxicos puesto que es el tratamiento que presenta menor toxicidad en comparación los dos restantes a pH 7,5 y 11 que reducen la concentración de sulfatos pero su toxicidad no disminuye. Estos cambios en la cantidad de sulfato nos indican que no esta ejerciendo una potencial acción sobre la toxicidad de la muestra ya que aún estando en concentraciones más altas que en el test de referencia, como en el carbón activado, la toxicidad de la muestra disminuye considerablemente.

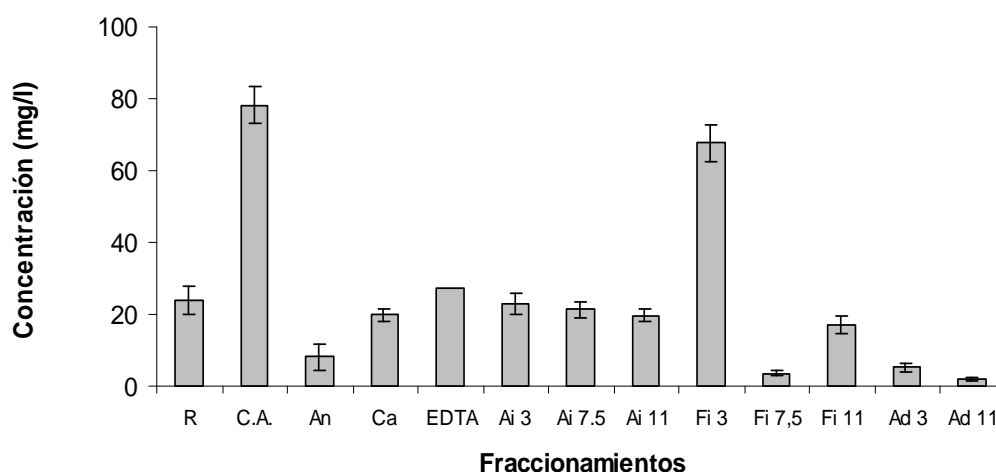


Figura 7. Determinación de sulfatos en el efluente de celulosa kraft, donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración.

Los tratamientos mas efectivos en la reducción de sulfatos son el test de filtración a pH 7,5, los test de adaptación (pH 3 y 11) y el test de intercambio aniónico, en este último fraccionamiento los iones sulfatos quedan retenidos y son reemplazados por los grupos OH<sup>-</sup> sin embargo, aun queda una fracción remanente lo que sugiere una saturación de la resina. Por otro lado la disminución de la concentración de sulfatos a pH básico indica que este tipo de compuesto es fácilmente oxidable y volátil.

El color en el efluente de celulosa kraft se debe principalmente a la presencia de compuestos orgánicos como la lignina u otros compuestos de peso molecular alto, que aunque no presentan toxicidad son resistentes a procesos de degradación. Este parámetro fue medido a través de su absorbancia a una longitud de onda de 400 nm, y como se aprecia en la siguiente Figura 8, el carbón activado reduce el color producto de la adsorción de estos compuestos. Los tratamientos de aireación, EDTA, filtración y adaptación no son eficientes en la disminución del color, no obstante cuando la muestra es sometida al test de filtración a pH 3 resultó en una reducción del color, indicando que estos compuestos orgánicos son oxidables a pH ácido. En cambio los tratamientos con resinas de intercambio aniónico y catiónico, provocaron un aumento en el color estos resultados no coinciden con los expresados por Ikehata and Buchanan (2000) quienes lograron reducir el color de un efluente de celulosa kraft usando resinas de intercambio aniónico, estas diferencias se deben principalmente a que las resinas usadas tienen una matriz de polímeros de acrílicos macroporosa que permite una mejor adsorción de compuestos orgánicos a diferencia de la amberlita usada en laboratorio que corresponde a un copolímero de dibinilbenzeno. Pero en general aquellos test en donde el pH no varió del valor inicial ( $> 10,53$ ) provocaron un aumento en el color debido a una mayor resonancia de los dobles enlaces conjugados de los compuestos orgánicos.

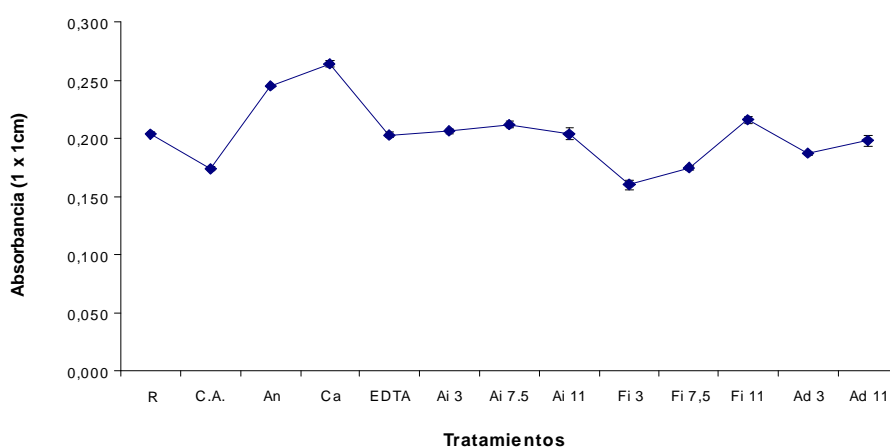


Figura 8. Medición del Color para cada tratamiento en donde: Determinación de cloratos en el efluente de celulosa kraft, donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración.

La medida de ácido lignosulfónico se obtiene a una longitud de onda de 346 nm, este compuesto es un residuo de la lignina fraccionada y como se observa en la Figura 9 no varía al aplicar cada uno de los tratamientos, solo con el test de intercambio catiónico hubo un pequeño aumento. La lignina se mide a una longitud de onda de 280 nm, debido a que estos compuestos no son biodegradables afecta de gran medida a la industria de la celulosa, después de someter la muestra a los distintos tratamientos vemos que el fraccionamiento de intercambio catiónico aumenta la cantidad de este compuesto, en cambio todos los demás test lograron disminuir su concentración.

De la misma manera sucede para la lignina medida a 272 nm, en donde el comportamiento a través de cada uno de los tratamientos es similar, aunque con un valor mas alto. Para obtener un comportamiento de los compuestos aromáticos presentes y de los derivados de la lignina en la muestra se midió la absorbancia de la muestra a 254 nm la tendencia es la misma todos los tratamientos a excepción del test de intercambio catiónico reducen la cantidad de estos compuestos, con respecto al test de referencia.

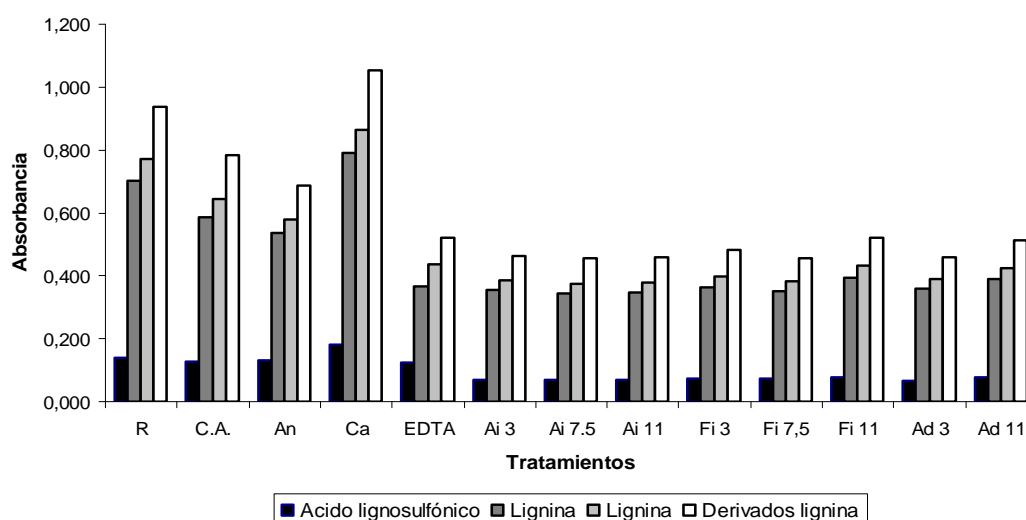


Figura 9.- Determinación de la absorbancia a 346, 280, 272 y 354 nm en los distintos tratamientos, donde: C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test de Aireación; Ad = Test de Adaptación y Fi = Test de Filtración.

### 5.3. Pruebas toxicológicas

Para determinar el efecto sobre la toxicidad de la muestra se sometió a análisis por medio de bioensayos agudos estandarizados, para obtener el LC<sub>50</sub> 24h y sus respectivas Unidades de Toxicidad (Tabla 8), para cada uno de los tratamientos de tal manera de determinar el o los test que lograrán disminuir la toxicidad de la muestra.

Con estos valores estandarizados se procedió a construir el perfil de reducción de la toxicidad (Figura 10), para poder apreciar de mejor forma la acción de los distintos tratamientos a que fue sometida la muestra y poder identificar el o los compuestos que causan la toxicidad del efluente.

Como se puede apreciar en la el test de adaptación nos indica la presencia de compuestos químicos que se ven afectados con variaciones de pH en la muestra, esto se ve reflejado en la gran variación de la toxicidad, en el caso de los test de aireación y filtración este porcentaje de reducción no es significativo ya que su valor no sobrepasa el 10%.

Tabla 8. Valores de toxicidad (LC<sub>50</sub> 24h) de los distintos fraccionamientos incluido el test de referencia y los valores de UT.

<b>Fraccionamiento</b>	<b>LC<sub>50</sub> 24 h</b>	<b>UT</b>
Referencia	27,56 %	3,63
Carbón Activado	100,00 %	1,00
EDTA	95,01%	1,05
Anión	68,20 %	1,47
Catión	51,76 %	1,93
Aireación (pH 3)	28,88 %	3,46
Aireación (pH 7,5)	29,20 %	3,42
Aireación (pH 11)	32,40 %	3,09
Adaptación (pH 3)	55,48 %	1,80
Adaptación (pH 11)	50,00 %	2,00
Filtración (pH 3)	33,00 %	3,03
Filtración (pH 7,5)	30,20 %	3,31
Filtración (pH 11)	29,50 %	3,39

El test de carbón activado logra el mayor porcentaje de reducción de la toxicidad, asumiendo que la toxicidad se puede deber a compuestos orgánicos, sin embargo este

soporte absorbe una amplia gama de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos por lo que es preciso tomar en cuenta fraccionamientos que son mas específicos como el test de intercambio aniónico y catiónico, en los que se observa una disminución a 1,47 1,93 UT, esto nos indica que la toxicidad se debe a la presencia de compuestos inorgánicos, aniónicos o catiónicos. El tratamiento con EDTA, que logra acomplejar los metales presentes en la muestra, muestra una reducción de la toxicidad casi a su valor mínimo (1,09 UT) indicando que la toxicidad de la muestra se debe a compuestos catiónicos inorgánicos, como metales pesados.

Reyes *et al.* (2006) señalan que para tratar efluentes líquidos que contienen metales, se utilizan diferentes métodos físico-químicos como adsorción, intercambio iónico, osmosis inversa y precipitación.

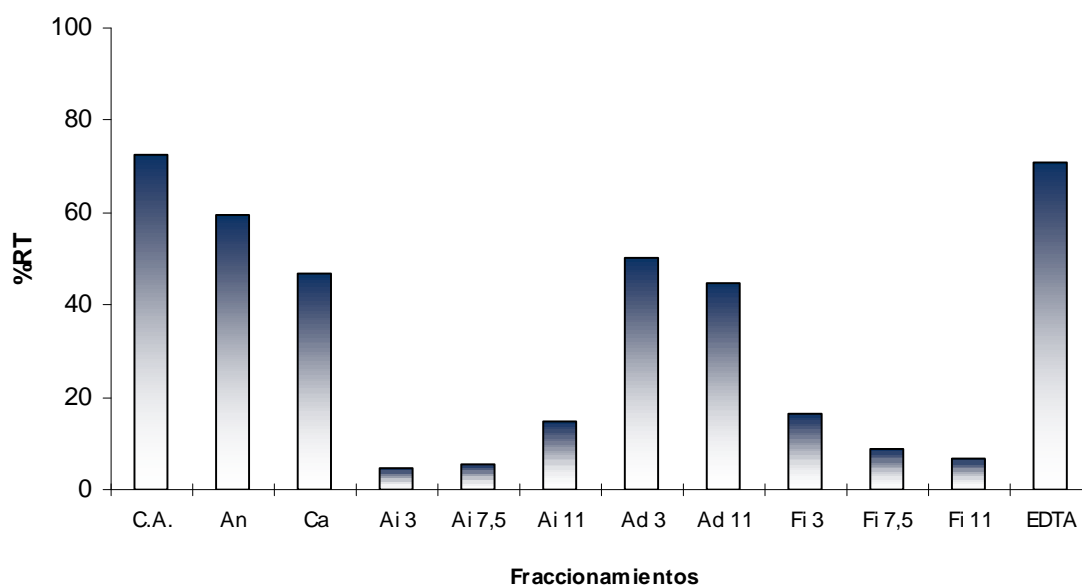


Figura 10. Perfil de Reducción de la Toxicidad (%RT), donde C.A.= Test Carbón activado; An = Test Intercambio Aniónico; Ca = Test de Intercambio Catiónico; Ai = Test Aireación; Ad = Test Adaptación y Fi = Test Filtración

El carbón activado debido a su alta porosidad y gran superficie específica es muy eficiente en la adsorción de metales pesados. El EDTA por su parte forma fuertes complejos con metales divalentes y trivalentes como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  este tipo de agentes acomplejantes

esta siendo muy utilizado en la industria de la celulosa para impedir que interrumpan el proceso de pulpaje, a demás se ha demostrado que en bioensayos de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, este compuesto disminuye la toxicidad de Mn, CU, Zn y Cd (Ecklund *et al.*, 2002).

Evaluando los resultados obtenidos se determina analizar aquellos fraccionamientos en donde se apreciaron mejor las variaciones de compuestos medidos tomando en cuenta también los perfiles de reducción de la toxicidad. Estos tratamientos corresponden al Test de Carbón Activado, Test de Intercambio Aniónico, Test de Intercambio Catiónico y el Test de EDTA, sin embargo y aunque se debe poner énfasis en aquellos fraccionamientos en donde la toxicidad se disminuye en 100% se consideran estos cuatro test por poseer los valores más altos de %RC.

El efluente indica una toxicidad aguda para *Daphnia magna* con valor de LC<sub>50</sub> 24 h de 27,56% y un valor de UT de 3,63, lo que significa que si la muestra se diluye 3,63 veces aun seguiría afectando al 50 % de los organismos. Al reducirse la toxicidad de la muestra en casi un 50 % en los test de adaptación a pH básico y ácido nos indica que el contaminante se evaporó o se oxidó y que el pH juega un papel importante en la reducción del compuesto, es así como el fraccionamiento con carbón activado logró reducir la toxicidad en casi un 80% cuyo procedimiento se realizó en medio básico, lo que indica que la toxicidad de la muestra se debe a compuestos orgánicos y/o complejos metálicos presentes en la muestra. Esto se puede comprobar observando que los test de intercambio Aniónico y Catiónico también reducen la toxicidad y aunque no en un porcentaje tan grande, indican que esta se debe a compuestos inorgánicos que pueden ser cationes o aniones. Pero como el tratamiento con EDTA, es específico para formar quelantes con complejos metálicos, y también logra reducir la toxicidad en un 70%, se puede decir que la toxicidad de la muestra se debe principalmente a compuestos catiónicos inorgánicos en este caso podría ser Cobre y Fierro (Cu<sup>+2</sup> y Fe<sup>+2</sup>).

En la Tabla 9 se muestran los valores de concentración de cobre y fierro presentes en el efluente de la etapa de extracción alcalina, a demás se adjuntan los valores obtenidos

posterior al test con EDTA y el porcentaje de reducción de la concentración de estos compuestos.

Tabla 9. Concentración metales efluente celulosa antes y después del tratamiento.

Metal	Concentración inicial (mg/l)	Concentración final (mg/l)	Porcentaje Reducción (%)
Cu	0,5	0,019	96,2%
Fe total	0,64	0,122	81,0%

El EDTA logra reducir en mas de un 95% la concentración de cobre de la muestra, según De Schampelaere *et al.* (2002) la toxicidad ( $LC_{50}$  48 h) del cobre se encuentra entro el rango de 0,115 a 1,455 mg/l, otros autores como Bossuyt and Janssen (2005) señalan valores de toxicidad aguda entre 0,026 a 0,053 mg/l lo que indica que la concentración inicial de cobre representa toxicidad aguda para *Daphnia magna* y cuando el efluente se trató con EDTA su concentración disminuyó por debajo de valores críticos para este compuesto.

#### 5.4. Comparación de resultados de los fraccionamientos seleccionados

Una vez que se determinaron los fraccionamientos que reducen mas significativamente la toxicidad del efluente, se comparan los resultados de las características fisico-químicas para evaluar posibles diferencias obtenidos en los valores preliminares con los obtenidos nuevamente. En la Figura 11a se muestra los valores comparativos de DQO para cada uno de los fraccionamientos, a pesar de que los valores obtenidos posterior a la selección de los tratamientos son menores, la tendencia es la misma, aunque el test de intercambio aniónico logra reducir la concentración de compuestos oxidantes mas que los otros tratamientos.

Para el caso de la  $DBO_5$  (Figura 11b) el test de intercambio aniónico, nuevamente es el que disminuye el valor de la demanda de oxigeno, cuya cantidad coincide con la concentración de la primera medida, pero en general todos los tratamientos logran reducir la  $DBO_5$ , y se podría decir que mantienen la misma tendencia. Esto también se ve reflejado para los



compuestos fenólicos totales, sulfatos, cloratos y el color (Figura 11c, 11d, 11e y 11f), siendo para este último parámetro el carbón activado el soporte más eficiente y para todos los demás el test de intercambio aniónico es el fraccionamiento que reduce de mejor manera las concentraciones. Además cabe señalar que el test de EDTA arrojó valores de concentración de sulfatos de más o menos 300 mg/l lo que es demasiado, comparando con el test de referencia, incluso con el de carbón activado que aporta con las impurezas que posee.

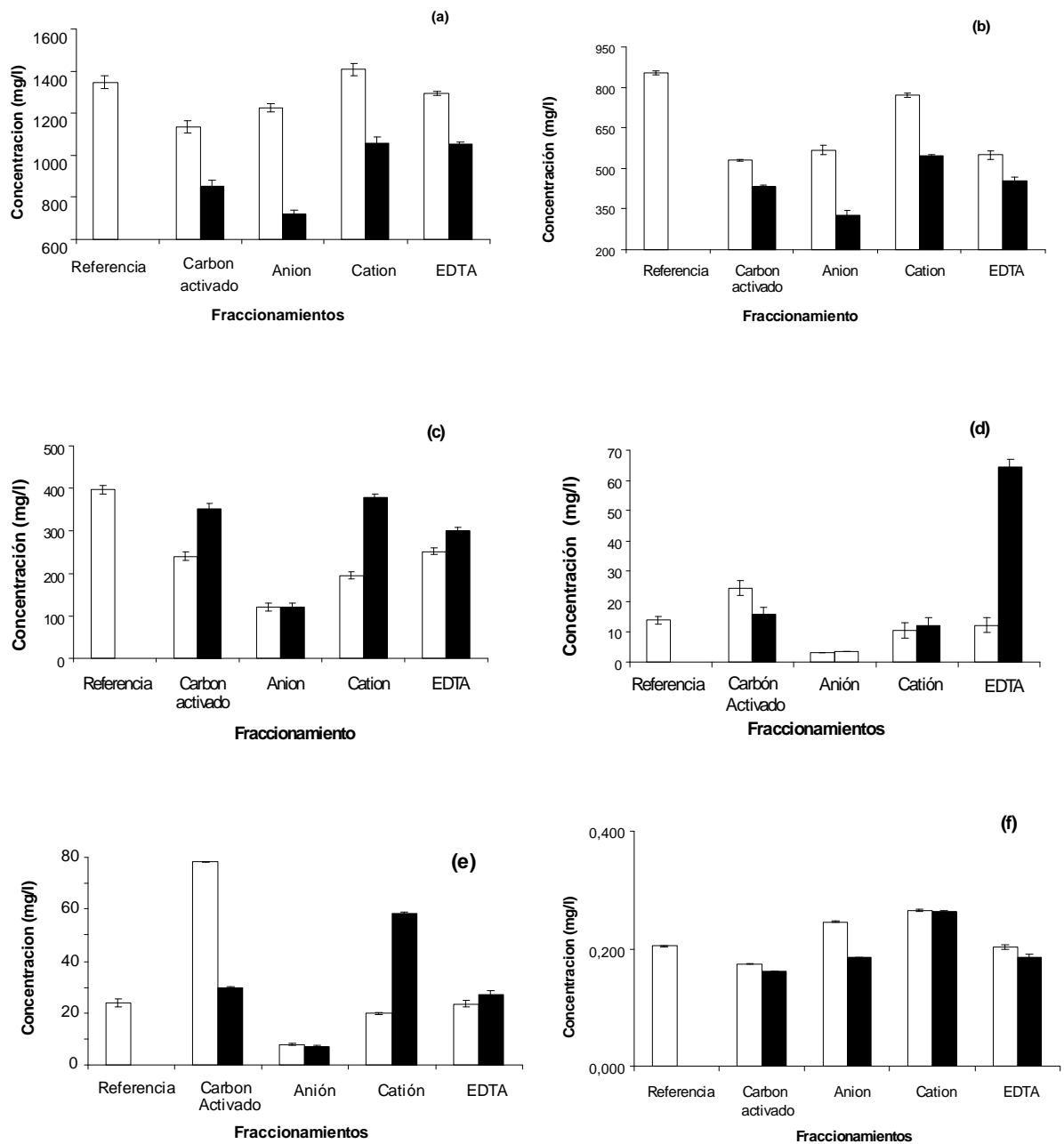


Figura 11. Comparación de las concentraciones de los diferentes parámetros físico-químicos, evaluados después de la selección de los fraccionamientos: donde a) DQO; b) Compuestos fenólicos totales; c) DBO<sub>5</sub>; d) Cloratos; e) Sulfatos; y f) Color. (□) concentración antes de la selección; (■) concentración posterior a la selección

## 5.5. Análisis de espectroscopia de Massa

Las muestras seleccionadas, y que corresponden a los fraccionamientos que lograron reducir mas la toxicidad del efluente, muestran un espectrograma en el cual existen tres pick que se repiten para cada una de las muestras. En la resina de intercambio catiónico se muestra una retención de la mayoría de los compuestos orgánicos dejando solo los siguientes pick: 15,833, 19,250, y 26,833 minutos (tiempo de retención), mientras que en la resina de intercambio aniónico se comporta de manera similar apareciendo nuevamente estos tres pick, mas unos compuestos que son ácidos carboxílicos de cadena larga con un tiempo de retención mayor a 30 minutos, que como ya hemos visto no presentan toxicidad aguda. La columna de carbón activado no presenta diferencias con respecto al cromatograma del efluente inicial indicando su poca efectividad en la remoción de compuestos con respecto a las resinas, a pesar de ser un soporte específico para compuestos orgánicos, lo que reafirma que la toxicidad se debe a cationes inorgánicos.

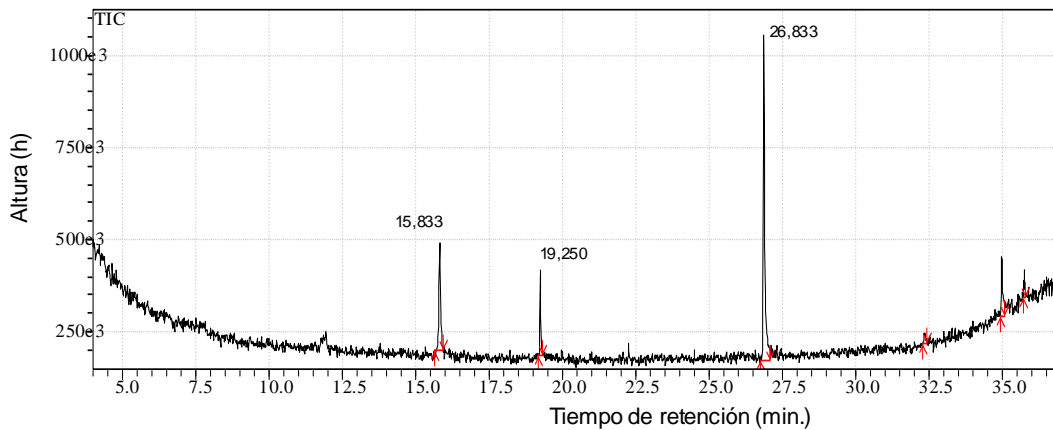


Figura 12. Cromatograma de la muestra tratada con resina de intercambio aniónico

La disminución de compuestos orgánicos por tratamiento con resinas de intercambio aniónico indica que el efluente posee gran cantidad de compuestos clorados ya sean cloroligninas o clorofenoles, byphenilos, etc. El cromatograma demuestra la gran eficiencia de remoción de la resina, sin embargo, existen tres compuestos que no son retenidos por

este tratamiento, si bien la toxicidad disminuyó aún queda una fracción que esta provocando efectos tóxicos, que correspondería a estos tres pick que se muestran en la Figura 12.

Analizando el cromatograma (Figura 13) del tratamiento con la resina de intercambio catiónico, nuevamente se muestra esta tendencia, esta resina es capaz de remover la mayoría de los compuestos orgánicos del efluente, pero también muestra que siguen existiendo estos tres pick, que representan a compuestos orgánicos cuya eficiencia de la resina no es capaz de remover, sugiriendo que estos compuestos son los causantes de la toxicidad del efluente.

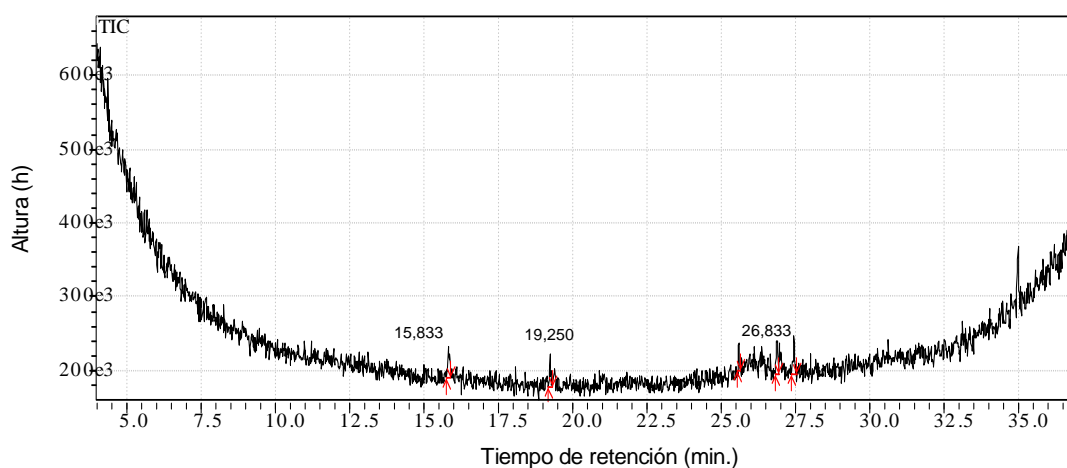


Figura 13. Cromatograma de la muestra tratada con resina de intercambio catiónico.

Sin embargo como el tratamiento con carbón activado redujo la toxicidad completamente del efluente y su cromatograma presenta estos mismos pick y no muestra diferencias con respecto al efluente inicial, podemos decir claramente que la toxicidad del efluente de la etapa de extracción alcalina (E1), se debe a compuestos inorgánicos. En la figura 14 se muestra el cromatograma de la muestra tratada con carbón activado.

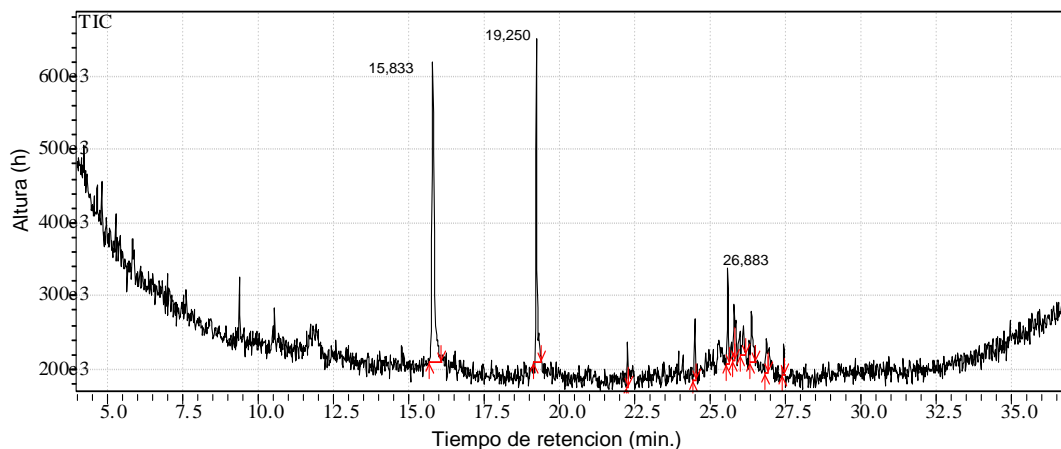


Figura 14. Cromatograma de muestra tratada con carbón activado.

Para tener una visión mas clara acerca de los efectos de los distintos tratamientos sobre el efluente en la Figura 15 se superponen cada cromatograma incluido el efluente inicial en donde claramente se aprecia la aparición de estos 3 pick en todos los tratamientos, lo que arroja una fuerte evidencia de que la toxicidad del efluente se debe a compuestos catiónicos inorgánicos

Los compuestos identificados se detallan en la Tabla 10, se caracterizan por ser estructuras de alto peso molecular por lo que no causan un efecto toxico agudo sobre *Daphnia magna*, pero si podrían actuar a nivel crónico.

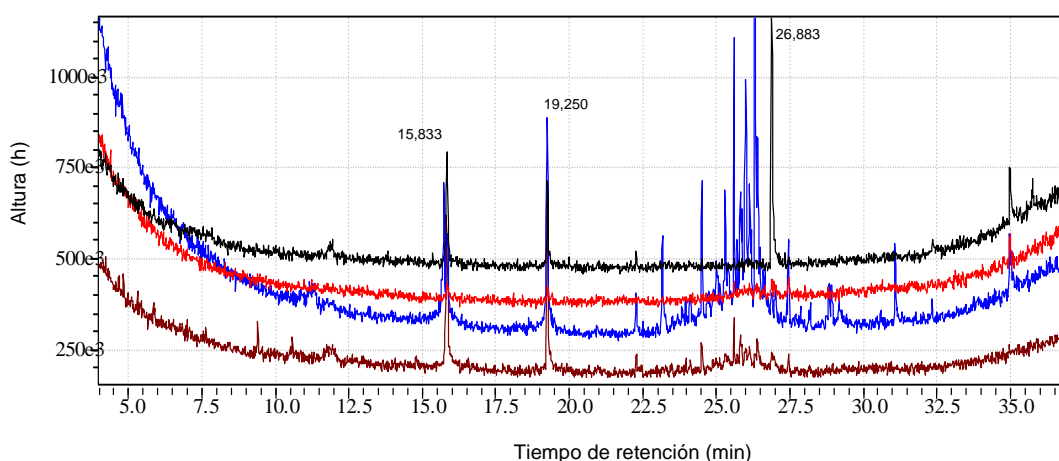
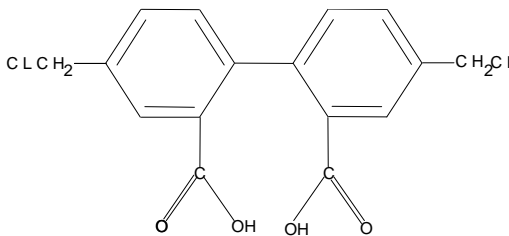
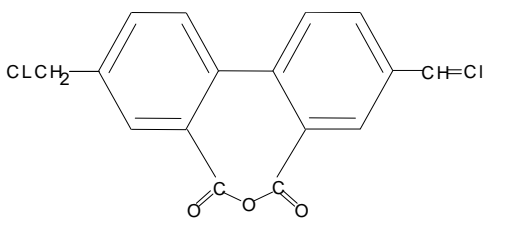


Figura 15. Cromatograma de espectroscopia de masa en donde: --- muestra del efluente inicial; --- Tratamiento carbón activado; --- Resina de intercambio catiónico; --- Resina de cambio aniónico.

Tabla 10. Compuestos orgánicos identificados por espectroscopia de gases acoplado a masa (GC/MS)

Tiempo de retención	Nombre	Molécula o fórmula
15,833	Bifenilo -2,7-diclorometilen 4,5-di carboxílico	
19,250	Anhídridobifenilo-2-cloroetil-4,5-ftálico	
26,883	Acido Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$

## 6. DISCUSION

### 6.1. Parámetros físico-químicos

Los efluentes de la industria de la celulosa kraft se caracterizan por contener una gran cantidad de contaminantes orgánicos como inorgánicos, que derivan principalmente de la reacción de los compuestos químicos utilizados con ligninas remanentes y la potencial acción corrosiva y oxidante, causando efectos tóxicos agudos y crónicos sobre organismos que se encuentran en los cuerpos de aguas receptores.

El color en las pulpas de madera se atribuye a la lignina residual y derivados, así como a la presencia de otros materiales coloridos tales como quinonas y flavonoides en pulpas al sulfito y taninos condensados en pulpas kraft. En pulpas de alto rendimiento, el color depende principalmente de los tipos de madera, debido a que este tipo de pulpas poseen, de manera considerable, extraíbles remanentes que reaccionan con los químicos de blanqueo incrementándose de esta forma el consumo de reactivos y disminuyendo la eficiencia del blanqueo (Aguilar, 2004).

Para conservar las propiedades de blancura de la pulpa y evitar los efectos reversibles (amarilleo) se recomienda, durante la etapa de blanqueo una etapa de extracción alcalina, que en el caso del proceso ECF, se realiza con soda cáustica (NaOH) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), esto debido que en pulpas de angiosperma la blancura oxidativa es reversible dando como resultado una resina mas dura, quebradiza y menos soluble, esto provoca un aumento en la concentración de ligninas semioxidadas, taninos polimerizados y compuestos fenólicos clorados, constituyentes principales del color del efluente de celulosa kraft (Aguilar, 2004; Vidal, 1999; Ali and Sreerishnan, 2001).

Esta etapa de extracción alcalina (E1) es la que aporte con la mayor cantidad de compuestos orgánicos contaminantes principalmente con el color del efluente, esto coincide con los resultados expuestos por Çeçen, (1993) que señala valores para el color del efluente

0,110 – 0,142 a 420 nm mientras que los resultados de laboratorio para el color de la muestra es de 0,204 a la misma longitud de onda.

El color no solo causa un serio problema estético, ya que los grupos cromóforos actúan como competidor con el fitoplancton por la absorción de los fotones de luz en el rango del azul al verde, provocando marcados cambios en la productividad primaria por la reducción en la penetración de la luz solar (Ali and Sreekrishnan, 2001; Vähätalo *et al.*, 2002).

Todos los compuestos que componen el color representan la fracción no biodegradable de la DQO, ya que son compuestos de alto peso molecular que no causan toxicidad aguda, esta escasa degradación se puede lograr por medio de tratamientos físico-químicos, como adsorción e intercambio iónico, fotoblanqueo, etc. (Vähätalo *et al.*, 2002; Ikehata and Buchanan, 2000), sin embargo, el color cuando se trata con resinas de intercambio catiónico su valor aumento de 0,204 a 0,264 (420 nm), indicando que este tratamiento es poco efectivo, mientras que la resina de intercambio aniónico redujo el color a 0,184, no obstante Ikehata and Buchanan (2000) señalan que las resinas de intercambio aniónico en forma de  $\text{OH}^-$ , logra reducir la totalidad del color del efluente, esto debido a que la adsorción de los contaminante depende del material y propiedades físicas de la resina. Esto coincide que lo expresado por Zhang and Chuang (2001) quienes señalan que las resinas de intercambio aniónico son mas efectivas que el carbón activado en la remoción del color del efluente, debido a que las largas moléculas de los contaminantes pueden no ser absorbidas sobre la superficie interna del carbón activado debido a su estrecha estructura porosa. Aunque las resinas tienen una superficie mucho mas pequeña, la superficie del área del poro muestra una mas efectiva adsorción de moléculas largas y del color que el carbón activado.

El efluente de la etapa de extracción alcalina mostró relativamente baja  $\text{DBO}_5$  y una alta DQO, lo que indica un alto porcentaje de materia orgánica no biodegradable presente en esta agua residual (Bijam and Mohseni, 2005), el tratamiento más efectivo en la disminución de la  $\text{DBO}_5$  fue el tratamiento de intercambio aniónico, indicando que gran parte de la materia orgánica biodegradable corresponde a compuestos organoclorados u



otros con características similares que son remplazados por iones hidroxilos. Para el caso de la DQO se observó el mismo efecto en donde la resina logró reducir su concentración en un 46% (1348,75 a 719,8 mg/l), lo que sugiere una alta concentración de compuestos que representan a la fracción recalcitrante de la DQO, es decir, compuestos orgánicos de alto peso molecular que resisten la oxidación química.

Los compuestos inorgánicos presentes como cloratos, sulfatos, se encuentran en concentraciones de entre 11,0 – 15 mg/l, que no presentan toxicidad aguda para *Daphnia magna*, a demas estas concentraciones son muy inferiores las encontradas por Rintala & Lepistö (1992), Stauber *et al.*, (1996), Thompson *et al.* (2001), Rosemarin *et al.* (1994) y Wijk and Hutchinson (1995), que indican valores de entre 71,3 y 213 mg/l.

En las Figuras 6 y 7 se observan que existe un tratamientos efectivo en la disminución de la concentración como es el caso del test de intercambio aniónico que como se ha dicho, reemplaza los iones de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_4^{-2}$  por  $\text{OH}^-$ , esto se debe a que las resinas poseen una alta capacidad para los iones que se encuentran en pequeñas concentraciones, siendo este un proceso no de superficie ya que mas del 99% del intercambio se produce dentro de la esfera de la resina, estas resinas aniónicas brindan mejores resultados en aguas que contienen predominantemente ácidos de minerales libres, como cloruros y sulfatos (Avilla, 2004). Por este motivo el tratamiento redujo en mas de un 60% las concentraciones de ambos parámetros, lo que coincide con Aguilar (2004), quien señala una reducción del 100% de los cloratos al tratarlas con una resina de intercambio aniónico en base a grupos  $\text{OH}^-$ .

La medición de metales pesados entregó valores muy altos de concentración de cobre y hierro (0,5 y 0,64 mg/l), que en el caso del primero esta por sobre el valor critico de  $\text{LC}_{50}$  24 h entregado por Milam *et al.* (2005) cuyo valor es de 0,12 mg/l para *D. Magna*. Para el caso del hierro este valor no representa riesgo toxicológico ya que Milam and Farris (1998) y Soucek *et al.* (2000), hacen referencia a la toxicidad del hierro en concentraciones mayores a 2,37 mg/l.

La adsorción ha demostrado ser un proceso eficiente para la eliminación de metales del agua cuando los mismos se hallan presentes en baja concentración. Entre los materiales adsorbentes, los carbones activados son especialmente útiles para el tratamiento de aguas y su empleo ha sido recomendado por organismos internacionales con este propósito. La capacidad de adsorción de los carbones activados se debe a su estructura porosa altamente desarrollada, que les confiere una gran área específica, y a la química de su superficie. Esta última juega un rol importante en la adsorción de los contaminantes (Toles *et al.*, 2000).

El tratamiento con EDTA redujo la concentración de estos metales en una 96% para el cobre y un 80% para el caso del hierro siendo la concentración final de la muestra tratada de 0,019 y 0,122 mg/l para el cobre y hierro respectivamente. Este compuesto es muy usado como acomplejante de muchos metales que interrumpen el proceso de pulpaje (Eklund *et al.*, 2002). A demás este compuestos es un elemento esencial en el crecimiento de las plantas ya que le ayuda a tomar los elementos trazas de su entorno como Fe, Cu, Zn y Mn.

## **6.2. Pruebas toxicológicas**

El ensayo de toxicidad aguda indica que el efluente de celulosa kraft proveniente de la etapa E1 presenta una alta toxicidad con un LC<sub>50</sub> de 27,56%, este resultado coincide con el encontrado por Chamorro (2005), quien caracteriza un efluente industrial de celulosa kraft con tecnología ECF con un LC<sub>50</sub> de 23,12%. Sin embargo Tarkpea *et al.*, (1999) en un estudio que compara la toxicidad de tres procesos de blanqueo, (convencional, ECF y TCF) no logró demostrar toxicidad aguda para el efluente proveniente del proceso ECF utilizando *Ceriodaphnia dubia* pero si toxicidad crónica.

En general los efluentes de celulosa kraft contienen un amplia gama de compuestos toxicaos orgánicos como inorgánicos y a pesar de que el efluente presenta toxicidad aguda es muy difícil poder decir que compuesto es el que causa la toxicidad. La mayoría de los constituyentes de estos efluentes provocan toxicidad crónica afectando la actividad fisiológica, bioquímica y ecológica.

Se ha demostrado que compuestos como los ácidos resínicos poseen toxicidad aguda para *D. Magna* en concentraciones de entre 1,1 a 15 mg/l siendo el ácido dehidroabietico el más tóxico, otros compuestos como los fenoles poseen toxicidad aguda en concentración letal de 11,64 mg/l (Kamaya *et al*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Estudios preliminares sobre la toxicidad aguda de efluentes de pulpaje han sido largamente discutidos, uno de los primeros efectos directos investigados implicó al tetracloro-*o*-benzoquinona u otros clorodihidroxibencenos presentes en el licor de la coloración del proceso kraft como causantes de la mortalidad de peces expuestos a su efluente. En la actualidad se ha determinado que los ácidos resínicos, ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos clorados han sido determinados como la mayor fuente de toxicidad aguda, así como también dioxinas, furanos y AOX (Hewitt and Marvin, 2005).

Los tratamientos que lograron reducir en mayor porcentaje la toxicidad del efluente (>45 %) son el test con carbón activado, el test de EDTA, el test de intercambio aniónico y el test de intercambio catiónico con un 72,44, 70,99, 59,59 y 46,75 % de reducción respectivamente.

El tratamiento con carbón activado permite retener muchos compuestos orgánicos no es un soporte específico porque además retiene algunos cationes y aniones inorgánicos por lo que la reducción de la toxicidad no se debe solo a compuestos orgánicos sino que también a la presencia de tóxicos inorgánicos (Zhang and Chuang, 2001).

Debido a que el efluente proviene de la etapa de extracción alcalina su alto valor de pH favorece la adsorción de metales presentes en la muestra, Seco *et al.* (1999) demostraron que al aumentar el pH en rango de 3 – 4 unidades la remoción de metales incrementa de 0 a 100%.

Las resinas de intercambio aniónico y catiónico, reducen la toxicidad debido a la retención de compuestos inorgánicos presentes en la muestra, este porcentaje de reducción indica que

existe una fracción de compuestos catiónicos y aniónicos que están biodisponibles y causan toxicidad aguda, si bien la concentración de cloratos, sulfatos y fosfatos es menor, hay que considerar la capacidad de sinergismo de estos compuestos en la toxicidad de la muestra.

Eklund *et al.* (2002) señala que el EDTA reduce la toxicidad de varios metales (Cu, Fe, Mn, Zn, etc.) en bioensayos utilizando *Daphnia magna* como indicador, coincidiendo con nuestros resultados ya que el fraccionamiento con este soporte redujo la toxicidad de la muestra en un 70%, indicando que la toxicidad de la muestra se debe a compuestos catiónicos inorgánicos.

Otros fraccionamientos que se lograron reducir la toxicidad son el test de adaptación (pH 3 y 11), estos test nos indican que los contaminantes son altamente afectados por las variaciones de pH, ya que varía su polaridad, son menos estables y se modifica su estado iónico provocando que estos compuestos no estén biodisponibles, (Gajardo, 2001).

### **6.3. Evaluación e Identificación de la Toxicidad (TIE)**

El procedimiento TIE fue realizado para identificar potenciales compuestos que causan toxicidad aguda en un efluente de la etapa de extracción alcalina (E1) de blanqueo ECF de un proceso kraft. En la fase 1 los resultados sugirieron que el tóxico sospechoso es un compuesto catiónico inorgánico de entre los cuales se caracterizaron cloratos, sulfatos, fosfatos, y metales (Cu y Fe), muchos autores han señalado que los compuestos orgánicos, como clorofenoles, dioxinas, furanos, son los causantes de la toxicidad de efluentes de celulosa, especialmente compuestos como los ácidos resínicos (ácido dehidroabiético) (Kamaya *et al.*, 2005).

Sin embargo los efluentes de celulosa están constituidos en su mayoría por compuestos orgánicos que se forman durante el proceso de pulpaje como terpenos, fenoles polares, ácidos grasos y esteroides, causando graves daños ecosistémicos (disminución de la fotosíntesis) afectando a los productores primarios (Lea *et al.*, 1996; Kostamo y Kukkonen, 2003; Karrasch *et al.*, 2006).

Solo los tratamientos con carbón activado, de intercambio iónico y catiónico, el test con EDTA logran reducir la toxicidad del efluente con valores que no mayores a 2,0 UT. Todos estos soportes tienen en común la retención de compuestos inorgánicos como cloratos, sulfatos, metales y otros compuestos catiónicos inorgánicos. A demás observando los espectrogramas de espectroscopia de masa, se observa que las resinas son también efectivas en la eliminación de la mayoría de los compuestos orgánicos, sólo existen tres compuestos que no fueron retenidos y que están presentes en todos los espectrogramas, estos corresponden a Bifenilo-2,7-diclorometilen-4,5-dicarboxílico (TR 15,833 minutos), Anhidrobifenilo-2-cloroetenil-4,5-ftálico (TR 19,25 minutos) y Acido Octadecanoico (TR 26,883 min.).

Como la toxicidad de las muestra tratadas con las resinas no disminuyó en su totalidad, todavía existe una fracción tóxica, esto sugiere que la toxicidad se debe a alguno de estos compuestos, sin embargo el test con carbón activado fue el tratamiento que logró disminuir la toxicidad de la muestra (> 75%) pero no logró retener todos los compuestos orgánicos, esto se observa comparando su espectrograma con el del efluente inicial, los que no muestran mayores diferencias.

El carbón activado es un soporte que se utiliza en la retención de metales pesados, Basso *et al* (2001) señalan que este material es muy efectivo en la disminución de Níquel en mas de un 90%, concluyendo que carbones activados preparados son adsorbentes altamente eficientes para la remoción de níquel de soluciones acuosas diluidas, sugiriendo la posibilidad de su utilización para el tratamiento económico de aguas residuales contaminadas con metales pesados. Por su parte Seco *et al* (1999) demuestran que el proceso de adsorción de cobre por parte del carbón activado es muy efectivo y dependiente de la concentración inicial, pH y la cantidad de carbón empleada.

Los cambios de toxicidad no se reflejan en los análisis químicos dado que el test de intercambio aniónico disminuye la concentración de compuestos inorgánicos como sulfatos y cloratos, a demás es el test que mas redujo la concentración de DQO y DBO, pero solamente disminuyó la toxicidad de 3,63 a 1,93 UT, mientras que el fraccionamiento de

carbón activado, por el contrario, aumenta la concentración de estos compuestos, y su reducción de la toxicidad fue de un 100%. Esto concuerda con lo expresado por Zhang and Chiang (2001) que concluyen que las resinas de intercambio son mas efectivas en la reducción de contaminantes que el carbón activado.

Por otra parte los test de aireación y de filtración sólo logran disminuir la toxicidad del efluente en un rango entre 4 – 16%, por lo que no se considera una reducción significativa, pero si dan una idea de que la fracción de compuestos tóxicos que se eliminó son volátiles, tensoactivos y presentan cierto grado hidrofóbico (Cooman, *et al.*, 2003; Gajardo, 2001).

Los análisis químicos y toxicológicos generan información complementaria, el efluente presenta toxicidad aguda, que se debe a compuestos inorgánicos catiónicos, el cobre esta presente en altas concentraciones (0,5 mg/l) que estan por sobre los valores de LC<sub>50</sub> 24h encontrados por Milam *et al* (2005) y Bossuyt and Janssen (2005) quienes señalan rangos de toxicidad entre 0,026 a 0,126 mg/l.

El test con EDTA redujo la toxicidad de la muestra a 1,05 UT y el análisis de metales muestra valores de concentración de Cu de 0,019 mg/l, indicando una reducción del 96% para este compuesto. Esta concentración esta por debajo de los valores críticos para *D. magna*, indicando que el cobre es el compuesto que esta causando la toxicidad del efluente como se puede apreciar en la Tabla 11 en donde se exponen valores de toxicidad aguda del cobre para diferentes especies de crustáceos, peces y algas, el valor de contracción de cobre encontrado en la muestra del tratamiento con EDTA es inferior a los valores de LC<sub>50</sub> incluso para peces.

Tabla 11. Toxicidad del Cobre en diferentes organismos de prueba y tiempo de exposición

Especie	LC <sub>50</sub> mg/l	Tiempo exposición	Referencias
<b>Crustáceos</b>			
<i>Daphnia magna</i>	0,12	24 h	Milam <i>et al</i> , 2005
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,04	24 h	Milam <i>et al</i> , 2005
<i>Daphnia obtusa</i>	0,0097	24 h	Villavicencio <i>et al.</i> , 2005
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	0,013	48 h	Bossuyt and Janssen, 2005
<i>Daphnia magna</i>	0,027	48 h	Bossuyt and Janssen, 2005
<i>Daphnia magna</i>	0,018	48 h	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Daphnia magna</i>	0,1	48 h	De Schampelaere <i>et al.</i> , 2002
<i>Litopenaeus vannamei</i>	1,747	96 h	CENAIM, 2002
<i>Exosphaeroma gigas</i>	2,24	96 h	Giarratano <i>et al.</i> , 1998
<b>Peces</b>			
<i>Prochilodus scrofa</i>	0,9	96 h	Carvalho and Fernandes, 2006.
<i>Fathead minnow</i>	0,56	96 h	Santore <i>et al.</i> , 2001
<b>Algas</b>			
<i>Microcystis eruginosa</i>	0.01	24 h	Yu <i>et al.</i> , <i>in press</i>

## 7. CONCLUSION

- Cada tratamiento aplicado fue específico para la reducción de la concentración de cada parámetros físico-químico
- El tratamiento mas efectivo para la reducción de cloratos fue el intercambio aniónico.
- El carbón activado fue el tratamiento mas eficiente en la reducción del color, sin embargo, no logró reducir en su totalidad los compuestos orgánicos presentes en la muestra.
- El tratamiento menos eficiente para la disminución de la concertación de los parámetros fue el intercambio catiónico.
- El test con EDTA logra reducir la toxicidad del efluente en mas de un 70%, debido a que es específico para acomplejar metales pesados, esto indica que la toxicidad se debe a la presencia de cationes en la muestra.
- El análisis de espectroscopia de masa permitió determinar que existen compuestos orgánicos que no fueron degradados o retenidos por los fraccionamientos, sin embargo dichos compuestos no presentan toxicidad en ensayos con *Daphnia magna*.
- La técnica de evaluación e identificación de la toxicidad, permitió identificar que el cobre causa la toxicidad aguda en un efluente industrial de celulosa kraft, proveniente de la etapa de extracción alcalina en una secuencia de blanqueo ECF.



## 8. REFERENCIAS

- American Public Health Association (APHA), American water works association (AWWA), Pollution control federation (WPCF). 1985. Standard methods for examination of water and wastewater. 16<sup>th</sup> ed. Washington.
  
- Aguilar N. 2004. Importancia, manejo y control de extraíbles e incrustaciones (*pitch*) en la fabricación de papel. *Madera y Bosques*. 10(1):89-99
  
- Ali M and Sreekrishnan T. 2001. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents. *Advances in Environmental Research*. 5:175-196.
  
- Avilla J. 2004. Lo esencial acerca del intercambio iónico. [www.agualatinoamerica.com](http://www.agualatinoamerica.com)
  
- Basso M. Cerrella E and Cukierman A. 2001. Tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados mediante carbones activados obtenidos de un precursor renovable. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. 5(9):1-6
  
- Barra R. 2004. Toxicidad de efluentes industriales de plantas de celulosa. Seminario Desafíos tecnológicos, territoriales, socioeconómicos y ambientales del desarrollo forestal industrial chileno. Ponencias de seminario Homónimo. Octubre 2004. Oscar O. Parra y Adolfo V. Acuña (Eds). Concepción, Chile. 134 págs.
  
- Belmonte M. Xavier C. Decap J. Martinez M. Sierra-Alvarez R. and Vidal G. 2005. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. *Journal of Hazardous Materials*. 13:256–263
  
- Besser J. Ingersoll J. Leonard E and Mount D. 1998. Effect of zeolite on toxicity of ammonia in freshwater sediments: Implications for Toxicity Identification Evaluation procedures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17(11):2310-2317.

- Bijan L and Mohseni M. 2005. Integrated ozone and biotreatment of pulp mill effluent and changes in biodegradability and molecular weight distribution of organic compounds. *Water Research*. 39: 3763–3772
  
- Bossuyt T and Janssen C. 2005. Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. *Environmental Pollution*. 136:145-154
  
- Burgess R. Ho K. Tagliabue M. Kuhn A. Comeleo R. Comeleo P. Modica G and Morrison E. 1995. Toxicity characterization of an industrial and a municipal effluent discharging to the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 30(8):524-535.
  
- Burgess R. Pelletier M. Ho K. Serbst J. Ryba S. Khun A. Perron M Raczelowski P and Cantwell M. 2003. Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: a comparison of *Ulva lactuca*, zeolite and aeration methods. *Marine Pollution Bulletin*. 46:607-618.
  
- Burnison B. Comba M. Carey J. Parrott J and Sherry J. Isolation and tentative identification of compound in bleached kraft Mill effluent capable of causing mixed-function oxygenase Induction in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(12):2882-2887
  
- Cáceres C. 1998. Interspecific variation in the abundance, production and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology* 79(5):1699-1710.
  
- Çeçen F. 1993. Adsorption characteristics of biotreated pulp mill effluent. *Wat Sci Tech*. 28(2):1-10
  
- Çeçen F. 2003. The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. Seventh. International water association symposium on forest industry wastewater. IWA Congress Seattle. 11 pp.

- Carvalho C and Fernandes M. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*. 251(1):109-117.
  
- Chamorro S. Eliminación de fitoesteroles a través de una laguna aireada y evaluación toxicológica mediante *Daphnia magna*. Seminario de título presentado a la Facultad de Ciencias naturales y Oceanográficas para optar al título de Biólogo. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 55 pp.
  
- Chamorro S. Xavier C and Vidal G. Behavior of the aromatic compounds container in pulp mill effluent treated by aerated lagoon. *Biotechnology progress*. 21(5):1567-1571.
  
- CENAIM. 2002. Concentraciones letales de compuestos químicos en camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Boletín informativo N°5.
  
- Cody R and Bortone S. Masculinization of Mosquitofish as an Indicator of Exposure to Kraft Mill Effluent. *Environmental Contamination and Toxicology*. 58:429-436.
  
- Cooman K. Gajardo M. Nieto J. Bomhardt C and Vidal G. Tannery wastewater cracterization and toxicity effects on *Daphnia spp*. *Environmental Toxicology*. 18(1):45-51.
  
- Correa J. Domínguez V. Matinez M and Vidal G. 2006. Aerobic degradation of 2,4,6-TCP content in ECF bleached effluent. *Environmental International*. 29:459-465.
  
- Crooks R and Sikes J. 1990. Environmental effects of bleached kraft mill effluents. *Appita*. 43(1):67-76.
  
- Culp J. Cash K. Glozier N and Bruazz R. (2003). Effects of pulp mill effluent on benthic assemblages in mesocosms along the saint john river, Canada. *Environ Toxicol Chem*. 22(12): 2916–2925

- De Schamphelaere K. Heijerick D and Janssen C. 2002. Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 133:243–258
  
- Diez M. Castillo G. Aguilar L. Vidal G and Mora M. 2002. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. *Bioresource Technology*. 83:131-138.
  
- Doyle J and Lim P. 2002. The effect of estradiol on the gonopodial development and sexual activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21:2719-2724.
  
- Eklund B. Bruno E. Lithner G and Borg H. 2002. Use of ethylenediaminetetraacetic acid in pulp mills and effects on metal mobility and primary production. *Environ Toxicol Chem*. 21(5):1040-1051.
  
- Ellis R. Van Den Heuvel M. Bandelj E. Smith M. McCarthy L. Stuthridge T and Dietrich D. 2003. In vivo and in vitro assessment of the androgenic potential of a Pulp and paper mill effluent. *Environ Toxicol Chem*. 22(7):1448-14456
  
- EPA. 1988. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I Toxicity Characterization procedures. EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, Environ Research Laboratory. 74 pp. En Gajardo M. 2001. Evaluación y caracterización toxicológica de un efluente industrial de curtiembre utilizando el organismo de prueba *Daphnia pulex* (Crustacea:Cladocera). Seminario de Titulo. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 48 pp.
  
- EPA. 1989a. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase II Toxicity Identification procedures. EPA-600/3-88/035. Duluth, MN, Environ Research Laboratory.

74 pp. En Gajardo M. 2001. Evaluación y caracterización toxicológica de un efluente industrial de curtiembre utilizando el organismo de prueba *Daphnia pulex* (Crustacea:Cladocera). Seminario de Titulo. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 48 pp.

- EPA. 1989a. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase III Toxicity Identification procedures. EPA-600/3-88/036. Duluth, MN, Environ Research Laboratory. 74 pp. En Gajardo M. 2001. Evaluación y caracterización toxicológica de un efluente industrial de curtiembre utilizando el organismo de prueba *Daphnia pulex* (Crustacea:Cladocera). Seminario de Titulo. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 48 pp.

- EPA. 1993. Systematics, ecology, life history and culture methods *Daphnia* (*D. pulex* and *Ceriodaphnia*). 131-147.

- Gaete H. Larraín A. Baeza J. Rodríguez J and Bay-Schmith E. 1999. Efectos de las aguas receptoras de efluentes de industrias de celulosa localizadas en la cuenca del río Biobío (Chile central) sobre la tasa de crecimiento de la microalga *Selenastrum capricornutum* y reproducción del cladóceros *Daphnia pulex*. *Rev Invest Cient Tecnol Ser Cienc Mar* 4:19-29.

- Gajardo M. 2001. Evaluación y caracterización toxicológica de un efluente industrial de curtiembre utilizando el organismo de prueba *Daphnia pulex* (Crustacea:Cladocera). Seminario de Titulo. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 48 pp.

- Giarratano E. Amín O. Esteves J y Gil M. 1998. Toxicidad de Metales Pesados en el Isópodo *Exosphaeroma gigas*, en el Canal Beagle, Tierra del Fuego. Informe tecnico. 7 pp.

- Gilman, C. Leusch F. Breckenridge C and MacLatchy D. 2003. Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450scc activity. *General and Comparative Endocrinology* 130:172–184

- González T. 1999. Prospección de fertilidad en diez suelos forestales de la VIII región, mediante el método chaminade. Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales. 168 pp.
  
- Guzzella L. Bartone C. Ross P. Tartari G and Muntaus H. 1996. Toxicity Identification Evaluation of lake Orta (northern Italy) sediments using the Microtox system. *Ecotoxicol Environ Saf* 35:231-235.
  
- Hall R and Liver S. Interactions of acids resin with aerobic and anaerobic biomass II. Partitioning on biosolids. *Water Research*. 30(3):672-678
  
- Hewitt L and Marvin C. 2005. Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents. *Mutation Research*. 589:208-232
  
- Hewitt L. Smyth S. Dube M. Christine I. Gilman C and Maclatchy D. 2002. Isolation of compounds from bleached kraft mill recovery condensates associated with reduced levels of testosterone in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem*. 21(7):1359-1367.
  
- Hongxia Y. Jing C. Yuxia C. Huihua S. Zhonghai D and Hongjun J. 2004. Application of Toxicity Identification Evaluation procedures on wastewaters and sludge from a municipal sewage treatment works with industrial inputs. *Ecotoxicol Environ Saf* 57:426-430.
  
- Ikehata K and Buchanan I. 2002. Colour and Chloride Removal from Pulp Mill Effluent Using Ion-Exchange Resins. Sustainable forest management networks. Projectos Reports 2000-18. University of Alberta. Canada. 20 pp.
  
- Kamaya Y. Tokita N and Suzuki K. (2005). Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 61:83-88

- Karrasch B. Parra O. Cid H. Mehrens M. Pacheco P. Urrutia R. Valdovinos C and Zaror C. (2006). Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Science of the Total Environmental* 359(1-3):194-208
  
- Karuppiah M and Gupta G. 1996. Impact of point and nonpoint source pollution on pore waters of two Chesapeake bay Tributaries. *Ecotoxicol Environ Saf.* 38:81-85
  
- Kim K. Gun Y. Sang L and Kim D. 2006. Combined toxicity of copper and phenol derivatives to *Daphnia magna*: Effect of complexation reaction. *Environment International* 32:487-492
  
- Kostamo A and Kukkonen J. 2003. Removal of resin acids and sterols from pulp mill effluents by activated sludge treatment. *Wat Res.* 37:2813-2820.
  
- Larrea L. Forster C and Mele. 1989. Changes in lignin during diffused air activated sludge treatment of kraft effluents. *Wat Res.* 23(9):1080-1989.
  
- Lema J. Moreira T. Palma C and Feijoo G. 1998. Clean biological bleaching processes in the pulp and paper industry. *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses.* 16:211-226.
  
- Lignum. 2004. Sector forestal: el motor de la bolsa chilena. 74:87 pp.
  
- Liver S and Hall R. 1996. Interactions of resin acids with aerobic and anaerobic biomass I. Degradation by non-acclimated inocula. *Water Research.* 30(3):663-671.
  
- Malmqvist A and Gunnarsson L. 1993. Biological removal of chlorate from kraft bleach plant effluent. A pilot plant study. *Nordic pulp and paper research journal.* 3:032-337

- Malmqvist A and Welander T. 1994. Biological removal of chlorate from bleaching plant effluent. *Wat Sci Tech.* 29(5):365-372.
  
- Melo R. 2001. Tecnología de la celulosa y el papel, proceso de pulpaje y blanqueo. Dirección de Docencia. Universidad de Concepción. Concepción-Chile. Vol. 2: 8-17 pp.
  
- Maria V. Correia A and Santosa M. 2003. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicol Environ Saf.* 55:126–137
  
- Mellanen P. Soimasuo M. Holmbom B. Oikari A and Santti R. 1999. Expression of the Vitellogenin Gene in the Liver of Juvenile Whitefish (*Coregonus lavaretus*L. s.l.) Exposed to Effluents from Pulp and Paper Mills. *Ecotoxicol Environ Saf.* 43:133–137
  
- Milam C and Farris J. 1998. Risk identification associated with iron-dominated mine discharges and their effect upon freshwater bivalves. *Environ Toxicol Chem.* 17(8):1611-1619.
  
- Milam D. Farris J. Dwyer F and Hardesty D. 2005. Acute Toxicity of Six Freshwater Mussel Species (Glochidia) to Six Chemicals: Implications for Daphnids and *Utterbackia imbecillis* as Surrogates for Protection of Freshwater Mussels (Unionidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48:166–173.
  
- Mount D and Hockett R. 2000. Use of Toxicity Identification Evaluation methods to characterize, identify and confirm hexavalent chromium toxicity in an industrial effluent. *Wat. Res* 34(4):1379-1385
  
- 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*. INN-Chile.



- Olmstead A and LeBlanc G. 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 19(8):2107-2113.
- Orrego, L. 2005. Efectos de las descargas de efluentes de las industrias de celulosa y papel en el río Biobío, Chile central : Uso de Biomarcadores fisiológicos, bioquímicos y reproductivos. Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales. 153 pp.
- Parra R. 2001. Blanqueo de celulosa basado en los procesos biológicos de degradación de lignina. Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales. 136 pp.
- Papelnet. 2002. Proceso de blanqueo de celulosa y producción de celulosa kraft en Chile. [www.papelnet.cl](http://www.papelnet.cl)
- Pessala P, Schultz E, Nakari T, Joutti A, Herve S. 2004. Evaluation of wastewaters effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure. *Ecotoxicol Environ Saf* 52(2):263-272.
- Pokhrel D and Viraraghavan. 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater: a review. *Science of the total Environment*. 333:37-58.
- Prochile. 2006. Estadísticas de exportación de celulosa septiembre 2005. [www.prohile.cl](http://www.prohile.cl)
- Radix P, Leonard M, Papantoniou C, Roman G, Saouter E, Gallotti-Smith S, Thiebaud H and Vasseur P. 1999. Comparison of *Brachionus calyciflorus* 2-D and Microtox chronic 22-H tests with *Daphnia Magna* 21-D test for the chronic toxicity assessment of chemicals. *Environ Toxicol Chem*. 18(10):2178-2185.
- Ragnar M. 2003. Blanqueo con dióxido de cloro para pulpa kraft en dos etapas: Clave para la rentabilidad. MARI. Papel y celulosa.1-8.

- Ramos M. 1996. Determinación de biotoxicidad en aguas residuales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. España. 125 pp.
  
- Reyes E. Cerino F and Suárez M. 2006. Remoción metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierias*. 9(31):59-64.
  
- Rigol A. Latorre A. Lacorte S and Barcelo D. 2004. Bioluminescence inhibition assays for toxicity screening of wood extractives and biocides in paper mill process waters. *Environ Toxicol Chem*. 23(2):339-347.
  
- Rintala J and Lepistö. 1992a. Anaerobic treatment of thermomechanical pulping whitewater at 35-70°C. *Wat Res*. 26(10):1297-1305
  
- Rintala J and Lepistö. 1992b. Toxicity of kraft Bleaching Effluents on Thermophilic and Mesophilic VFA methanation. 42:17-26.
  
- Rohella R. Choudhury S. Manthan M and Murty J. 2001. Removal of colour and turbidity in pulp and paper mill effluents using polyelectrolytes. *Indian J Environ Health*. 43(4):159-63.
  
- Rosemarin A. Lehtinen A. Notini M and Jan Mattson. 1994. Effects of pulp mill chlorate on baltic sea algae. *Environmental Pollution*. 85(1):3-13.
  
- Sahoo D and Gupta R. 2005. Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. *Process Biochemistry*. 40:1573-1578.
  
- Santore R. Di Toro D. Paquin P. Allen H And Meyer J. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem*. 20(10):2397-2402

- Schnell A. Steel P. Melcer H. Hodson P and Carey H. 2000. Enhanced biological treatment of bleached kraft mill effluents I. Removal of chlorinated organic compounds and toxicity. *Wat Res.* 34(2):493-500.
  
- Seco A. Gabaldón C. Marzal P and Aucejo A. 1999. Effect of pH, cation concentration and sorbent concentration on cadmium and copper removal by a granular activated carbon. *J Chem Technol Biotechnol.* 74:911-918.
  
- Sierra-Alvarez R and Lettinga G. 1990. The methanogenic toxicity of wood resins constituents. *Biological Wastes.* 33(3):211-226.
  
- Soucek D. Cherry D and Trent G. 2000. Relative Acute Toxicity of Acid Mine Drainage Water Column and Sediments to *Daphnia magna* in the Puckett's Creek Watershed, Virginia, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38:305-310.
  
- Stauber J. Gunthorper L. Woodworth J. Munday B. Krassoi and Simon J. 1996. Comparative toxicity of effluents from ECF and TCF bleaching of eucalypt kraft pulps. *Appita.* 49(3):184-188.
  
- Stronkhorst J. Schot M. Dubbeldam M and Ho K. 2003. A Toxicity Identification Evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Mar Pollut Bull* 46:56-64.
  
- Sullivan J and Douek M. 1998. Determination of inorganic chlorine species in kraft mill bleach effluents by ion chromatography. *J. Chromatogr.* 804:113-121
  
- Thompson G. Swain J and Forster M. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Biores. Technol.* 77:275-286.

- Tietge J. Hockett J and Evans J. 1997. Major ion toxicity of six produced waters to three freshwater species: Application of ion toxicity models and TIE procedures. *Environ Toxicol Chem* 16(10):2002-2008.
  
- Tarkpea M. Eklund B. Linde M and Bengtsson B. 2000. Toxicity of conventional, elemental chlorine-free, and totally Chlorine-free kraft-pulp bleaching effluents assessed by short-term Lethal and sublethal bioassays. *Environ Toxicol Chem* 18(11):2487 – 2496.
  
- Toles C. Marshall W and Johns M. (1999). Surface functional groups on acid-activated nutshells carbons. *Carbon* 37:1207-1214.
  
- Vähätalo A. Salonen K. Sasaki E and Skinoja-Salonen S. 2002. Bleaching of color of kraft pulp mill effluents and natural organic matter in lakes. *Can J Aquat Sci.* 59:808-818
  
- Van Sprang P and Janssen C. 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified Toxicity Identification Evaluation approach. *Environ Toxicol Chem* 16(12):2501-2507.
  
- van den Heuvel M. Ellis R. Tremblay L and Stuthridge T. 2002. Exposure of reproductively maturing rainbow trout to a New Zealand pulp and paper mill effluent. *Ecotoxicol Environ Saf.* 51:65-75.
  
- van Wijk D. Kroon S and Gartener-Arends I. 1998. Toxicity of chlorite to selected species of alga, bacteria and fungi. *Ecotoxicol Environ Saf.* 40:206-211.
  
- van Wijk D and Hutchinson T. 1995. The ecotoxicity of chlorate to aquatic organisms: a critical review. *Ecotoxicol Environ Saf.* 32:244-253
  
- Vidal G. 1999. Revisión bibliográfica sobre los compuestos orgánicos producidos en la industria de la pasta y el papel: incidencia sobre la toxicidad y biodegradabilidad anaerobia de sus efluentes. *Afinidad.* 16(481):152-160.

- Vidal G, Videla S and Diez M. 2001. Molecular weight distribution of *Pinus radiata* kraft mill wastewater treated by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 77:183-191.
  
- Villavicencio G. Urrestarazu P. Carvajal C. De Schamphelaere K. Janssen C. Torres J and Patricio H. Rodriguez P. 2005. Biotic ligand model prediction of copper toxicity to daphnids in a range of natural waters in Chile. *Environ. Toxicol. Chem.* 24(5):1287-1299.
  
- Werker A and Hall R. 1999. The influence of pH on the growth-linked biodegradation kinetics of selected resin acids found in pulp mill effluent. *Tappi Journal*. 82(7):169-177.
  
- Xavier C. Chamorro S and Vidal G. Chronic effects of kraft mill effluents and endocrine active chemicals on *Daphnia magna*. *Environmental Contamination and Toxicology*. 75:670-676.
  
- Xavier C. 2006. Influencia de la tecnología de tratamiento en la eliminación de fitoesteroides contenidos en efluentes de celulosa kraft y en la toxicidad de estos compuestos en organismos acuáticos. Tesis presentada a la escuela de graduados de la Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales. 156 pp.
  
- Yu Y. Kong F. Wang M. Qian L and Shi X. *In press*. Determination of short-term copper toxicity in a multispecies microalgal population using flow cytometry. *Ecotoxicol Environ Saf. In press*.
  
- Zaror C. 1998. Introducción a la ingeniería ambiental. Vicerrectoría Académica. Dirección de Docencia. Ed. Universidad de Concepción. Concepción. Chile.
  
- Zaror C. 2002. Introducción a la ingeniería ambiental para la industria de procesos. Ed. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. 613 pp.
  
- Zang Q and Chuang K. 2001. Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin. *Advances in Environmental Research*. 3:251-258.

