

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



PROGRAMA DE OCEANOGRÁFÍA

SUFICIENCIA INVESTIGADORA

**Extracción Micelar de Pesticidas  
Organoclorados en Suelos Agrícolas**

Daura Vega Moreno

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
ESPAÑA

2005



# Resumen

---

Con objeto de buscar nuevas técnicas analíticas que permitan la extracción y determinación de pesticidas organoclorados a partir de muestras sólidas, se han estudiado las variables que afectan al proceso de extracción de seis pesticidas organoclorados de diferentes muestras de suelos de agricultura, utilizando mezclas de surfactantes como extractantes y posteriormente determinados por cromatografía líquida de alta resolución.

Se ha utilizado la extracción asistida por microondas, empleando cuatro tipos de surfactantes no iónicos para la determinación de 6 pesticidas organoclorados derivados del DDT, aldrín y dieldrín. Para la optimización de las variables que afectan al proceso de extracción se han aplicado dos tipos de diseños factoriales.

Los resultados obtenidos tras la aplicación del método muestran que el uso de surfactantes como extractantes puede ser una alternativa viable a los métodos convencionales.



# Índice general

---

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Pesticidas Organoclorados . . . . .	1
1.2. Surfactantes . . . . .	5
1.2.1. Surfactantes no iónicos . . . . .	7
1.3. Extracción por Microondas . . . . .	10
1.3.1. Naturaleza de los extractantes . . . . .	13
1.3.2. Volumen de Extractante . . . . .	14
1.3.3. Temperatura . . . . .	14
1.3.4. Potencia . . . . .	15
1.3.5. Tiempo de Extracción . . . . .	16
1.3.6. Naturaleza de la Matriz . . . . .	16
1.3.7. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas .	17
1.3.8. Extracción asistida por microondas utilizando surfac-	
tantes . . . . .	19
1.4. Objetivos del Trabajo . . . . .	19
<b>2. Parte Experimental</b>	<b>21</b>

2.1. Aparatos Utilizados . . . . .	21
2.1.1. Cromatografo Líquido de Alta Resolución . . . . .	21
2.1.2. Microondas . . . . .	22
2.1.3. Tratamiento Estadístico . . . . .	22
2.2. Reactivos . . . . .	23
2.3. Disoluciones . . . . .	24
2.4. Procedimientos Analíticos . . . . .	24
2.4.1. Análisis Cromatográfico . . . . .	24
2.4.2. Mezclas de Surfactantes . . . . .	25
2.4.3. Extracción por Microondas . . . . .	26
2.4.4. Acondicionamiento de las muestras de suelo . . . . .	26
2.4.5. Características de los suelos . . . . .	27
<b>3. Resultados y Discusión</b>	<b>31</b>
3.1. Optimización de la extracción MAME . . . . .	32
3.1.1. Efecto del Volumen de Surfactante . . . . .	35
3.1.2. Efecto de la Concentración de Surfactante . . . . .	35
3.1.3. Potencia y Tiempo de irradiación . . . . .	38
3.2. Parámetros analíticos y validación . . . . .	40
3.2.1. Análisis Cromatográfico . . . . .	40
3.2.2. Parámetros Analíticos . . . . .	42
3.2.3. Validación del método con una muestra de suelo certificada . . . . .	43
3.3. Aplicación de MAME a diferentes muestras de suelos . . . . .	46

3.3.1. Influencia de las características de la matriz . . . . .	48
3.3.2. Influencia del envejecimiento de las muestras de suelo .	51
<b>4. Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>63</b>
<b>5. Anexo</b>	<b>65</b>



# Introducción

---

## 1.1. Pesticidas Organoclorados

Los pesticidas organoclorados han sido ampliamente usados durante más de tres décadas debido a su eficacia en el tratamiento de plagas. Estos compuestos químicos se empezaron a utilizar en 1940 y a pesar de que se prohibieron en los países desarrollados entre 1970 y 1980, aún se puedan encontrar en diferentes regiones altas concentraciones de los mismos, debido a su alta permanencia en el medio ambiente. En los países subdesarrollados todavía está permitido su uso para el control de enfermedades que se transmiten a través de insectos, especialmente la malaria (1; 2).

Los pesticidas organoclorados son compuestos tóxicos que afectan a la salud humana y al medio ambiente. Debido a que estos compuestos pueden transportarse por el viento y el agua, pueden afectar a personas y vida salvaje en zonas muy alejadas del país donde se estén produciendo y usando (3).

Estos pesticidas pertenecen al grupo de compuestos orgánicos persistentes

(POPs) mantenéndose por largos períodos de tiempo en el medioambiente. Su naturaleza lipofílica, su hidrofobicidad, bajo peso molecular y bajas tasas de degradación favorecen la bioacumulación de los mismos en los tejidos biológicos, con la consiguiente biomagnificación de las concentraciones en los organismos a medida que pasan de unas especies a otras ascendiendo en la cadena trófica (4; 5). Este hecho tiene consecuencias perjudiciales para los humanos al ingerir alimentos que pueden contener altas tasas de contaminación (6; 7).

Este fenómeno, unido a su alta permanencia, hace que el tiempo de vida medio de estos compuestos en los diferentes tipos de matrices sea muy alto y que a pesar de estar prohibidos en los países desarrollados, aún se puedan encontrar en altas concentraciones en organismos y en suelos (8; 9).

Los pesticidas organoclorados constituyen un único tipo de pesticidas debido a su estructura cíclica, a su número de átomos de cloro y a su baja volatilidad. Pueden clasificarse en cuatro categorías:

- diclorodifeniletanos (ej. DDTs)
- ciclodienos (ej. Aldrin y Dieldrin)
- bencenos clorados
- ciclohexanos

Los pesticidas objetos de este estudio representan algunos de los pesticidas organoclorados más ampliamente usados. Todos ellos forman parte de la ‘docena sucia’, pertenecen a la lista de las 12 sustancias prioritarias para

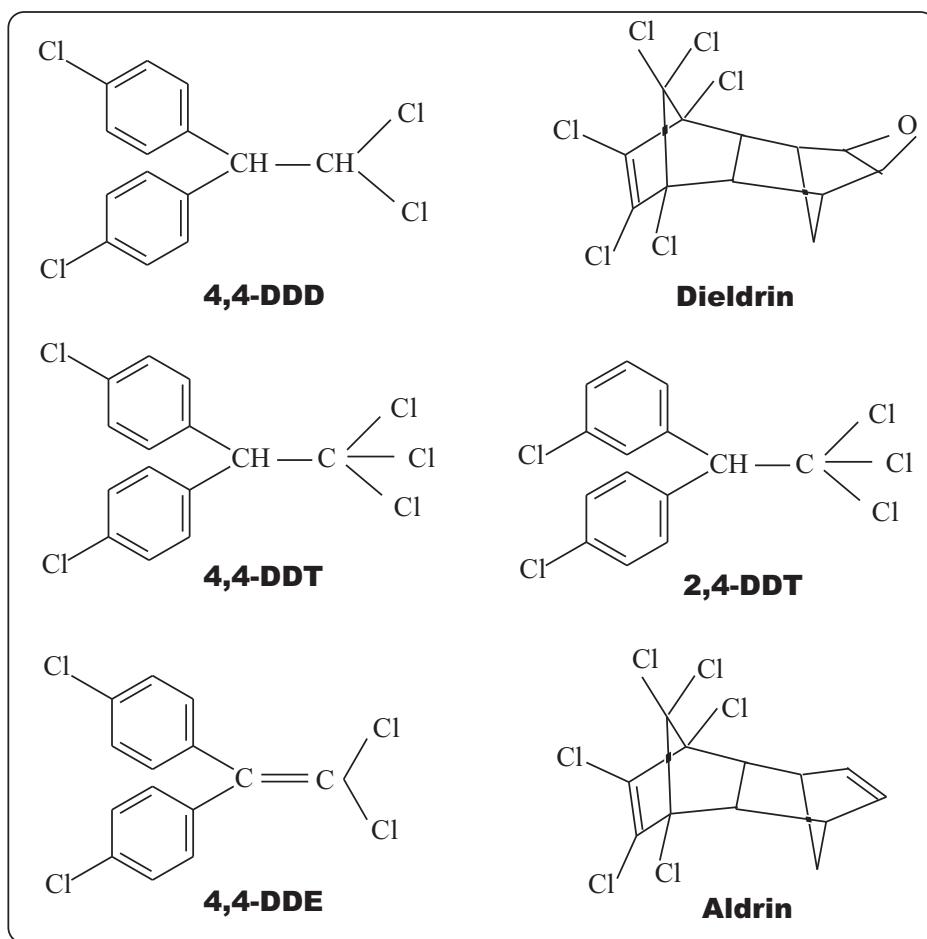
la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) (10). Estos pesticidas son derivados del DDT, aldrín y dieldrín (Tabla 1.1).

Compuesto	Abreviatura
4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethane	4,4'-DDD
Dieldrin	Dieldrin
4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	4,4'-DDT
2,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	2,4'-DDT
4,4'- Dichlorodiphenyldichloroethylene	4,4'-DDE
Aldrin	Aldrin

**Tabla 1.1:** Lista de pesticidas organoclorados estudiados

La fórmula química y estructura de los pesticidas objeto de este estudio se representa en la Figura 1.1.

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos químicos son importantes para establecer la toxicidad de los mismos, en especial en aquellas sustancias consideradas como posibles contaminantes ambientales. Algunas sustancias estables y liposolubles pueden contaminar alimentos de consumo humano y producir efectos nocivos cuando éstos son ingeridos. Propiedades como la presión de vapor y la dimensión y densidad de las partículas son variables importantes para predecir el transporte atmosférico de las sustancias químicas. La adsorción de una sustancia química en las partículas del suelo puede aumentar la probabilidad de que dicha sustancia sea transportada por



**Figura 1.1:** Fórmula química de los pesticidas estudiados

el aire o por el agua y así podría depositarse en lugares remotos de su sitio de aplicación; o bien, puede retardar el movimiento de la misma a través de las aguas subterráneas, reduciendo la probabilidad de contaminación de las fuentes de agua subterránea cerca del lugar de aplicación. En la Tabla 1.2 se relacionan algunas propiedades físicas y químicas de los pesticidas estudiados (11; 12).

Compuesto	Masa Molecular	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Pto Ebull (°C)	Pto Fusión (°C)
4,4'-DDD	320.04	1.385	350	110.3
Dieldrin	380.91	1.75	-	177
4,4'-DDT	354.49	0.99	260	109
2,4'-DDT	354.54	0.98	-	74.2
4,4'-DDE	318.03	-	336	89
Aldrin	364.91	1.6	-	105.5

**Tabla 1.2:** Propiedades físico-químicas de los pesticidas estudiados

## 1.2. Surfactantes

Los surfactantes son sustancias cuya estructura molecular presenta dos grupos con carácter diferente: un grupo no polar (hidrofóbico) y otro polar o iónico (hidrofílico). Este tipo de estructura se denomina “anfipática”. El grupo no polar, que generalmente es una cadena hidrocarbonada, con un número de átomos de carbono comprendido entre ocho y dieciocho, constituye la ‘cola’ de la molécula de surfactante, mientras que el grupo polar, que puede ser de naturaleza iónica o no iónica, forma la ‘cabeza’ de la misma.

Esta estructura “anfipática” de las moléculas de surfactante le confiere unas propiedades muy especiales al mismo. Entre ellas, la posibilidad de reducir la tensión superficial del agua y la de adsorberse en las superficies e interfasas de un sistema formado por fases inmiscibles, fenómeno respon-

sable de la mayoría de las aplicaciones industriales de los surfactantes como detergentes, estabilizadores emulsionantes, etc. y de la formación de micelas.

Cuando el surfactante se disuelve en agua, la presencia del grupo hidrofílico impide que el surfactante sea expulsado completamente del disolvente; la estructura “anfipática” del surfactante causa no sólo la concentración del mismo en la superficie, sino también la orientación de la molécula con su grupo hidrofílico en la fase acuosa y su grupo hidrofóbico hacia el exterior (13).

Dependiendo de la naturaleza del grupo polar, los surfactantes se clasifican en cuatro grupos principales (14):

- Catiónicos: el grupo hidrofílico posee carga positiva, como por ejemplo, las sales de amonio cuaternarias.
- Aniónicos: el grupo hidrofílico tiene carga negativa. Ejemplos de este tipo de surfactantes son las sales de ácidos alquil carboxílicos o sulfónicos.
- Zwitteriónicos: en el surfactante existen grupos con carga positiva y negativa. Los aminoácidos son un ejemplo de este tipo de surfactantes.
- No iónicos: el surfactante no posee grupos con carga, como por ejemplo, los monoglicerídos.

En disoluciones muy diluidas, los surfactantes suelen encontrarse como monómeros, dímeros, etc. Pero si la concentración de la disolución aumenta se produce un proceso de agregación que da lugar a cambios en las propiedades físicoquímicas de la disolución. El agregado coloidal que se forma recibe el

nombre de “micela”(cluster). El número de moléculas de surfactante que pueden formar la micela se denomina número de agregación (N) y se halla en un rango de 50 a 100 (14; 15).

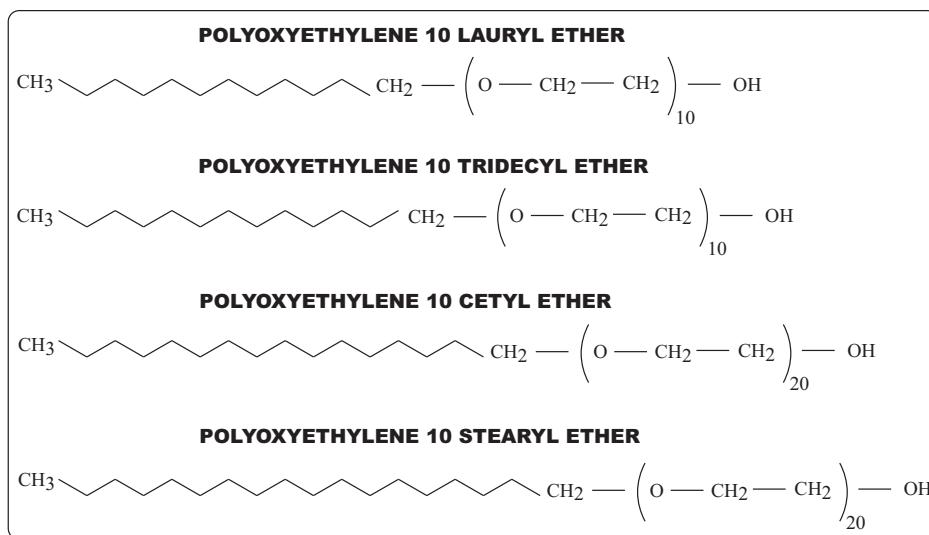
Hay una concentración, característica para cada surfactante, a partir de la cual se forma la micela. A esta concentración se le denomina concentración micelar crítica (CMC). El proceso de agregación se da en un pequeño intervalo de concentraciones y parece ser un proceso altamente cooperativo. Puede considerarse que la formación de micelas es un mecanismo alternativo a la adsorción en las interfases para evitar el contacto entre los grupos hidrofóbicos y el agua, y así disminuir la energía libre del sistema (13).

La forma de la micela varía dependiendo del surfactante y del medio. Presentan el grupo hidrofóbico, la cola, orientado hacia el interior de las mismas (corazón), mientras que el grupo hidrofílico, la cabeza, hacia el exterior de la micela. Es posible que se formen micelas en medios orgánicos no polares. En este caso la micela formada recibe el nombre de “micela inversa”. Aquí, la disposición de las moléculas de surfactante es contraria a la descrita anteriormente, es decir, los grupos hidrofóbicos se extienden hacia la fase no polar y los hidrofílicos hacia el interior de la micela (15).

### **1.2.1. Surfactantes no iónicos**

La mayoría de los surfactantes no iónicos son “aductos” de óxido de etileno. Los grupos polioxietilén son la parte hidrofílica de la molécula de surfactante. La parte lipofílica de la molécula puede ser una variedad de gru-

pos apolares, incluidas cadenas alquílicas (alcoholes, ácidos grasos o amidas), alquilbencenos y sus derivados fluorados, derivados de la silicona o cadenas de polioxipropileno (16). En la Figura 1.2 aparecen recogidos los diferentes tipos de surfactantes no iónicos utilizados en este estudio así como su estructura.

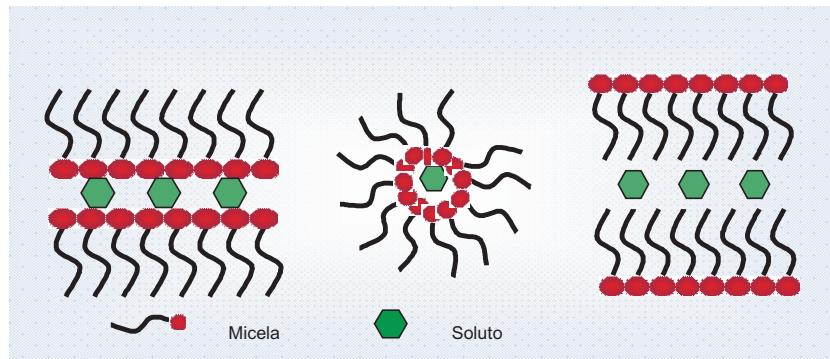


**Figura 1.2:** Estructura química de los surfactantes estudiados

Los surfactantes no iónicos del tipo polioxietilen alquil éteres fueron sintetizados por primera vez a principios de los años 30. Su fórmula general es  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$ . Son conocidos como  $\text{C}_n\text{E}_m$ , donde  $n$  indica el número de átomos de carbono en la cadena alquílica y  $m$  representa el número de unidades de óxido de etileno en la parte hidrofílica.

Una de las propiedades más importantes de los surfactantes, directamente relacionada con su capacidad de formar micelas, es la solubilización de solutos. La mayoría de las aplicaciones de las micelas en medios acuosos se basan en esta propiedad (17).

La solubilización de un analito en una micela determinada es un proceso de equilibrio dinámico y depende tanto de la naturaleza del soluto como del medio micelar empleado. Una vez sobrepasada la CMC comienza la solubilización, pudiendo el soluto unirse a la micela en diferentes regiones de la misma dependiendo de la naturaleza del soluto y del surfactante. En la Figura 1.3 se muestra una representación esquemática de estas solubilizaciones.



**Figura 1.3:** Representación esquemática para la solubilización de solutos en las micelas

Las interacciones entre ambos pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas o más normalmente, una combinación de ambos efectos. Aunque el mecanismo real de solubilización es complejo, se puede aceptar que los sustratos iónicos con carga opuesta a los grupos de cabeza de las micelas se pueden enlazar fuertemente a ellos; las especies no polares que poseen electrones polarizables, como los compuestos aromáticos, residen cerca del grupo de cabeza, mientras que los radicales alquílicos interactúan con el core de la micela, de modo que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas micela-soluto sean máximas. Los solutos apolares se localizan en el core de la micela.

Las micelas no son sistemas estáticos sino que están, junto con los solutos que han sido solubilizados por ellas, en equilibrio dinámico con el medio que las rodea. Las moléculas de surfactante entran y salen de la micela en microsegundos.

Se ha destacado la importancia de los medios micelares en separaciones analíticas debido a la capacidad que poseen las micelas para interaccionar selectivamente con la moléculas, destacando su importancia en tres campos: procesos de extracción, cromatografía y separaciones electrocinéticas.

Sin embargo, también hay que mencionar su intervención en otros procesos como pueden ser el desplazamiento de equilibrios, la modificación de cinéticas de reacción, aumento de fluorescencia y fosforescencia, procesos de extracción y preconcentración y separación por cromatografía líquida o en capa fina (18; 19).

### **1.3. Extracción por Microondas**

Los métodos tradicionales para la extracción de compuestos orgánicos contaminantes de muestras sólidas han sido el Soxhlet, desarrollado por F. Soxhlet en 1879, y el baño de ultrasonidos o sonicación (20). Estos métodos emplean grandes cantidades de disolventes orgánicos bajo condiciones de temperatura y agitación muy agresivas.

El Soxhlet es particularmente útil porque muchos contaminantes suelen estar muy fuertemente adsorbidos en las matrices sólidas (sedimentos, tierras, tejidos de organismos y plantas, etc.,) pero requiere tiempos de extracción

demasiado largos y el uso de los mencionados disolventes orgánicos en grandes cantidades. Este hecho aumenta la toxicidad y encarece el proceso. Como consecuencia de las condiciones utilizadas para la extracción, puede producirse, además, la degradación de los analitos y pérdidas por volatilización de los mismos.

La extracción por sonicación es más rápida que la extracción por Soxhlet y permite la extracción desde grandes cantidades de muestras, pero también en esta técnica se utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos.

En la última década se ha producido una demanda creciente de nuevas técnicas de extracción susceptibles de ser automatizadas, con tiempos de extracción cortos y un consumo reducido de disolventes orgánicos, a fin de prevenir problemas de toxicidad en los laboratorios y reducir los costes de preparación de muestras. De esta forma, han surgido nuevas técnicas como la extracción con fluidos supercríticos, SFE (20), la extracción acelerada, ASE (21), la microextracción en fase sólida, SPME (22) y la extracción asistida por microondas, MAE (23).

La extracción asistida por microondas (MAE) ha tenido un gran desarrollo en los últimos años debido a que permite la rápida extracción de los analitos de las matrices sólidas con una eficiencia en la extracción comparable a la que presentan los métodos clásicos (24). Además, ofrece claras ventajas sobre éstos, ya que reduce considerablemente el tiempo de extracción, (de 20 a 30 minutos por muestra) y lo que es más importante, el consumo de disolventes orgánicos. Al mismo tiempo presenta la posibilidad de realizar la extracción de varias muestras, hasta doce, simultáneamente (25; 26).

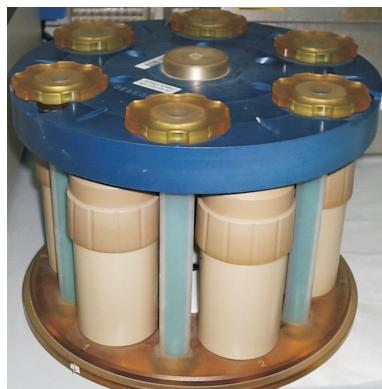
Otra ventaja adicional de la MAE sobre las otras nuevas técnicas de extracción, como son la SFE, es que es una técnica de menor coste instrumental y más fácil de optimizar (20).

Actualmente, este tipo de extracción es una técnica consolidada, y ya han sido publicados algunos métodos estandards, fundamentalmente para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Desde entonces, numerosas aplicaciones de la extracción asistida por microondas han sido publicadas para diferentes compuestos orgánicos en diversas matrices, con especial énfasis en aplicaciones medioambientales.

La extracción asistida por microondas (MAE) consiste en calentar el extractante (generalmente un disolvente orgánico) en contacto con la muestra mediante la energía de las microondas. La partición de los analitos de interés de la muestra al extractante depende de la temperatura y de la naturaleza del extractante.

Cuando se utiliza la energía de microondas, al contrario de lo que ocurre en los procesos clásicos de calentamiento, toda la muestra se calienta simultáneamente, sin que se produzca el calentamiento del recipiente. Esto hace que se alcance el punto de ebullición del disolvente más rápidamente, y conduce a tiempos de extracción más cortos. En recipientes cerrados, el disolvente puede ser calentado por encima de su punto de ebullición, lo cual aumenta su velocidad y la eficacia de la extracción.

La optimización de la extracción asistida por microondas implica el estudio de los parámetros que tienen influencia en la extracción. Muchos investigadores han utilizado diseños factoriales, de composición central u ortogonal,



**Figura 1.4:** Vaso Cerrado de Microondas

Además, se puede realizar la extracción simultánea de varias muestras en un solo proceso, reduciendo el tiempo total de extracción. Después de realizar la extracción, los vasos se deben enfriar a temperatura ambiente antes de abrirlos para evitar la pérdida de los compuestos más volátiles.

para determinar las condiciones óptimas (27). Entre los parámetros más estudiados se encuentran la composición y la naturaleza de los extractantes, así como el volumen del mismo; el tiempo y la temperatura de extracción; las características de la matriz y el grado de humedad de la misma.

### 1.3.1. Naturaleza de los extractantes

La elección del extractante es fundamental para conseguir una extracción óptima, puesto que la naturaleza del mismo es uno de los factores que influyen en la eficacia del proceso.

Para la selección del disolvente, tenemos que tomar en consideración algunas de las propiedades del mismo, como son su capacidad para absorber la radiación de microondas, sus interacciones con la matriz, así como su capacidad para solubilizar el analito. Otro importante aspecto es la compatibilidad del disolvente utilizado para la extracción con el método analítico usado como

paso final en la determinación.

Es común utilizar como disolventes en la extracción por microondas los mismos que se utilizan en los métodos convencionales de extracción. Sin embargo, no siempre son los más adecuados. Ya que además de absorber la energía, el extractante debe ser capaz de convertirla en calor, ya que la eficiencia de la extracción depende del factor de pérdida dieléctrica.

Es posible combinar disolventes para mejorar la eficiencia del proceso. Se ha encontrado que pequeñas variaciones en la composición del disolvente producen una mejora en la eficacia de la extracción.

### **1.3.2. Volumen de Extractante**

En algunos casos el volumen del disolvente puede ser un parámetro importante para mejorar la eficacia de la extracción. Dicho volumen debe ser suficiente como para que toda la muestra se encuentre inmersa en el mismo. La cantidad de disolvente necesaria para la extracción está comprendida, generalmente, entre 10 y 30 mL.

### **1.3.3. Temperatura**

La temperatura, probablemente el parámetro más estudiado, es un factor fundamental en el proceso de extracción por microondas. Valores elevados de la misma generalmente aumentan la eficiencia de la extracción, bien como resultado de un aumento de la difusión del disolvente en el interior de la matriz, bien debido a la desorción de los analitos de los sitios activos de la

misma.

Cuando la extracción por microondas es llevada a cabo en sistemas cerrados, la temperatura puede superar la temperatura de ebullición del disolvente, lo que produce una mejora en la eficacia de la extracción. Además, al aumentar la temperatura, el disolvente tiene mayor capacidad para solubilizar los analitos, la tensión superficial y la viscosidad del disolvente disminuyen, lo que mejora la penetración del mismo en la matriz de la muestra.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a temperaturas elevadas, también pueden ser extraídas sustancias no deseadas, por lo que se pierde selectividad en la extracción. Además, hay que considerar la posible degradación de los analitos a altas temperaturas.

#### 1.3.4. Potencia

En los sistemas cerrados la potencia es también una variable importante, pero ésta es función de la temperatura. Por lo general, es este el parámetro que se investiga.

La potencia elegida, en los sistemas de vasos cerrados, depende del número de vasos utilizados durante el proceso. Hay que tener en cuenta que algunos sistemas permiten realizar la extracción de 12 muestras simultáneamente. Para evitar la posible degradación de algunos compuestos y una presión elevada en el interior de los vasos, esta potencia debe ser elegida cuidadosamente. La influencia de la potencia en la extracción está relacionada con el tiempo de extracción por microondas.

### **1.3.5. Tiempo de Extracción**

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es otro parámetro que influye en la misma y que necesita ser considerado. En MAE, los tiempos de extracción son mucho más cortos que los necesarios en las técnicas convencionales. A menudo 10 minutos son suficientes, como se ha demostrado para la extracción de contaminantes orgánicos.

### **1.3.6. Naturaleza de la Matriz**

La naturaleza de la matriz en la que se encuentran enlazados los analitos de interés tiene una profunda influencia sobre la extracción de los mismos. Las diferentes interacciones que los contaminantes orgánicos presentan con los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz pueden jugar un papel importante en su solubilidad y en la difusión de los mismos en el disolvente.

El contenido en materia orgánica inhibe la extracción debido a la fuerte interacción que se establece entre el analito y la matriz, lo que dificulta su ruptura.

Por esta misma razón, bajo las mismas condiciones, resulta más fácil la extracción de los contaminantes en muestras enriquecidas que la de los contaminantes nativos de las mismas.

En la mayoría de los casos, se obtienen mayores recuperaciones para muestras enriquecidas que para los contaminantes nativos, demostrando el efecto de la fuerte interacción de la matriz con estos contaminantes nativos en función del tiempo de contacto. Este hecho también explica la disminución de

la recuperación en la extracción en muestras envejecidas.

Esto puede ser explicado teniendo en cuenta el tiempo que el analito ha estado en contacto con la muestra, y si éste es incorporado solo por adsorción superficial, donde la formación de enlaces de hidrógeno y las interacciones por fuerzas de Van der Waals son los procesos predominantes, o está fuertemente ligado a la materia orgánica de la matriz de la muestra debido a mecanismos de transporte por difusión. En un estudio realizado por López Ávila et al. (28) sobre muestras enriquecidas, los porcentajes de recuperación de algunos pesticidas organoclorados disminuían desde un 80-120 % hasta un 50-60 % después de 24 horas, mientras que los porcentajes de recuperación de pesticidas organofosforados prácticamente no variaban después de un periodo de envejecimiento de tres semanas.

### **1.3.7. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas**

Las aplicaciones de la MAE se centran principalmente en la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Aunque las primeras aplicaciones estuvieron relacionadas con la determinación de PAHs y PCBs en suelos y sedimentos, desde entonces, otros compuestos tales como pesticidas, fenoles y compuestos organometálicos han sido extraídos eficazmente.

La extracción asistida por microondas representa una alternativa viable a las técnicas de extracción convencionales, ya que la eficacia conseguida por esta técnica es comparable a las obtenidas con otras (25; 26).

Con respecto a las técnicas convencionales, la MAE presenta una gran reducción del tiempo de análisis y de consumo de disolvente, así como la posibilidad de realizar extracciones simultáneas con reproducibilidades aceptables (ver Tabla 1.3).

	<b>Extracción</b>	<b>Sonicación</b>	<b>SFE</b>	<b>MAE</b>
	<b>Soxhlet</b>			
TIEMPO DE EXTRACCIÓN	De 24 a a 48 horas	De 30 a 60 min	De 30 a 60 min	De 20 a 30 min
EXTRACTANTE	Disolventes orgánicos	Disolventes orgánicos	Disolventes supercríticos	Disolventes orgánicos
COSTO	Bajo	Bajo	Alto	Moderado
DESVENTAJAS	Se utilizan grandes cantidades de disolventes y es necesario evaporar el extracto	Se utilizan grandes cantidades de disolventes y se requiere filtración	Cantidad limitada de la muestra y dependencia del tipo de matriz y analito	Se requiere tratamiento previo de la muestra

**Tabla 1.3:** Características de las principales técnicas de extracción

### **1.3.8. Extracción asistida por microondas utilizando surfactantes**

Una nueva posibilidad de aplicación de MAE es el uso de medios micelares como extractantes, es decir, la extracción asistida por microondas con utilización de medios micelares, MAME.

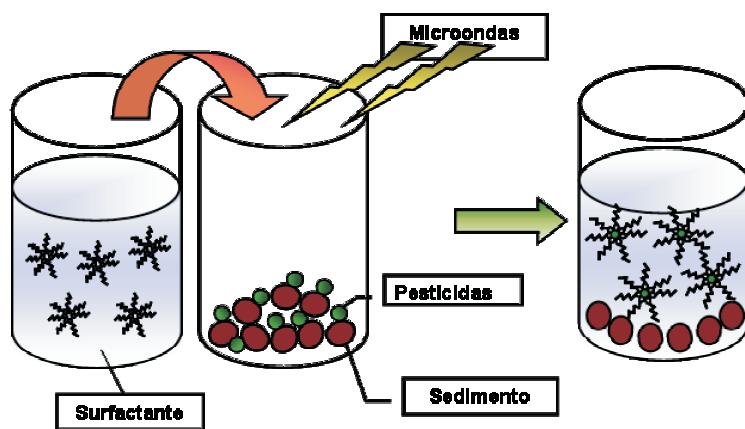
Los medios micelares pueden ser aplicados para la solubilización, extracción y preconcentración de diferentes compuestos presentes en diferentes muestras medioambientales, tales como suelos y sedimentos, con los beneficios que aporta la utilización de los mismos, como son bajo coste, fácil manipulación y reducción de los efectos tóxicos respecto al uso de disolventes orgánicos (29; 30).

Los surfactantes no iónicos pueden ser efectivos en la solubilización y extracción de compuestos orgánicos desde matrices sólidas. Además, la disolución de surfactante es compatible con las fases móviles hidroorgánicas usualmente empleadas en cromatografía líquida de alta resolución, que suele utilizarse como técnica final de análisis.

En la Figura 1.5 se representa esquemáticamente el proceso de extracción por microondas utilizando surfactantes.

## **1.4. Objetivos del Trabajo**

La búsqueda de nuevos métodos de análisis, que permitan mejorar la sensibilidad, selectividad, rapidez y coste de los ya existentes, ha sido siempre el



**Figura 1.5:** Representación del proceso de extracción por microondas con utilización de surfactantes

objetivo de todo nuevo proceso analítico. En este trabajo se ha planteado, como objetivo general, el desarrollo de nuevos métodos de extracción y determinación de pesticidas organoclorados presentes en muestras medioambientales de diferente naturaleza, utilizando medios micelares como extractantes.

Entre otras ventajas, respecto a los métodos convencionales, se pretende conseguir una reducción considerable en el tiempo empleado en el análisis de las muestras y la sustitución de los disolventes orgánicos por otros extractantes, los surfactantes, menos agresivos con el medioambiente y de menor coste. Para optimizar este método de extracción se ha utilizado un diseño experimental para 4 surfactantes diferentes (todos ellos de la familia de los Polioxietileno) y seis pesticidas distintos (cuatro derivados de DDT, aldrín y dieldrín).

# Parte Experimental

---

## 2.1. Aparatos Utilizados

### 2.1.1. Cromatografo Líquido de Alta Resolución



Para la determinación cromatográfica se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Varian (Varian Ibérica, S.L. Madrid, España).

**Figura 2.1:** Cromatografo

Este sistema está compuestos por una bomba Varian 240 acoplada a un automuestreador Varian 410 con selector de volumen de inyección, un módulo Horne de Columna Varian (modelo 500) y un detector ultravioleta-visible de diodos, también de Varian. La columna utilizada fue una Varian Microsorb-MV C<sub>18</sub>, 250 x 4.6 mm (con relleno de partículas de 8 μm). El software

utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue Star de Varian.

### **2.1.2. Microondas**



**Figura 2.2:** Microondas

El equipo de extracción consistió en un sistema de digestión por microondas modelo Multiwave B30MC06A, de la marca Anton Paar (Graz, Austria). Este microondas permite el control de tiempo y potencia.

Está equipado con rotor 6EVAP, con una frecuencia de 2450 MHz a potencia total, con 6 vasos de PFA, modelo MF100, para un volumen máximo de 50 ml.

### **2.1.3. Tratamiento Estadístico**

El diseño experimental utilizado en este estudio se realizó usando el Software Statgraphics Plus, versión 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, USA). Para el tratamiento estadístico de los datos se hizo uso del SPSS 11.0 (SPSS Inc., Illinois, USA), con el que se calcularon las correlaciones parciales y bivariadas.

## 2.2. Reactivos

Los pesticidas organoclorados utilizados en este trabajo, indicados en la Tabla 1.1, son de la marca Cerrilliant Corporation y fueron adquiridos en LGC Promochem (Barcelona, España). El metanol utilizado para preparar las disoluciones, así como la fase móvil, fue de la marca Panreac (Barcelona, España). El agua utilizada (agua Milli-Q), tanto para la preparación de las disoluciones de surfactante como para la preparación de fase móvil, se obtiene de un sistema de purificación de la marca Millipore (MA, EEUU).

Los surfactantes polioxietilénicos, polioxietilen 10 lauril éter, polioxietilen 10 stearil éter, polioxietilen 10 cetil éter y polioxietilen 10 tridecil éter son de la marca Sigma (suministrados por Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La muestra de suelo certificada conteniendo pesticidas organoclorados (CRM804-050), de la marca Resource Technology Corporation fue suministrada por LGC Promochem. La concentración de los pesticidas fue certificada mediante los métodos: USEPA SW846 (3rd edition), Método de Extracción 3540A/3541 (Soxhlet), 3550 (sonication) and Método de Análisis 8081 (31).

Para la determinación del contenido en materia orgánica de los suelos se utilizó ácido sulfúrico del 96 % riqueza, dicromato potásico y sal de Mohr (sulfato de amonio de hierro II hexahidratado), de calidad “pro-análisis” de la marca Panreac.

## **2.3. Disoluciones**

Las disoluciones patrón de los pesticidas se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de cada uno de ellos en metanol para conseguir una concentración de partida de  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y, por dilución de éstas, otras de menor concentración.

Las disoluciones de los surfactantes se obtuvieron por dilución de éstos en agua Milli-Q hasta conseguir una concentración final de 10 % (v/v). Las disoluciones de concentración inferior se preparaban por dilución de las anteriores.

## **2.4. Procedimientos Analíticos**

### **2.4.1. Análisis Cromatográfico**

El análisis de los extractos de las muestras fue llevado a cabo usando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector ultravioleta-visible (32). La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se realizó inyectando  $30\ \mu\text{l}$  de extracto en el sistema cromatográfico. Se midió la absorbancia de cada analito a su longitud de onda máxima. Se determinó el tiempo de retención y la longitud de onda óptima de cada compuesto (apartado 3.2.1, Tabla 3.5). El eluyente usado para la separación de los seis pesticidas organoclorados fue Metanol–Agua (85:15) a flujo isocrático  $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se obtuvo una relación lineal entre las áreas de pico y la concentración de

analito en el rango comprendido entre 100-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , con altos coeficientes de correlación ( $\geq 0.995$ ).

#### **2.4.2. Mezclas de Surfactantes**

Los surfactantes usados en este estudio fueron:

- Polioxietilen 10 lauril ether (POLE)
- Polioxietilen 10 stearil ether
- Polioxietilen 10 cetil ether
- Polioxietilen 10 tridecil ether

Debido a la baja solubilización en agua de algunos de ellos a temperatura ambiente fue necesaria la realización de mezclas de surfactantes. La mezclas que se utilizaron para la optimización del método fueron:

- 70 % POLE + 30 % polioxietilen 10 stearil ether (mezcla stearil)
- 70 % POLE + 30 % polioxietilen 10 cetil ether (mezcla cetil)
- 70 % POLE + 30 % polioxietilen 10 tridecil ether (mezcla tridecil)

A su vez también se realizó la optimización de la extracción para el POLE solo, el cual si es soluble en agua a temperatura ambiente.

### **2.4.3. Extracción por Microondas**

La muestra de 2 g de suelo, previamente acondicionada, se depositó en el vaso de extracción y se le añadió al volumen optimizado de la disolución de surfactante.



Después de cerrados, los tubos se introdujeron en el microondas y se les aplicó la potencia y tiempo previamente establecidos para realizar el proceso de extracción. Una vez fuera del microondas, y antes de abrirlos, los vasos se dejan durante un tiempo mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, para que se enfríen y evitar pérdidas por evaporación. Se recoge todo el líquido sobrenadante que es filtrado mediante filtros de jeringa marca Millipore de  $0.45 \mu\text{m}$  de poro y 25 mm de diámetro, antes de ser inyectado en el sistema cromatográfico.

**Figura 2.3:**  
Vaso Microondas

### **2.4.4. Acondicionamiento de las muestras de suelo**

Las muestras de suelo procedentes de distintas zonas agrícolas de la isla de Gran Canaria, una vez recogidas, se dejaron secar al aire durante al menos dos semanas. Tras el secado se tamizaron, recogiéndose la fracción de

correspondiente a un tamaño inferior a 0.30 mm.

Se pesaron 2 g de suelo y se llevaron a unos botes de cristal ambar, se les añadió el volumen necesario de la disolución que contenía la mezcla de pesticidas y se dejaron al aire a temperatura ambiente. Estas muestras se utilizaron 24 horas después del acondicionamiento.

Para muestras envejecidas realizamos el mismo proceso, pero se guardaron en oscuridad y cerrados durante el tiempo necesario (2 semanas en un caso y 2 meses en otro). Después de este tiempo de acondicionamiento, se determinó el contenido de los analitos presentes en el suelo.

#### 2.4.5. Características de los suelos

Suelo	Uso	Contenido Arcilla (%)	pH	Cont.	Conduct.
	Agrícola			MO (%)	( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
TAFIRA	Jardín	23.8	8.3	4.8	292
SAN ROQUE	Platanera	14.6	7.86	12.54	3266
STA BRÍGIDA	Pinar	12.8	5.9	3.9	483
VALLESECO I	Papas	32.06	4.84	4.4	202
VALLES. II	Papas	47.29	3.91	6.21	100

**Tabla 2.1:** Características de los suelos estudiados

**Determinación del contenido en Materia Orgánica**

Los métodos que se utilizan en la actualidad para la determinación de este parámetro se basan todos en la oxidación de la materia orgánica del suelo por vía húmeda con dicromato potásico y ácido sulfúrico. Por su amplitud de aplicación en las condiciones más variadas, el método de Sauerlandt (33) fue el método utilizado para determinar el contenido de carbono en las muestras de suelo estudiadas.

Se tomó 1 gramo de cada una de las tierras, después de dejarlas secar a temperatura ambiente. Tras tamizarla, la muestra de suelo tenía un tamaño de grano inferior a 0.3 mm. Se introdujeron en un vaso de precipitado de 250 mL y se añadieron 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se dejó en contacto con el ácido de 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió, lentamente, agitando y enfriando bajo el grifo, 25 mL de una disolución 2 N de dicromato potásico. A continuación se calentó durante hora y media la mezcla a una temperatura de 125°C. Después de refrigerar la disolución, se enrasó en un matraz a 250 mL con agua destilada agitando convenientemente. Se tomaron 10 mL de esta disolución y se pasaron a un erlenmeyer; se añadieron 100 mL de agua destilada, 3 gotas de ácido fosfórico y 5 gotas de disolución de difenilamina. Posteriormente se valoró con sal de Mohr 0,2 N el exceso de dicromato potásico que no reaccionó con la materia orgánica.

Para determinar el contenido de carbono hay que tener en cuenta que 1 miliequivalente de dicromato potásico equivale a 3 miligramos de car-

bono. Los resultados obtenidos para los tres tipos de suelo se muestran en la Tabla 2.1.

### Determinación del pH

Debido a la naturaleza sólida de la matriz, el pH del suelo es el que se obtiene potenciométricamente en la suspensión obtenida por agitación del suelo con agua. El tiempo de agitación y de decantación elegido debe ser suficiente para asegurar que el suelo en suspensión haya alcanzado el equilibrio químico con la fase líquida cuando se realice la lectura del pH. Al ser suelos orgánicos se tomaron 5 g de tierra con 20 mL de agua destilada; agitamos durante 1 minuto y dejamos decantar durante media hora (34). Los pH medidos se muestran en la Tabla 2.1.

### Granulometría – Determinación del Tamaño de Grano

El conocimiento de la composición granulométrica del suelo es fundamental en nuestro estudio, puesto que la distribución de las partículas del suelo en función de su tamaño tiene una gran influencia en el comportamiento físico y químico de los contaminantes. Para determinar el tamaño de grano de las muestras de suelo se tamizaron cada una de ellas con tamices de alambre de tamaños comprendidos entre 0.3 y 0.1 mm. Después de desechar las fracciones superiores a 0.3 mm se obtuvo la distribución granulométrica que se recoge en la Tabla 2.2.

<b>Suelo</b>	<b>Tamaño de Grano ( %)</b>			
	<b>0.3 mm</b>	<b>0.2 mm</b>	<b>0.15 mm</b>	<b><math>\leq 0.1\text{mm}</math></b>
TAFIRA	44.4	17.2	14.6	23.8
SAN ROQUE	52.1	20.0	13.2	14.6
STA BRÍGIDA	56.5	17.8	12.8	12.8
VALLESECO I	36.33	16.43	15.19	32.06
VALLES. II	25.16	13.17	14.38	47.29

**Tabla 2.2:** Composición granulométrica de los suelos

### Determinación de la Conductimetría

El análisis conductimétrico de las muestras se realizó de una manera equivalente a las medidas de pH, siguiendo el mismo procedimiento que se recoge en el apartado anterior. Los resultados obtenidos para cada una de las tierras se recogen en la Tabla 2.1.

## Resultados y Discusión

---

En el desarrollo de nuevos métodos analíticos es importante establecer aquellos valores de las variables experimentales que puedan influir en la señal a medir. En este sentido, una parte importante de los estudios a desarrollar se han dirigido a la optimización de estos factores. Cuando se utiliza la metodología de extracción asistida por microondas (MAE) los factores principales que deben tenerse en cuenta a la hora de optimizar dicho método son aquellos que pueden tener alguna influencia, no solo sobre los analitos en estudio, sino también sobre la matriz en la que se encuentran y sobre el extractante utilizado en el proceso.

La optimización de la metodología MAME se ha realizado para una mezcla de seis pesticidas organoclorados con 4 tipos de surfactantes diferentes.

Se estudiaron los siguientes factores:

- Volumen de surfactante
- Concentración de surfactante

- Potencia de irradiación
- Tiempo de irradiación

En las estrategias tradicionales, para alcanzar las condiciones óptimas de trabajo solo se cambia una variable cada vez, mientras permanecen constantes el resto de los factores. Esta aproximación requiere un gran número de experiencias, y no permite el análisis de los cambios en algunas de las respuestas que pueden tener lugar cuando dos o más factores se modifican simultáneamente. El diseño experimental constituye una alternativa a estas estrategias, permitiendo que se puedan variar simultáneamente los factores a la vez que se estudian sus efectos (35).

### **3.1. Optimización de la extracción MAME**

La optimización de los factores antes señalados se llevó a cabo con una tierra agrícola procedente de Valleseco (Gran Canaria) para el caso de la mezcla cetil y stearil, y una tierra de Tafira (Gran Canaria) para el caso de la mezcla tridecil y POLE. Se utilizaron 2 g de tierra con un tamaño de grano inferior a 0.30 mm. Para la optimización de todas las variables se utilizó un diseño experimental de tipo factorial en varias fases (27). La primera fase consistió en un diseño factorial  $2^4$  (siendo 4 el número de variables a optimizar) el cual permite obtener la influencia que tiene cada variable en la recuperación y las posibles interacciones existentes entre las variables.

Muestra	Potencia (W)	Tiempo (min)	Volumen Surfactante (ml)	Concentración Surfactan. (%)
1	100	14	5	1
2	800	2	15	5
3	100	2	5	5
4	800	14	15	1
5	800	14	5	5
6	100	2	15	1
7	800	2	5	1
8	100	14	15	5
9	100	2	15	5
10	100	2	5	1
11	800	14	15	5
12	800	2	5	5
13	100	14	15	1
14	800	14	5	1
15	100	14	5	5
16	800	2	15	1

**Tabla 3.1:** Diseño Experimental Inicial

Con este diseño se obtiene un total de 16 posibles ensayos. Los parámetros utilizados y sus valores se recogen en la Tabla 3.1.

El diseño se realizó de tal forma que las muestras se analizan de manera aleatoria para evitar la influencia de variables ocultas. En todos los casos las muestras se realizaron por duplicado.

Con este diseño lo que se obtiene es una tabla de correlaciones, donde se observan las correlaciones de cada variable con la recuperación (correlación parcial) y las correlaciones de las variables entre sí (correlación bivariada).

Para el caso de la mezcla cetil las correlaciones indicaron que la variable que más influye en la recuperación para la mayoría de los compuestos, es la concentración de surfactante, que el volumen prácticamente no influye en la recuperación y las variables más relacionadas entre sí son la potencia y la concentración (ver Tabla 3.2). Para el resto de los surfactantes las correlaciones obtenidas en todos los casos indicaron lo mismo.

	<b>4,4'-DDD</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>4,4'-DDT</b>	<b>2,4'-DDT</b>	<b>4,4'-DDE</b>	<b>Aldrin</b>
POTENCIA	0.245	0.331	0.239	0.05	0.366	0.322
TIEMPO	-0.008	0.403	-0.006	-0.055	0.249	0.201
VOL.SURF	-0.091	-0.069	-0.246	-0.336	-0.090	-0.808
CON.SURF	0.587	0.197	0.599	0.595	0.538	0.248
PT x CON	-0.1832	-0.1474	-0.1838	-0.0371	-0.2504	-0.2429
TP x CON	0.0056	-0.0088	-0.0048	0.0408	-0.1638	0.0980
PT x TP	0.0019	-0.0717	0.0016	0.0028	-0.1009	0.0842

**Tabla 3.2:** Correlaciones entre variables

### 3.1.1. Efecto del Volumen de Surfactante

El volumen de surfactante, a pesar de haber sido incluido en el diseño experimental inicial, obteniéndose que esta variable no afectaba a la recuperación, hay que estudiarlo de manera independiente, ya que es un factor influenciado a su vez por otras variables.

En un estudio posterior al diseño experimental se analizaron cómo diferentes volúmenes de surfactantes podían afectar a la recuperación. Para este estudio se tomaron: 5, 7, 8 y 10 ml de surfactante.

Los resultados indicaron que volúmenes inferiores a 7 ml no son suficientes para impregnar de manera homogénea la muestra (2 g de tierra) y que el intercambio de analitos entre la matriz y el surfactante se produjese de una manera eficiente, y volúmenes superiores a 10 ml provocaban un indeseable aumento de la temperatura cuando era sometido a la radiación microondas.

Por ello, al tratarse de un intervalo de estudio muy estrecho (7-10 ml) se fijó un volumen intermedio para todo el proceso de optimización: 8 ml.

### 3.1.2. Efecto de la Concentración de Surfactante

La eficiencia del surfactante para extraer los analitos presentes en las muestras de suelo dependerá, entre otros factores, del número de micelas presentes en la disolución del mismo, es decir, de la concentración del surfactante.

En el diseño experimental inicial se obtuvo que la variable que más influencia tiene en la recuperación es la concentración de surfactante, y que

a su vez, esta variable está relacionada con la potencia del microondas (ver Tabla 3.2), por tanto, para obtener el valor de concentración óptima de surfactante será necesario aplicar un diseño factorial  $3^2$  con duplicado en el punto central, donde 2 es el número de variables, en este caso representa la concentración y la potencia.

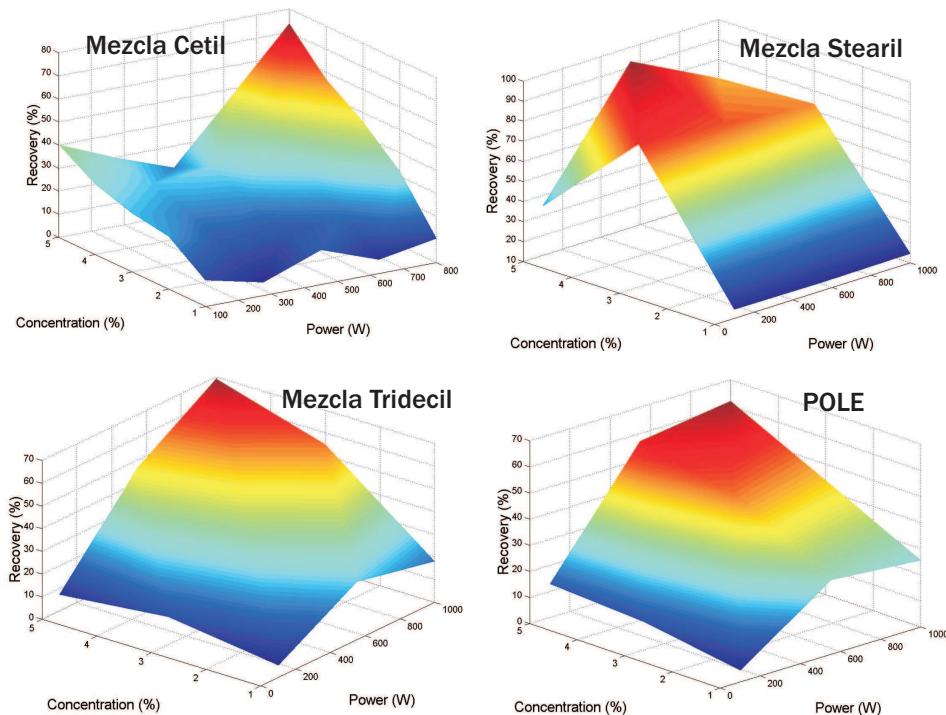
El diseño experimental estudiado para la mezcla de surfactante stearil consistió en un diseño de 10 muestras, con el que se obtuvo una superficie de respuesta con la cual poder calcular el máximo de la variable (ver Tabla 3.3).

Para el resto de los surfactantes el diseño factorial fue similar.

Muestra	Potencia (W)	Concentración Surfac. (%)
1	100	5
2	1000	5
3	100	1
4	1000	1
5	550	3
6	550	5
7	1000	3
8	100	3
9	550	1
10	550	3

**Tabla 3.3:** Parámetros superficie de respuesta potencia-concentración surfactante

La Figura 3.1 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para concentraciones de surfactantes comprendidas entre 1 y 5 % (v/v) y potencias entre 100 y 1000 vatios para todos los surfactantes estudiados. En las gráficas se ha representado en todos los casos el mismo analito (4,4'-DDT), pero todos presentan una tendencia similar.



**Figura 3.1:** Superficies de respuesta potencia-concentración para los surfactantes estudiados

El resultado obtenido fue el mismo para todos los surfactantes, la concentración óptima de surfactante es 5 % (v/v) (ver Figura 3.1).

### **3.1.3. Potencia y Tiempo de irradiación**

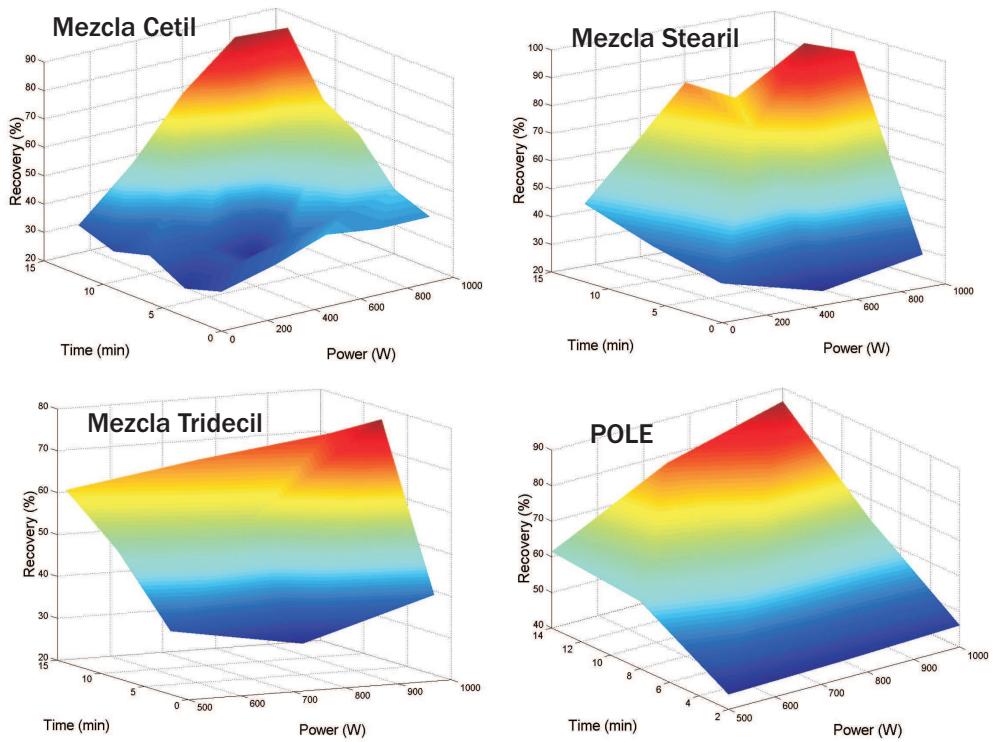
A pesar de que en el diseño experimental inicial no se observa una clara relación entre las variables potencia y tiempo, debido a la influencia que producen ambos en la temperatura (variable secundaria no considerada en el diseño pero que sí ha sido controlada a lo largo de todo el estudio) se consideró necesario incluirlas a ambas en un diseño factorial  $3^2$  de tal forma que pudiesemos optimizar ambas variables conjuntamente.

Muestra	Potencia (W)	Tiempo (min)
1	1000	8
2	1000	2
3	1000	14
4	500	2
5	750	14
6	750	8
7	500	14
8	750	2
9	750	8
10	500	8

**Tabla 3.4:** Parámetros superficie de respuesta potencia-tiempo

El diseño experimental estudiado para la mezcla de surfactante tridecil viene representado en la Tabla 3.4. Para el resto de los surfactantes el diseño

factorial fue similar.



**Figura 3.2:** Superficies de respuesta potencia-tiempo para los surfactantes estudiados

La Figura 3.2 muestra los valores óptimos de potencia y tiempo para cada surfactante. En las gráficas se ha representado en todos los casos el mismo analito (4,4'-DDT), pero todos presentan una tendencia similar.

Estos valores óptimos para cada surfactante son:

- *Mezcla Cetil*: 750 W - 14 minutos
- *Mezcla Stearil*: 775 W - 8 minutos

- *Mezcla Tridecil*: 1000 W - 8 minutos
- *POLE*: 1000 W - 14 minutos

## **3.2. Parámetros analíticos y validación**

### **3.2.1. Análisis Cromatográfico**

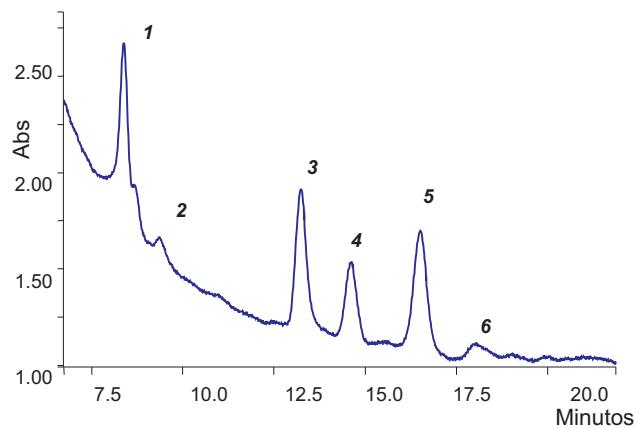
El análisis de las muestras extraídas se realizó usando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección ultravioleta-visible (32).

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando 30  $\mu\text{l}$  de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la máxima absorbancia. El tiempo de retención y la longitud de onda para cada compuesto se enumeran en la Tabla 3.5.

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas utilizando la mezcla cetil como extractante, se muestra en la Figura 3.3. Se puede observar que la fase móvil usada permite una buena separación de los analitos con cortos tiempo de análisis. Los cromatogramas obtenidos para el resto de surfactantes fueron similares. En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Además, la señal del surfactante aparece en los primeros 5 minutos de cromatograma, por lo que no interfiere en los picos de interés.

Nº	Compuesto	$\lambda$ (nm)	$T_R$ (min)
1	4,4'-DDD	238	8.4
2	Dieldrín	220	9.5
3	4,4'-DDT	238	13.3
4	2,4'-DDT	238	14.7
5	4,4'-DDE	238	16.6
6	Aldrín	220	18.1

**Tabla 3.5:** Lista de pesticidas organoclorados, longitudes de onda y tiempos de retención



**Figura 3.3:** Cromatograma del extracto de muestras de suelo de Valleseco utilizando mezcla cetil como surfactante

### **3.2.2. Parámetros Analíticos**

Para determinar la precisión del método de extracción propuesto se realizó un estudio estadístico del mismo con seis muestras de suelo de Valleseco para el caso de la mezcla cetil y stearil y de Tafira para el caso de la mezcla tridecil y POLE. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de seis pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización.

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo de extracción asistida por microondas, con los cuatro surfactantes estudiados, y a la posterior separación y determinación por HPLC con detección UV.

<b>Analito</b>	<b>Desviación Estándard Relativa ( %)</b>			
	<b>Mezcla Cetil</b>	<b>Mez. Stearyl</b>	<b>Mez. Tridecil</b>	<b>POLE</b>
4,4'-DDD	8.43	9.66	6.07	7.43
Dieldrín	7.09	9.73	4.10	5.51
4,4'-DDT	6.53	5.22	7.22	7.28
2,4'-DDT	5.18	7.5	8.78	8.42
4,4'-DDE	7.45	8.25	6.41	7.94
Aldrín	5.38	9.08	8.55	9.18

**Tabla 3.6:** Valores de desviación estándard relativa (%) obtenida para la mezcla de seis pesticidas tras aplicar MAME

A estas muestras se les calcularon las desviaciones estándares relativas obtenidas para todos los compuestos con cada uno de los surfactantes

(Tabla 3.6) y los límites de detección (Tabla 3.7). Los límites de detección se calcularon como 3 veces la concentración correspondiente a la señal del ruido para cada pesticida (36), y varía entre 20 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para todos los compuestos estudiados.

Analito	Límites de Detección ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	Mezcla Cetil	Mez. Stearil	Mez. Tridecil	POLE	
4,4'-DDD	27	67	25	16	
Dieldrín	198	183	173	62	
4,4'-DDT	41	43	51	42	
2,4'-DDT	21	71	54	20	
4,4'-DDE	33	37	23	17	
Aldrín	201	148	149	128	

**Tabla 3.7:** Límites de detección obtenidos para la mezcla de seis pesticidas  
tras aplicar MAME

### 3.2.3. Validación del método con una muestra de suelo certificada

Algunos autores consideran que las recuperaciones obtenidas con muestras enriquecidas no son comparables a las obtenidas con muestras reales debido a los procesos e interacciones que tienen lugar en este tipo de muestras (37).

Los analitos añadidos son ligeramente retenidos en la superficie de la ma-

triz, mientras que los contaminantes nativos son más fuertemente retenidos en el interior de los poros de la matriz. Por ello, los resultados obtenidos en la eficiencia de la extracción en muestras acondicionadas pueden ser sobreestimados. Esta es la razón por la que es importante validar el proceso de extracción desarrollado aplicándolo a un material certificado.

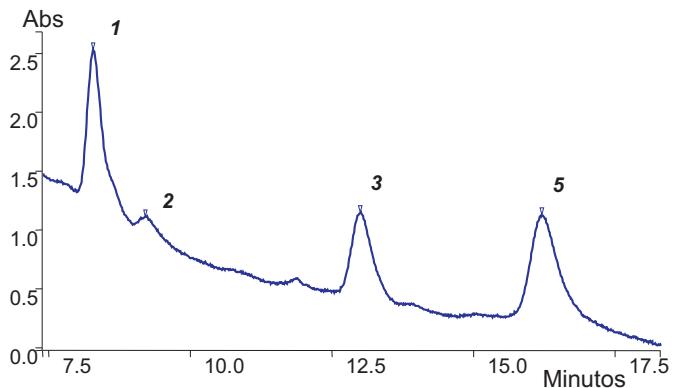
Con este fin, se adquirió un material de referencia certificado conteniendo cuatro de los pesticidas estudiados (CRM804-050). La muestra de suelo procede de una región agrícola al Oeste de los Estados Unidos. Las concentraciones de cada uno de los pesticidas fue certificada mediante USEPA SW846 (3rd edición), método de extracción 3540A/3541 (soxhlet), 3550 (sonicación) y método de análisis 8041 (31).

La Tabla 3.8 muestra los pesticidas presentes en la muestra, los valores de concentración medios certificados, la desviación estándar relativa de estas concentraciones, los intervalos de confianza para cada uno de los compuestos y los intervalos de predicción.

	<b>Valor Refer.</b> <b>Compuesto</b>	<b>SD</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	<b>Int. Confianza</b> ( $\mu\text{g/g}$ )	<b>Int. Predicción</b> ( $\mu\text{g/g}$ )
4,4'-DDD	1.531	0.476	1.294-1.767	0.499-2.562
Dieldrín	1.863	0.655	1.539-2.186	0.437-3.288
4,4'-DDT	1.060	0.275	0.926-1.195	0.465-1.655
4,4'-DDE	1.520	0.410	1.325-1.715	0.633-2.407

**Tabla 3.8:** Datos del material certificado CRM804-050

En la Figura 3.4 se muestra el cromatograma obtenido a partir de un extracto de este material certificado después de aplicar la extracción asistida por microondas a una muestra del mismo, utilizando POLE como extractante.



**Figura 3.4:** Cromatograma del extracto obtenido del material certificado

En la Tabla 3.9 se muestran las concentraciones obtenidas de los pesticidas al aplicar MAME al material certificado con cada uno de los surfactantes estudiados junto con el valor de desviación estándar de cada valor. Se utilizaron dos gramos de muestra y se les aplicó las condiciones optimizadas de potencia y tiempo para cada surfactante. Como se puede observar, las concentraciones obtenidas están, para todos los surfactantes, dentro del intervalo de confianza esperado, salvo para la mezcla tridecil en la que las concentraciones obtenidas se encuentran dentro del intervalo de predicción dado, indicando que el procedimiento de extracción propuesto es válido para este tipo de matriz.

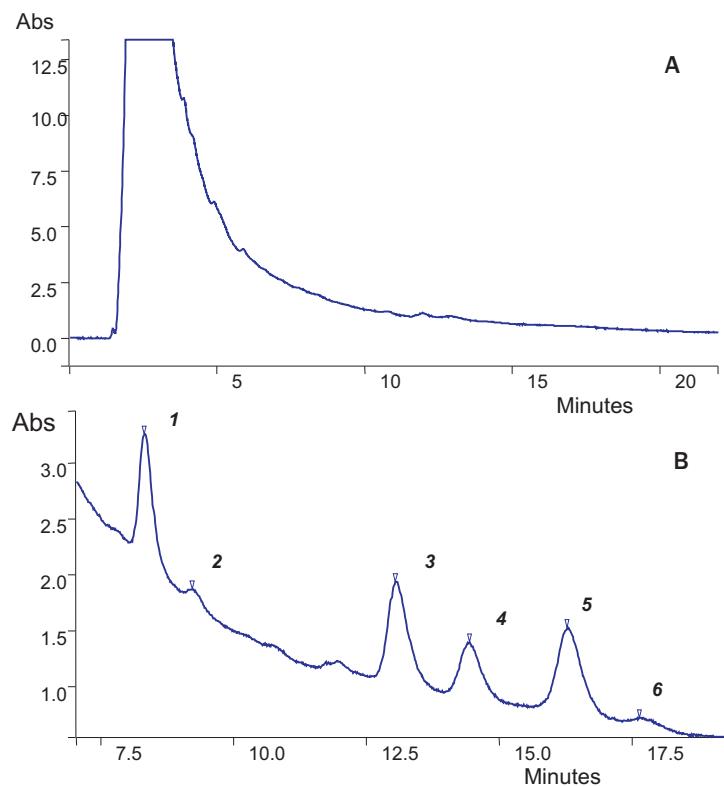
Comp.	Concentración Encontrada ( $\mu\text{g/g}$ )				
	Mezcla Cetil	Mez. Stearil	Mez. Tridecil	POLE	
4,4'-DDD	1.582±0.163	1.733±0.009	1.275±0.010	1.363±0.040	
Dieldrín	1.862±0.092	2.242±0.084	1.792±0.040	1.546±0.112	
4,4'-DDT	0.917±0.067	1.079±0.015	0.794±0.019	0.840±0.010	
4,4'-DDE	1.099±0.118	1.502±0.022	1.114±0.040	1.323±0.059	

**Tabla 3.9:** Extracción de pesticidas usando MAME del material certificado CRM804-050

### **3.3. Aplicación de MAME a diferentes muestras de suelos**

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción por microondas y validar el método con una muestra certificada, diferentes muestras de suelos fueron sometidas a las condiciones óptimas para cada surfactante. Estos suelos proceden de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria y presentan características diferentes: tamaño de grano, porcentaje de materia orgánica, conductividad y pH, descritas previamente en la Tabla 2.1 en el apartado 2.4.5. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 2.4.4, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados. En la Figura 3.5 se muestran los cromatogramas de los extractos de muestras de suelo de Tafira sin acondicionar y acondicionada con la mezcla de pesticidas usando POLE como extractante. En la Figura 3.5.a puede

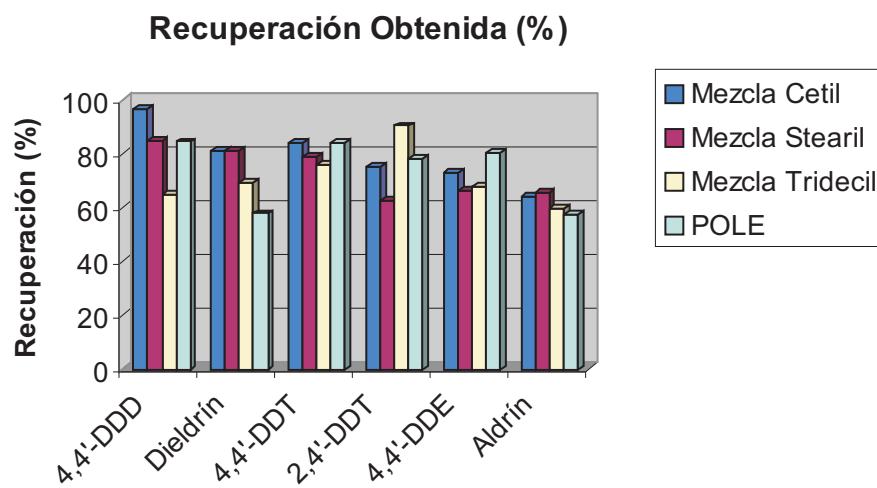
observarse la intensa señal que producen los componentes polares de la tierra, a pesar de su intensidad, al aparecer al principio del cromatograma no interfiere con los picos de interés. A su vez en esta misma figura aparece un pico poco intenso a los 11.7 min, pero no interfiere con ninguno de los compuestos estudiados. En la Figura 3.5.b se ha cortado la señal inicial para poder observar mejor los picos.



**Figura 3.5:** Cromatogramas de los extractos sin acondicionar (a) y acondicionada (b) con pesticidas

Las recuperaciones obtenidas utilizando la tierra de Sta Brígida para los

cuatro surfactantes se muestran en la Figura 3.6. En dicha tabla se puede observar que, en general, las recuperaciones son buenas para todos los surfactantes.

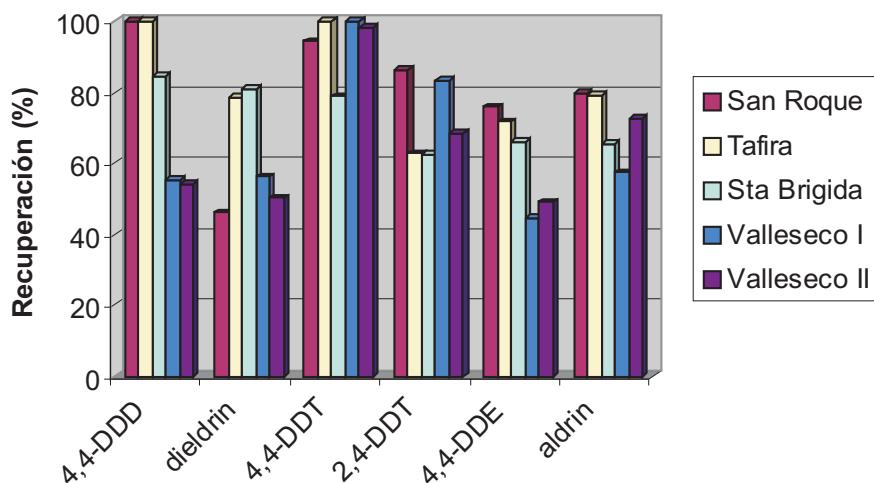


**Figura 3.6:** Recuperación obtenida con la tierra de Sta Brígida para los cuatro surfactantes

### 3.3.1. Influencia de las características de la matriz

Con el fin de estudiar la influencia de las características del suelo en el proceso de extracción se aplicó el procedimiento MAME a distintas tierras con diferente contenido en materia orgánica, pH, granulometría y conductividad (ver Tabla 2.1). El método optimizado fue usado para determinar la extracción de los pesticidas organoclorados desde cinco tipos distintos de suelos agrícolas acondicionados previamente con la mezcla de pesticidas. La

concentración añadida para el acondicionamiento se escogió entre los niveles típicos de pesticidas que pueden ocurrir en suelos contaminados (6; 38). El suelo fue acondicionado y dejado en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas antes del análisis. Los resultados obtenidos para el surfactante mezcla stearil se muestran en la Figura 3.7, donde puede observarse que las recuperaciones varían en función del tipo de suelo.



**Figura 3.7:** Recuperaciones obtenidas con las distintas tierras usando mezcla stearil como extractante

Las tierras con alto contenido en materia orgánica (San Roque) tiene buenas recuperaciones (ver Figura 3.7) debido a que el surfactante puede también extraer sustancias húmicas, las cuales pueden estar asociadas químicamente a los pesticidas (39). Estas recuperaciones pueden disminuir cuando las temperaturas son muy altas debido a la degradación de la materia orgánica, este

fenómeno se observó en las condiciones más extremas del diseño experimental.

La granulometría del suelo es un factor muy importante en los procesos de absorción y adsorción de los pesticidas en el suelo (40). El material arcilloso es la fracción, con diferencia, que más influye en los procesos de absorción de las cuatro fracciones que componen principalmente un suelo: arcilla, limo, arena y grava; en este estudio las gravas se han retirado al tamizar la muestra. La arcilla produce la mayor absorción al ser el material más fino, con mayor relación superficie/volumen y con alta carga superficial (41). Este hecho tiene un efecto relevante en la recuperación, entre mayor es la cantidad de material arcilloso menor es la recuperación. En la Figura 3.7 se observa que los suelos con los que menor recuperación se obtiene es con Valleseco I y Valleseco II, siendo ambos los que mayor porcentaje de material arcilloso tienen.

La conductividad de los suelos es un factor que afecta directamente a la temperatura que se obtiene en el interior de los vasos al aplicar MAME. La temperatura es una variable que a pesar de no haber sido incluida en el diseño experimental se controló en todo momento, y se observó que la temperatura óptima de extracción variaba de un surfactante a otro entre un rango de 130°C a 160°C. Pero el hecho más notable relacionado con la temperatura se observó en las aplicaciones. Las tierras con alta conductividad (como San Roque) alcanzaban esta temperatura de extracción con potencias menores a las optimizadas; de hecho, si se aplicaba la potencia óptima aumentaba excesivamente la temperatura y disminuía la recuperación. Se observó que la conductividad y la temperatura eran variables que tenían una correlación

logarítmica, para el caso del surfactante mezcla stearil por ejemplo está correlación venía dada por la ecuación  $y = 9.2032\ln x + 93.7$  donde  $y$  es la temperatura y  $x$  la conductividad, con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.980$ . Como consecuencia de este hecho, para realizar las aplicaciones con la tierra San Roque fue necesario disminuir para cada surfactante la potencia un 30 % con respecto a la optimizada (calculado a partir de las ecuaciones de correlación).

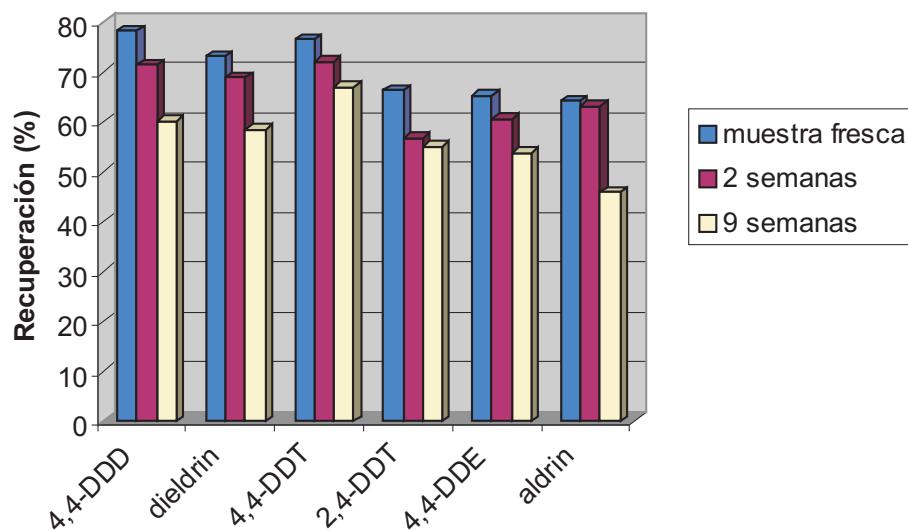
### **3.3.2. Influencia del envejecimiento de las muestras de suelo**

Cuando se realiza la extracción de contaminantes de muestras de suelos, los porcentajes de extracción disminuyen con el tiempo de envejecimiento (42; 43). Esto es debido a que a medida que aumenta el tiempo de contacto entre los analitos y las partículas del suelo las fuerzas que se establecen entre ambos son diferentes. En las primeras etapas los analitos son incorporados mediante adsorción, es decir, quedan retenidos en la superficie externa de las partículas del suelo, prevaleciendo las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas, las más débiles entre las interacciones moleculares, aumentan su intensidad con el tamaño de la partícula, por lo que este factor tiene cierta influencia en la adsorción de los analitos. A medida que transcurre el tiempo, las moléculas de los contaminantes se incorporan a la estructura interna de las partículas del suelo. A este fenómeno le denominamos absorción. A veces se utiliza también el término “secuestración” para referirse a este mecanismo

(44; 45).

La influencia del tiempo de envejecimiento en la extracción de los pesticidas organoclorados en suelos fue estudiada analizando muestras de los cinco tipos de suelos en diferentes períodos de tiempo, hasta nueve semanas después de ser acondicionadas. El acondicionamiento de las muestras se realizó de la misma forma que para las muestras frescas.

En la Figura 3.8 se muestran las recuperaciones obtenidas para la tierra Valleseco I con surfactante mezcla cetil a las 24 horas (muestra fresca), 2 semanas y 2 meses después de su acondicionamiento.



**Figura 3.8:** Recuperaciones obtenidas con Valleseco I a distintos tiempos de envejecimiento

Los resultados obtenidos con el estudio de envejecimiento de las muestras

indican que, tal y como se esperaba, las recuperaciones disminuyen con el tiempo para todos los compuestos, lo cual se puede explicar por procesos de absorción. En algunos casos se observó que la disminución en la recuperación prácticamente se estabilizaba a las 2 semanas, pudiendo deberse a que estos procesos ocurriensen en dicho período. Además, ninguno de los metabolitos del DDT incrementó con el tiempo, lo que permite asegurar que no están ocurriendo procesos de degradación en las 9 semanas que duró el estudio.

Los resultados obtenidos al aplicar MAME al resto de las tierras con los cuatro surfactantes fueron similares a los que se muestran en el Figura 3.8.

Estos resultados indican que el método desarrollado permite determinar la presencia de pesticidas en muestras reales y muestran la viabilidad del método como alternativa a los métodos convencionales.



## Conclusiones

---

De los estudios realizados en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se desarrolla un método de extracción de pesticidas contenidos en muestras sólidas, basado en combinar el poder de solubilización de los surfactantes y la acción de la radiación de microondas en un recipiente cerrado. Para cada surfactante se optimizaron los parámetros de los que depende el proceso, es decir, la concentración y el volumen de surfactante y las condiciones de irradiación del microondas, tiempo y potencia. La optimización de las variables se llevó a cabo utilizando un diseño factorial debido a la interacción entre las mismas.
2. Los valores obtenidos en optimización de condiciones muestran que el volumen de la disolución de surfactante debe ser suficiente como para que toda la muestra quede humedecida, un valor de 8 ml es suficiente para que el proceso ocurra de manera eficiente. Aumentar el volumen de la disolución de surfactante, por encima de los valores indicados,

no mejora la eficiencia de la extracción, pero sí supone un aumento indeseable de la temperatura en el interior de los vasos del microondas.

3. Para la extracción de pesticidas en muestras de suelos es necesario tener en cuenta las características de la matriz, fundamentalmente el contenido en materia orgánica y la textura de la misma. Dentro de los valores elegidos para nuestro estudio, la granulometría de la matriz se mostró como el factor que más influencia tenía sobre el proceso de extracción.
4. Los resultados obtenidos en la extracción de pesticidas en muestras de suelos son bastante satisfactorios con los cuatro surfactantes utilizados, si bien, la mezcla tridecil presenta valores más bajos que los otros surfactantes.
5. Para validar el método de extracción de pesticidas en muestras de suelo mediante la extracción micelar asistida por microondas, se aplicó el método desarrollado a una muestra certificada que contenía los pesticidas objeto de estudio. Para todos los surfactantes los resultados fueron satisfactorios.
6. Los porcentajes de recuperación obtenidos con muestras envejecidas, previamente enriquecidas con la mezcla de pesticidas, disminuyen con el tiempo de acondicionamiento. En algunos casos la recuperación no disminuye notablemente pasadas las 2 primeras semanas, y en ningún caso aumentan los metabolitos de degradación; lo que indica que el

proceso que está ocurriendo es la absorción y adsorción de los analitos en el suelo, pero no su degradación.

7. La utilización de MAME en la extracción de pesticidas organoclorados en suelos pone de manifiesto que dicha técnica es una buena alternativa a los métodos convencionales. Las principales ventajas del proceso son la reducción de la cantidad de muestra necesaria para el análisis, la sustitución de disolventes orgánicos por otros extractantes menos tóxicos y más baratos, la compatibilidad entre el extracto y la fase móvil en cromatografía líquida, la posibilidad de realizar de forma simultánea un número elevado de extracciones y, especialmente, una considerable reducción en el tiempo de análisis.



# Bibliografía

---

- [1] E. Kusvuran and O. Erbatur, *Journal of Hazardous Materials*, **106B**, 115–125 (2004).
- [2] The stockholm convention on pops: A global public health treaty. United Nations, May , (2001).
- [3] U. E. P. A. EPA Persistent organic pollutants: A global issue, a global response; <http://www.epa.gov/international>, April , (2002).
- [4] W. Chen, L. Zhang, L. Xu, X. Wang, L. Hong, and H. Hong, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 385–390 (2002).
- [5] M. Megharaj, D. Kantachote, I. Singleton, and R. Naidu, *Environmental Pollution*, **109**, 35–42 (2000).
- [6] H. Mwevura, O. Othman, and G. Mhehe, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 262–267 (2002).
- [7] M. Maroni, C. Colosio, A. Ferioli, and A. Fait, *Toxicology*, **143**, 61–75 (2000).

- [8] H. Shivaramaiah, I. Odeh, I. Kennedy, and J. Skerritt, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5360–5367 (2002).
- [9] A. Nawab, A. Aleem, and A. Malik, *Bioresource Technology*, **88**, 41–46 (2003).
- [10] Toxic substance control act. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Washington DC, (1979).
- [11] Toxicological profile for ddt, dde and ddd. u.s. department of health and human services. agency for toxic substances and disease registry.
- [12] Toxicological profile for aldrin/dieldrin. u.s. department of health and human services. agency of toxic substances and disease registry.
- [13] M. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley Interscience, 1989.
- [14] Y. Moroi, *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*, Plenum Press, 1992.
- [15] W. Hinze and E. Pramauro, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **24** (2), 133–177 (1993).
- [16] J. Cross, *Non ionic surfactants*, Chemical Analysis, Surfactant Science Series, vol. 19, 1987.
- [17] D. Myers, *Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications*, VCH, 1991.
- [18] E. Pellizzetti and E. Pramauro, *Analytica Chimica Acta*, **169**, 1 (1985).

- [19] J. Hernández García, Z. Sosa Ferrera, A. Bermejo Martín-Lázaro, and J. Santana Rodríguez, *Analytical Letters*, **27** (7), 1355 (1994).
- [20] J. de Boer and R. Law, *Journal of Chromatography A*, **1000**, 223–251 (2003).
- [21] K. Li, M. Landrialult, M. Fingas, and M. Llompart, *Journal of Hazardous Materials*, **102**, 93–104 (2003).
- [22] A. Peñalver, E. Pocurrull, F. Borrull, and R. Marcé, *Trends in Analytical Chemistry*, **18** (8), 557–567 (1999).
- [23] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L. Fernández, and J. Madariaga, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, **367**, 733–737 (2000).
- [24] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, and E. Fernández-Fernández, *Journal of Chromatography A*, **1008**, 115–122 (2003).
- [25] V. López-Ávila, R. Young, and W. Beckert, *Analytical Chemistry*, **66**, 1097–1106 (1994).
- [26] F. Esteve-Turrillas, C. Aman, A. Pastor, and M. de la Guardia, *Analytica Chimica Acta*, **522**, 73–78 (2004).
- [27] V. Pino, J. Ayala, A. Afonso, and V. González, *Journal of Chromatography A*, **869**, 515–522 (2000).

- [28] V. López-Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, and W. Beckert, *Analytical Chemistry*, **67**, 2096 (1995).
- [29] C. Padrón-Sanz, R. Halko, Z. Sosa-Ferrera, and J. Santana-Rodríguez, *Journal of Chromatography A*, **1078**, 13–21 (2005).
- [30] C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, and J. Santana Rodríguez, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **382**, 125–133 (2005).
- [31] Epa method 8041. environmental protection agency, washington, dc (1995) p.1.
- [32] N. Tomiyama, H. Tsuji, M. Watanabe, M. Takeda, T. Harada, and H. Kobayashi, *Journal of Chromatography B*, **748**, 361–368 (2000).
- [33] W. Sauerlandt and H. Berwecke, *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, **56**, 204–226 (1952).
- [34] A. International, Ed., AOAC Official Methods of Analysis, 2000; chapter 2, Fertilizers, page 40.
- [35] V. Pino, J. Ayala, A. Afonso, and V. González, *International Journal Environ. Analytical Chemistry*, **81**, 281–294 (2001).
- [36] S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1992.
- [37] S. Dupeyron, P. Dudermel, and D. Counturier, *Analisis*, **25**, 286–292 (1997).

- [38] Z. Gong, S. Tao, F. Xu, R. Dawson, W. Liu, Y. Cui, J. Cao, X. Wang, W. Shen, W. Zhang, B. Qing, and R. Sun, *Chemosphere*, **54**, 1247–1253 (2004).
- [39] W. Huang, P. Peng, Z. Yu, and J. Fu, *Applied Geochemistry*, **18**, 955–972 (2003).
- [40] S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H. Schuelten, and P. Leinweber, *Journal of Environmental Quality*, **33**, 1331–1342 (2004).
- [41] A. Aquino, D. Tunega, G. Haberhauer, M. Gerzabek, and H. Lischka, *Journal of Computational Chemistry*, **24**, 1853–1863 (2003).
- [42] W. Kiflom, S. Wandiga, P. Ngangá, and G. Kamau, *Environmental International*, **25** (4), 479–487 (1999).
- [43] S. Hacothorne, E. Björklund, S. Bowadt, and L. Mathiasson, *Environmental Science Technology*, **33**, 3152–3159 (1999).
- [44] J. Dec and J. Bollag, *Soil Science*, **162**, 858 (1997).
- [45] F. Kopinke, J. Pörschmann, and U. Stottmeister, *Environmental Science Technology*, **29**, 941–950 (1995).



## Anexo

---

### Publicaciones y Comunicaciones

Los estudios realizados en el presente trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

#### Publicaciones

- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Use of a mixture of non-ionic surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils. *Congress Proceeding. I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada*, (aceptado).
  
- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Use of polyoxyethylene surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils. *Journal of Chromatography A*, (enviado).

## Comunicaciones

- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from soils using non-ionic surfactant solution. *5<sup>th</sup> European Meeting on Environmental*. Bari (Italia). Diciembre 2004.
- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Application of microwave assisted micellar extraction and hplc to the determination of pesticides in agricultural soil samples. *29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques / HPLC 2005*. Estocolmo (Suecia). Junio 2005.
- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Chromatographic determination of organochlorine pesticides in soils after microwave assisted micellar extraction. *I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada*. Lima (Perú). Septiembre 2005.
- D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez. Coupling microwave assisted micellar extraction and SPME for the determination of pesticides in soils. *11<sup>a</sup> Jornadas de Análisis Instrumental*. Barcelona (España). Noviembre 2005. (aceptado).

# USE OF A MIXTURE OF NON-IONIC SURFACTANTS FOR THE EXTRACTION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES FROM AGRICULTURAL SOILS

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J. J. Santana Rodríguez\*.

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

e-mail: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es). Phone: +34 928452915. Fax: + 34 928 452922

Section: Environmental Analytical Chemistry

## Abstract

A mixture of two non ionic surfactant solutions has been used for microwave-assisted extraction of six organochlorine pesticides from an agricultural soil prior to being determined by HPLC-UV. An experimental design was applied for the determination of variables which affect to recovery and to optimize the extraction parameters, surfactant concentration, microwave time and power. The results obtained indicate that most of these compounds can be recovered in good yields with RSD lower than 10% and detection limit ranged between  $20\text{-}180 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the pesticides studied. Under the optimized conditions, the method was applied to a reference soil in order to validate the method.

**Keywords:** organochlorine pesticides; micellar medium; extraction methods; microwave; soils; high performance liquid chromatography.

## INTRODUCTION

Organochlorine pesticides have been used during decades in agricultural as insecticide and for the control of vector-borne diseases. Although these pesticides have banned in developed countries since 1970s and 1980s, some of them have continued to use DDT, especially for public health applications such as malaria control [1,2]. Despite not being used by many countries for some years they are present in the environment; in this way the long-term persistence of DDT and its metabolites in soil has been reported [3-6].

The lipophilic nature, hydrophobicity and low chemical and biological degradation rates of organochlorine pesticides have led their accumulation in biological tissues and subsequent magnification of concentrations in organisms progressing up the food chain with consequences for the humans [7,8]; for these reasons are listed as US Environmental Protection Agency (EPA) priority pollutants [9].

The most frequently used methods for the extraction of organochlorine pesticides from solid samples are Soxhlet extraction [10] which required high amounts of organic solvents and long analysis time. Other analysis methods have been developed as ultrasonic extraction, supercritical fluid extraction (SPE) [10] and solid phase microextraction (SPME) [11], and more recently two new techniques have been introduced: accelerated solvent extraction (ASE) and microwave assisted solvent extraction (MAE) [12].

In the last few years, MAE has became a viable alternative to the conventional techniques and exhibits many substantial improvements in analytical sample preparations, as it requires much lower volume of organic solvent, reduces extraction time and lets prepared multiple samples in one step [13-15]. However, organic solvents

are used as extractant in most of them. An alternative to these types of extractants would be the use of micellar systems. The extraction of organic compounds from solid samples using micellar medium, so called microwave assisted micellar extraction (MAME), offers advantages such as safety, low cost, compatibility with aqueous-organic mobile phase in HPLC, etc. The micellar media have been applied to the extraction of several compounds present in different environmental samples such as water, marine sediments and soils [16-18].

In this paper we have studied the microwave assisted micellar extraction of six organochlorine pesticides, which are considered as the most priority for the EPA, using a mixture of two non-ionic surfactant solutions (POLE and Polyoxyethylene 10 Tridecyl Ether, Tridecyl mixture) as extractant and HPLC-UV determination. For optimize the MAME process the variables studied have been: solvent concentration, extraction power and time.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents**

Organochlorine pesticides were obtained from Cerilliant Corporation (provided by LGC Promochem, Barcelona, Spain) and prepared by dissolving appropriate amounts of the commercial products in methanol to obtain a concentration of  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and stored in amber bottles at  $4^\circ\text{C}$ . Working solutions were prepared by further diluting these concentrations. The organochlorine pesticides are listed in Table 1 (numbers and abbreviations identify the compounds in figures). The non-ionic surfactants used in this study, Polyoxyethylene 10 lauryl ether (POLE) and Polyoxyethylene 10 tridecyl ether were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared in bidistilled water. Methanol HPLC-grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All solvents and analytes were filtered through a  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane filter and ultra-high-quality water obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore, USA) was used throughout.

Table 1.- List of organochlorine pesticides, wavelenghts and retention times.

Nº	Compound	Abbreviation	$\lambda$ (nm)	$t_R$ (min)
1	4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethane	4,4'-DDD	238	8.4
2	Dieldrin	Dieldrin	220	9.5
3	4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	4,4'-DDT	238	13.3
4	2,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	2,4'-DDT	238	14.7
5	4,4'- Dichlorodiphenyldichloroethylene	4,4'-DDE	238	16.6
6	Aldrin	Aldrin	220	18.1

### **Apparatus**

The chromatograph system consists of a Varian pump fitted with a Varian Autosampler 410 with a volume selector, a Column Valve Module with an internal oven and a Varian PDA Detector. The system and the data management were controlled by Star software from Varian (Varian Inc., Madrid, Spain). The stationary-phase column

was a Varian Microsorb-MV 100 C<sub>18</sub>, 250X4.6 mm, 8 µm particle diameter. The analytical column was inserted in the column module and thermostated at 30 ± 0.2 °C.

The microwave oven used in this study was a Multiwave (Anton Paar, Graz, Austria) with a 6 EVAP rotor and 6 MF100 vessels (Anton Paar, Graz, Austria).

## Procedures

### *Soil characteristics*

Pesticides-free soil sample was collected from an agricultural location in the Northeast of Gran Canaria (Canary Island). The physical-chemical characteristics of the soil sample is given in Table 2. To determine the soil pH and conductivity, 5 g of each soil was mixed with 20 mL of bidistilled water; the slurry was stirred and then allowed to separate the supernatant, pH and conductivity was measured potentiometrically [19]. The organic matter (O.M.) content was determined by the Sauerlandt method (organic matter oxidation by potassium dichromate and sulphuric acid) [20].

Table 2. Soil characteristics

Soil	Particle size (%)				pH	Organic matter (%)	Conductivity (µS/cm)
	0.3 mm	0.2 mm	0.15mm	≤0.1 mm			
Tafira	44.4	17.2	14.6	23.8	8.3	4.8	292

### *Preparation of spiked soil*

The soil sample was air-dried at room temperature for more than 2 weeks and sifted to a particle size of less than 0.3 mm. This sample was spiked as follows: 2 g of soil was spiked with a solution of 4,4'-DDD; 4,4'-DDT; 2,4'-DDT and 4,4'-DDE to obtain a final concentration of 1.2 µg/g and with a volume of Aldrin and Dieldrin solutions to obtain a concentration of each analytes of 2 µg/g. The sample was then stored in amber bottles at room temperature for 24 hours before analysis.

### *Surfactant Mixture*

In this study have been used a surfactant mixture with 30% of Polyoxyethylene 10 Tridecyl ether plus 70% POLE (Tridecyl mixture).

### *Microwave assisted micellar extraction*

Once the soil sample was transferred to the vessel, the optimum volume and concentration of surfactant were added and the soil was subjected to the MAME process. The vessels were then allowed to cool first 10 minutes with the microwave fan and after another 5 minutes at room temperature before being opened. The extract solution was filtered with a 0.45 µm syringe-driven filter and transferred to a glass tube and then to a vial for the injection.

### *Liquid chromatography analysis with UV detection*

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection [21]. The separation and determination of the compounds under study were performed by injecting 30 µl of extract into the liquid

chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the maximum wavelength, was then measured. The retention time and the wavelength for each compound are listed in Table 1. The eluent used for the separation of the six organochlorine pesticides mixture was methanol-water (85:15) isocratic with a flow-rate of 1 ml·min<sup>-1</sup>. A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations in the range of 100-1000 µg·L<sup>-1</sup>, with high correlation coefficients ( $\geq 0.995$ ).

### *Statistical analysis*

The experimental design was performed using Statgraphics Plus software, version 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, USA). The studies of partial and bivariate correlations were done using SPSS 11.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Optimization of MAME methodology*

Optimization experiments were performed using a soil sample from Tafira with 4.8% of organic matter for the six organochlorine pesticides under study.

Parameters that can influence the MAME process are amount of soil, extractant volume and concentration, irradiation time and power. Optimisation of MAE conditions has been reported in several applications and different studies have used multivariable factorial design [22,23] or central composite design to find optimal conditions [12].

In this study, 2 g of sample was taken to carry out the optimization. The variables were studied with a 2<sup>3</sup> factorial design in order to obtain the influence of each variable on the recovery and the variables correlations each other. The experimental design parameters in the screening design are shown in Table 3.

Table 3.- Design matrix in the screening design (2<sup>3</sup>)

Run	Power (W)	Time (min)	Surfactant
			Concentration (% v/v)
1	1000	14	1
2	1000	2	5
3	1000	14	5
4	100	14	5
5	100	14	1
6	1000	2	1
7	100	2	5
8	100	2	1

The analysis of the obtained results for each run (Table 4) shows the different correlations between variables and their influence on the recovery, where it can be observed that all parameters show the same sign for all pesticides.

The volume of surfactant wasn't included in experiment design, because previous studies indicated that volumes lower than 7 ml aren't enough for the correct interaction

between the surfactant and the analytes; and on the other hand, volumes higher than 10 ml increased the temperature of the vessels significantly doing the recoveries decreased. Because of this tight range between 7 and 10 ml, we decided to choose an intermediate value, 8 ml.

Table 4.- Relavant variables and correlation\* between variables

Correlation	4,4'-DDD	Dieldrin	4,4'-DDT	2,4'-DDT	4,4'-DDE	Aldrin
Power	0.755	0.742	0.71	0.71	0.637	0.532
Time	0.225	0.247	0.222	0.251	0.285	0.504
Conc. Surf.	0.363	0.331	0.476	0.397	0.509	-0.433
Power*Conc.	-0.4477	-0.1253	-0.546	-0.4369	-0.4887	-0.3666
Time*Conc.	-0.0901	-0.2717	-0.1229	-0.1125	-0.1757	-0.2798
Power*Time	-0.2663	-0.0257	-0.2294	-0.2623	-0.2456	-0.3019

\* The maxima correlations are +1 and -1

The results of the experiment design and the correlation between variables with the recovery and each other show that the microwave power is the variable which more affect to the recovery and is correlated with the surfactant concentration. The surfactant concentration has been optimized using a response surface with  $3^2$  factorial design with duplicate of central points where is represented surfactant concentration, microwave power and recovery. The results obtained for the case of 4,4'-DDT are shown in Figure 1. This representation shows that the optimum surfactant concentration is 5 % (v/v).

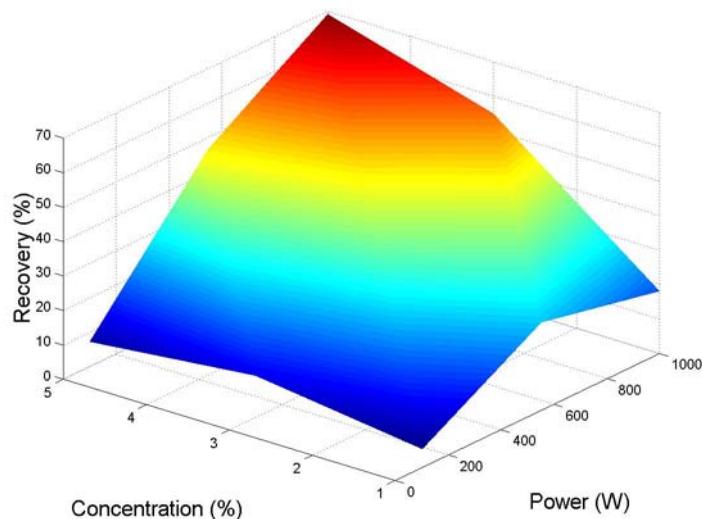


Figure 1. Response surface for the effect of surfactant concentration and power on the extraction of 4,4'-DDT.

The power and the microwave time were optimized together using another  $3^2$  factorial design with duplicate of central points, where the recovery is the dependent variable. The experiment involves 10 run by duplicate and other variables involved in the extraction process were kept constant in their optimized values: surfactant volume

(8 ml), surfactant concentration (5%, v/v) and soil amount (2 g). The concentration of pesticides spiked was also kept constant as were indicated.

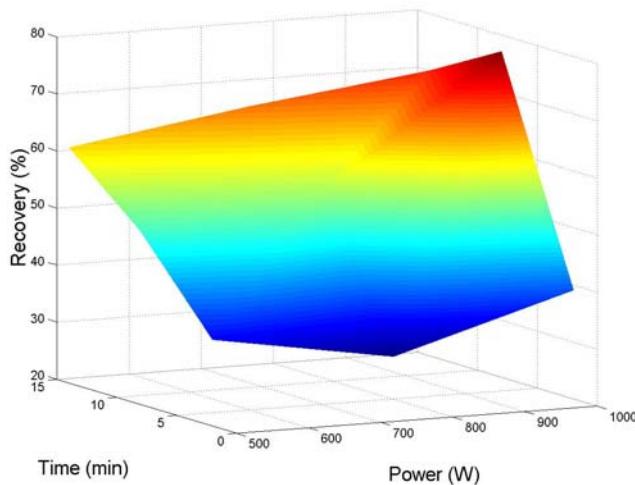


Figure 2. Response surface for the effect of power and time on the extraction of 4,4'-DDT

The figure 2 shows the response surface for 4,4'-DDT using Tridecyl mixture as extractant. The optimum conditions for microwave power and time were 1000W during 8 minutes obtaining a medium temperature of 147°C.

### **Liquid chromatographic analysis**

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection. The chromatogram obtained for the mixture of pesticides extracted of spiked Tafira soil using Tridecyl Mixture as extractant in shown in Figure 3.

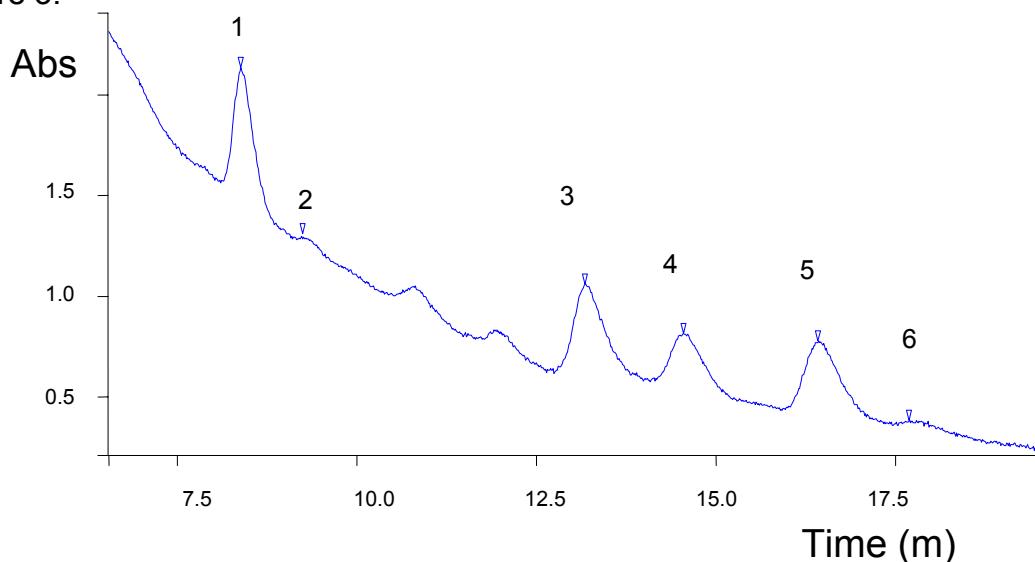


Figure 3. Chromatogram of an extract of a spiked Tafira soil after MAME procedure.  
Chromatographic conditions as described in the text,  $\lambda=238$  nm. The numbering refers to table 1.

It can be observed that this mobile phase allows a good separation of analytes and a short analysis time.

The corresponding calibration curve was done with a surfactant concentration of 5% (v/v) and the corresponding analyte concentrations ranged between 100 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients ( $\geq 0.995$ ). The relative standards deviations were calculated in six samples to which the MAME process was applied and are shown in Table 5. These results indicate standard deviation values lower than 10%. The detection limits [23] were calculated as three times the noise for each pesticide and vary between 20-180  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for all compounds studied.

Table 5. Average recoveries and relative standard deviations for studied pesticides from Tafira\*

Compound	Recovery (%)	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
4,4'-DDD	71.52	6.07	25
Dieldrin	67.71	4.10	173
4,4'-DDT	66.02	7.22	51
2,4'-DDT	55.57	8.78	54
4,4'-DDE	64.37	6.41	23
Aldrin	49.88	8.55	149

\* Mean of six extractions.

#### *Validation with a certified soil*

Recoveries obtained with spiked compounds may not be representative of those found with native compounds. Spiked analytes are generally lightly coated on the surface of the matrix whereas native ones can be strongly adsorbed inside the porous matrix. This can be explained by the diffusional and the kinetic limitations of the sorption process, and the several interactions which may have been simultaneously established between native analyte and the matrix [25]. This is the reason why it is necessary to validate the extraction procedure with certified reference matrices. For this purpose, we used a certified reference soil contaminated with organochlorine pesticides from an agricultural region of the Western United States (CRM804-050). The proposed extraction procedure was applied to 2 g of this soil using the optimal conditions. Table 6 reports the pesticides present in the certified soil and gives the corresponding certificated values, the confidence intervals and the concentrations of each analyte that we obtained using the MAME procedure. The concentrations obtained, with the proposed method, falling within the certified range for all compounds analyzed, indicate that the proposed extraction procedure is suitable for this kind of matrix.

Table 6. Extraction of pesticides compounds using MAME with Tridecyl mixture in a certified reference material<sup>a</sup>.

Compound	Reference Value <sup>b</sup>	R.S.D	Prediction Interval	Amount found
4,4'-DDD	1.531	0.476	0.499 – 2.562	1.275 ± 0.010
Dieldrin	1.863	0.655	0.437 - 3.288	1.792 ± 0.040
4,4'-DDT	1.060	0.275	0.633 – 2.407	0.794 ± 0.019
4,4'-DDE	1.520	0.410	0.465 – 1.655	1.114 ± 0.040

<sup>a</sup>All values are expressed in µg/g

<sup>b</sup>The pesticides values in the sample were certified by USEPA SW846 (3rd edition). Extraction Methods 3540A/3541 (soxhlet), 3550 (sonication) and Analysis Method 8081

## CONCLUSIONS

In this work, organochlorine pesticides have been extracted from soils by MAME procedure using a mixture of two non-ionic surfactant solutions, Polyoxyethylene 10 Lauryl ether and Polyoxyethylene 10 Tridecyl ether, with HPLC and UV detection after the establishment of the optimum conditions. The main advantages of MAME are shorter extraction times, free organic solvents, which reduces cost and toxicity. The methodology developed allows the simple, fast and selective determination of organochlorine pesticides in soils from agricultural origin and provides a promising and viable alternative to other extraction techniques.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology Project Nº PPQ2002/04683.

## REFERENCES

- [1] E. Kusvuran, O. Erbatur, Journal of Hazardous Materials, 106B (2004), 115-125
- [2] Stockholm Convention on Pops: A Global Public Health Treaty. Sweden, May 2001.
- [3] H.M. Shivaramaiah, I.O.A. Odeh, I.V. Kennedy, J.H. Skerritt, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (2002), 5360-5367
- [4] W. Chen, L. Zhang, L. Xu, X. Wang, L. Hong, H. Hong, Marine Pollution Bulletin 45 (2002) 385-390
- [5] A. Nawab, A. Aleem, A. Malik, Biosesource Technology, 88 (2003), 41-46
- [6] M. Megharaj, D. Kantachote, I. Singleton, R. Naidu, Environmental Pollution, 109 (2000), 35-42
- [7] H. Mwevura, O. Othman, G.L. Mhehe, Marine Pollution Bulletin, 45 (2002) 262-267
- [8] M. Maroni, C. Colosio, A. Ferioli, A. Fait, Toxicology, 143 (2000) 61-75
- [9] U.S. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act, US EPA, Washington DC, 1979.
- [10] J. Boer, R.J. Law, Journal of Chromatography A, 1000 (2003) 223-251

- [11] A. Peñalver, E. Pocurrull, F. Borrull, R.M. Marcé. Trends in Analytical Chemistry, 18 (1999) 557-567
- [12] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Fresenius J. Anal Chem, 367 (2000) 733-737
- [13] V. López-Ávila, R. Young, Analytical Chemistry, 66 (1994) 1097-1106
- [14] F.A. Esteve-Turillas, C.S. Aman, A. Pastor, M. de la Guardia, Analytica Chimica Acta, 522 (2004) 73-78
- [15] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, Journal of Chromatography A, 1008 (2003) 115-122
- [16] C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analytica Chimica Acta, 524 (2004) 133-139
- [17] C. Padrón Sanz, R. Halko, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analytica Chimica Acta, 524 (2004) 265-270
- [18] Z. Sosa Ferrera, C. Padrón Sanz, C. Mahugo Santana, J.J. Santana Rodríguez, Trends in Analytical Chemistry, 23 (7) (2004) 469-479
- [19] AOAC Official Method 994.16. AOAC Official Methods of Analysis (2000), Fertilizers. Chapter 2, p.40.
- [20] W. Sauerlandt, H. Berwecke, Z. Pflanz. Düng. Bodenk., 56 (1952), 204-226
- [21] N. Tomiyama, H. Tsuji, M. Watanabe, M. Takeda, T. Harada, H. Kobayashi, Journal of Chromatography B, 748 (2000), 361-368
- [22] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, J. Chromatography A, 2000, 869, 515-522.
- [23] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 2001, 81, 281-294
- [24] S. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, NY, 1992, 71
- [25] S. Dupeyron, P.M. Dudermel, D. Counturier, Analusis 25 (1997) 286-292



Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: USE OF POLYOXYETHYLENE SURFACTANTS FOR THE EXTRACTION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES FROM AGRICULTURAL SOILS

Article Type: HPLC 2005

Section/Category:

Keywords: organochlorine pesticides; micellar medium; extraction methods; microwave; soils; high performance liquid chromatography

Corresponding Author: Professor J.J. Santana Rodríguez,

Corresponding Author's Institution: University of Las Palmas de G.C., Faculty of Marine Sciences

First Author: D. Vega Moreno

Order of Authors: D. Vega Moreno; Z. Sosa Ferrera; J.J. Santana Rodríguez

Manuscript Region of Origin:

Abstract:

## JUSTIFICATION LETTER

It is well known that the extraction and separation of organic compounds from solid samples, principally environmental samples, require methods that use strong experimental conditions (high temperatures and long times) to obtain satisfactory results. In this way we can indicate the Soxhlet extraction and ultrasonic bath. Moreover, these techniques use organic solvent as extractant (normally in a considerable volume) which is a subsequent source of contamination due to organic wastes.

In the last years, the use of Microwave Assisted Extraction (MAE) has helped to improve the extraction procedures in these kind of samples, above all with regard to time consuming and amount of organic solvent required to the extraction. However the procedures based in this technique use organic solvents as extractant, with the subsequent possibility of contamination of the environment, as well as the high economic cost of the same.

In our paper, we present a procedure in which we combine the use of MAE with a micellar medium (a mixture of two surfactants) as extractant of organochlorine pesticides in agricultural soils. With this combination we achieve important advantages respect to the methods above mentioned:

- Reduction of the time necessary to the extraction
- Use of an aqueous and biodegradable extractant, which avoid a later contamination due to organic wastes
- Reduction of economic cost of the procedure
- Simplicity and rapidity in the handling and treatment of the samples.

Moreover, the micellar systems used are perfectly compatible with the current mobile phases used in the separation of this kind of compounds.

According to these considerations, the authors consider that the paper provide very interesting and novelty results to be considered for publication in Journal of Chromatography A.

This work was presented in 29<sup>th</sup> High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2005) held in Stockholm in June 2005.

USE OF POLYOXYETHYLENE SURFACTANTS FOR THE EXTRACTION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES FROM AGRICULTURAL SOILS

Daura Vega Moreno, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez\*.

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

\*Corresponding author: e-mail address: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es)

Phone: +34 928452915

Fax: + 34 928 452922

## **ABSTRACT**

Two non-ionic surfactant mixtures (POLE and Polyoxyethylene 10 Cetyl ether, POLE and Polyoxyethylene 10 Stearyl ether) have been used for microwave-assisted extraction of six organochlorine pesticides from agricultural soils prior to being determined by HPLC-UV. An experimental design was applied for the determination of variables which affect to recovery and to optimize the extraction parameters, surfactant concentration and volume, microwave time and power. Under the optimized conditions, the method was applied to different soil samples in order to analyze the influence of soil characteristics on the pesticides extraction. The results obtained indicate that most of these compounds can be recovered in good yields with RSD lower than 10% and detection limit ranged between 20-200  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the pesticides studied. The proposed method was applied to a reference soil sample and to aged soils.

*Keywords:* organochlorine pesticides; micellar medium; extraction methods; microwave; soils; high performance liquid chromatography.

## INTRODUCTION

Organochlorine pesticides have been used during decades in agricultural as insecticide and for the control of vector-borne diseases. Although these pesticides have banned in developed countries since 1970s and 1980s, some of them have continued to use DDT, especially for public health applications such as malaria control [1,2]. Despite not being used by many countries for some years they are present in the environment; in this way, the long-term persistence of DDT and its metabolites in soil have been reported [3-6].

The lipophilic nature, hydrophobicity and low chemical and biological degradation rates of organochlorine pesticides have led their accumulation in biological tissues and subsequent magnification of concentrations in organisms progressing up the food chain with consequences for the humans [7,8]; for these reasons are listed as US Environmental Protection Agency (EPA) priority pollutants [9].

The most frequently used methods for the extraction of organochlorine pesticides from solid samples are Soxhlet extraction [10] which required high amounts of organic solvents and long analysis time. Other analysis methods have been developed as ultrasonic extraction, supercritical fluid extraction (SPE) [10] and solid phase microextraction (SPME) [11], and more recently two new techniques have been introduced: accelerated solvent extraction (ASE) and microwave assisted solvent extraction (MAE) [12].

In the last few years, MAE has become a viable alternative to the conventional techniques and exhibits many substantial improvements in analytical sample preparations, as it requires much lower volume of organic solvent, reduces extraction time and lets prepared multiple samples in one step [13-15]. However, organic solvents are used as extractant in most of them. An alternative to these types of extractants would be the use of micellar systems. The extraction of organic compounds from solid samples using micellar medium, so called microwave assisted micellar extraction (MAME), offers advantages such as safety, low cost, compatibility with aqueous-organic mobile phase in HPLC, etc. The micellar media have been applied to the extraction of several compounds present in different environmental samples such as water, marine sediments and soils [16-18].

In this paper we have studied the microwave assisted micellar extraction of six organochlorine pesticides, which are considered as the most priority for the EPA, using two different mixtures of non-ionic surfactant solutions (POLE and Polyoxyethylene 10 Cetyl Ether (Cetyl mixture), and Pole and Polyoxyethylene 10 Stearyl ether, Stearyl mixture) as extractant and HPLC-UV determination. For optimize the MAME process the variables studied have been: solvent volume and concentration, extraction power and time.

The method optimized was applied to the extraction of organochlorine pesticides from various types of agricultural soils with a view to analyzing the influence of soil characteristics on the desorption of compounds.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents**

Organochlorine pesticides were obtained from Cerilliant Corporation (provided by LGC Promochem, Barcelona, Spain) and prepared by dissolving appropriate amounts of the commercial products in methanol to obtain a concentration of  $1\text{ g L}^{-1}$  and stored in amber bottles at  $4^\circ\text{C}$ . Working solutions were prepared by further diluting these concentrations. The organochlorine pesticides are listed in Table 1 (numbers and abbreviations identify the compounds in figures). The certified reference soil with pesticides compounds (CRM804-050) was obtained from Resource Technology Corporation (provided by LGC Promochem, Barcelona, Spain). The non-ionic surfactants used in this study, Polyoxyethylene 10 lauryl ether (POLE), Polyoxyethylene 10 Cetyl ether and Polyoxyethylene 10 Stearyl ether, were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared in bidistilled water. Methanol HPLC-grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All solvents and analytes were filtered through a  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane filter and ultra-high-quality water obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore, USA) was used throughout.

### **Apparatus**

The chromatograph system consists of a Varian pump fitted with a Varian Autosampler 410 with a volume selector, a Column Valve Module with an internal oven and a Varian PDA Detector. The system and the data management were controlled by Star software from Varian (Varian Inc., Madrid, Spain). The stationary-phase column was a Varian Microsorb-MV 100 C18, 250X4.6 mm,  $8\text{ }\mu\text{m}$  particle diameter. The analytical column was inserted in the column module and thermostated at  $30 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

The microwave oven used in this study was a Multiwave (Anton Paar, Graz, Austria) with a 6 EVAP rotor and 6 MF100 vessels (Anton Paar, Graz, Austria).

### **Procedures**

#### *Soil characteristics*

Pesticides-free soils samples were collected from different agricultural locations of Gran Canaria (Canary Island); Tafira, Santa Brígida and San Roque soils from the Northeast of the island and Valleseco soils from the centre. The physical-chemical characteristics of the soils samples are given in Table 2. To determine the soil pH and conductivity, 5 g of each soil was mixed with 20 mL of bidistilled water; the slurry was stirred and then allowed to separate the supernatant, pH and conductivity was measured potentiometrically [19]. The organic matter (O.M.) content was determined by the Sauerlandt method (organic matter oxidation by potassium dichromate and sulphuric acid) [20].

#### *Preparation of spiked soils*

The soil samples were air-dried at room temperature for more than 2 weeks and sifted to a particle size of less than 0.3 mm. These samples were spiked as follows: 2 g of each soil was spiked with a solution of 4,4'-DDD; 4,4'-DDT; 2,4'-DDT and 4,4'-DDE to obtain a final concentration of  $1.2\text{ }\mu\text{g/g}$  and with a volume of Aldrin and Dieldrin solutions to obtain a concentration of each analytes of  $2\text{ }\mu\text{g/g}$ . The samples were then stored in amber bottles at room temperature for 24 hours before analysis.

The samples identified as "aged" samples were spiked with the mixture of pesticides at the same concentration and were stored at room temperature for 2 and 9 weeks.

The results reported are the average of triplicate measurements.

#### *Surfactant Mixtures*

In this study have been used two surfactant mixtures: a mixture of 30% of Polyoxyethylene 10 Cetyl ether and 70% POLE (Cetyl mixture) and a mixture of 30% of Polyoxyethylene 10 Stearyl ether and 70% POLE (Stearyl mixture).

#### *Microwave assisted micellar extraction*

Once the soil sample was transferred to the vessel, the optimized volume and concentration of surfactant were added and the soil was subjected to the MAME process. The vessels were then allowed to cool first 10 minutes with the microwave fan and after another 5 minutes at room temperature before being opened. The extract solution was filtered with a 0.45 µm syringe-driven filter and transferred to a glass tube and then to a vial for the injection.

#### *Liquid chromatography analysis with UV detection*

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection [21]. The separation and determination of the compounds under study were performed by injecting 30 µl of extract into the liquid chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the maximum wavelength, was then measured. The retention time and the wavelength for each compound are listed in Table 1. The eluent used for the separation of the six organochlorine pesticides mixture was methanol-water (85:15) isocratic with a flow-rate of 1 ml·min<sup>-1</sup>. A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations in the range of 100-1000 µg·L<sup>-1</sup>, with high correlation coefficients ( $\geq 0.995$ ).

#### *Statistical analysis*

The experimental design was performed using Statgraphics Plus software, version 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, USA). The studies of partial and bivariate correlations were done using SPSS 11.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Optimization of MAME methodology*

Optimization experiments were performed using a soil sample from Valleseco I with 4.4% organic matter for Cetyl surfactant mixture and a sample from Tafira with 4.8% of organic matter for Stearyl surfactant mixture for the six organochlorine pesticides under study.

Parameters that can influence the MAME process are amount of soil, extractant volume and concentration, irradiation time and power. Optimisation of MAE conditions has been reported in several applications and different studies have used multivariable factorial design [22,23] or central composite design to find optimal conditions [12].

In this study, 2 g of sample was taken to carry out the optimization. The variables were studied with a  $2^4$  factorial design in order to obtain the influence of each variable on the recovery and the variables correlations each other. The experimental design parameters in the screening design are shown in Table 3. The analysis of the obtained results for each run (Table 4 for Cetyl mixture) shows the different correlations between variables and their influence on the recovery, where it can be observed that all parameters show the same sign for all pesticides. For Stearyl mixture the results were similar.

The volume of surfactant was included in experiment design, but in spite of the results show that the volume doesn't have significant influence in the recovery, different studies done after the experiment design due low reproducibility of the results, indicated that volumes lower than 7 ml aren't enough for the correct interaction between the surfactant and the analytes; and on the other hand, volumes higher than 10 ml increased the temperature of the vessels significantly doing the recoveries decreased. Because of this tight range between 7 and 10 ml, we decided to choose an intermediate value, 8 ml.

The results of the experiment design and the correlation between variables with the recovery and each other show that the surfactant concentration is the variable which more affect to the recovery and is correlated with the microwave power. The surfactant concentration has been optimized using a response surface with  $3^2$  factorial design with duplicate of central points where is represented surfactant concentration, microwave power and recovery. The results obtained for the case of 4,4'-DDT using Stearyl mixture are shown in Figure 1. For the case of Cetyl mixture the results are similar, obtaining an optimum surfactant concentration of 5% (v/v).

The power is the second variable which more affects to the recovery and is correlated too with the microwave time. These two variables were going to optimized together using another  $3^2$  factorial design with duplicate of central points, where the recovery is the dependent variable. The experiment involves 10 run by duplicate and other variables involved in the extraction process were kept constant in their optimized values: surfactant volume (8 ml), surfactant concentration (5%, v/v) and soil amount (2 g). The concentration of pesticides spiked was also kept constant as were indicated.

In this case the results are different for both surfactant mixtures. Figure 2a shows the response surface for 4,4'-DDT using Cetyl mixture as extractant, where we can observe that from 750 W for microwave power during 14 minutes are the optimum conditions, obtaining a medium temperature of 145°C; for Stearyl mixture (Figure 2b) the optimum conditions are 775 W during 8 minutes with a temperature of 130°C.

### *Liquid chromatographic analysis*

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection. The chromatogram obtained for the mixture of pesticides extracted of spiked Tafira soil using Stearyl mixture as extractant is shown in Figure 3. It can be observed that the mobile phase used allows a good separation of analytes, with both surfactants used, and a short analysis time.

The chromatogram obtained with Cetyl Mixture is similar.

The corresponding calibration curves in both surfactant mixes were done with a surfactant concentration of 5% (v/v) and the corresponding analyte concentrations, ranged between 100 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients ( $\geq 0.995$ ) in both cases. The relative standards deviations were calculated in six samples for both

surfactant mixtures, to which the MAME process was applied, obtaining the results shown in Table 5. These results indicate standard deviation values lower than 10%. The detection limits [24] were calculated as twice the noise for each pesticide and vary between 20-200 µg L<sup>-1</sup> (Table 5) for all compounds studied.

### **Validation with a certified soil**

Recoveries obtained with spiked compounds may not be representative of those found with native compounds. Spiked analytes are generally lightly coated on the surface of the matrix whereas native ones can be strongly adsorbed inside the porous matrix. This can be explained by the diffusional and the kinetic limitations of the sorption process, and the several interactions which may have been simultaneously established between native analyte and the matrix [25]. This is the reason why it is necessary to validate the extraction procedure with certified reference matrices. For this purpose, we used a certified reference soil contaminated with organochlorine pesticides from an agricultural region of the Western United States (CRM804-050). The proposed extraction procedure was applied to 2 g of this soil using the optimal conditions for both surfactants. Table 6 reports the pesticides present in the certified soil, the corresponding certificated values, the confidence intervals and the concentration of each analyte that were obtained using the MAME procedure with Stearyl mixture. The concentrations obtained, with the proposed method, falling within the certified range for all compounds analyzed, indicate that the proposed extraction procedure is suitable for this kind of matrix. In the case of Cetyl mixture the results were similar.

## **Applications**

### *Influence of matrix nature*

In order to study the influence of soil characteristics on the extraction, we applied the MAME procedure to soils with different levels of organic matter, pH, texture and conductivity. The optimized method was used to determine the extraction of the pesticides from five different types of agricultural soils spiked with the mixture of organochlorine pesticides. The selected concentration level for spiking was the one typical of acute pollution events that may occur in this kind of soil. The soil was spiked and stored in the dark at room temperature for 24 hours before analysis. The results obtained are shown in Tables 7a and 7b and can be observed that recoveries vary depending of the surfactant mixture used as extractant and of the soil characteristics.

The soils with high organic matter (San Roque) have good recoveries because the surfactant can also extract humic substances which are linked to the pesticides [26]. These recoveries decreases when the temperature is too high (observed in the most extremely conditions in the experimental design).

The texture of a soil is quite important in the sorption process [27]. Clay is by far the most adsorbent of the three main soil textures (clay, silt and sand) due to its small particle size, high surface area, and high surface charge [28]. This has a relevant effect on the recovery; the higher clay percent a soil has, the lower the recovery is so, in this case, the Valleseco II soil has a higher amount of particles with smaller size and therefore, lower recoveries are obtained.

The conductivity of the soils is related with the microwave temperature obtained in the same conditions. There is a logarithmic correlation between these parameters. For Cetyl mixture the equation is  $y = 9.2032 \ln x + 93.7$  ( $R^2 = 0.980$ ) where  $y$  is temperature and  $x$  conductivity and for Stearyl mix is  $y = 11.728 \ln x + 56.186$  ( $R^2 = 0.969$ ). This effect had as a consequence that for San Roque soil was necessary decrease the power intensity to obtain optimum temperature.

### *Influence of aging time*

Decreasing recoveries resulting from aging of matrices is a well-known phenomenon [29,30]. The analytes present in recent soil samples are more easily extracted than those that have had a longer contact

time. This can be explained according to whether the analytes are incorporated by adsorption (short periods) [31]. The former phenomenon occurs at the early stages of sorption, where H-bonding and Van der Waals forces prevail. On the other hand, sequestration involves sorption at remote microsites within the soil matrix [32].

In order to study the aging effect, we applied the MAME procedure to four soils for different time periods after conditioning. The soil samples were spiked with the pesticides mixtures and stored at room temperature in dark before extraction. Figure 4a shows the recoveries obtained for the different pesticides in the case of Valleseco I soil using Cetyl mixture with the time aging and Figure 4.b shows the results obtained in the case of San Roque soil using Stearyl mixture with the same aging time.

It can be seen that the recoveries decrease with the aging time for all compounds which could be explained for the sorption process. Only in the case of dieldrin using Stearyl mixture, the recovery remains practically constant with the time. Moreover, none of the metabolites of DDT increases with the time then we can assert that degrading processes were not happen in these aging time. These results indicate that the developed method leads determine the presence of pesticides in real samples after a contact time and show the viability of the method as alternative to the conventional ones.

## CONCLUSIONS

In this work, organochlorine pesticides have been extracted from soils by MAME procedure with HPLC and UV detection after the establishment of the optimum conditions. The main advantages of MAME are shorter extraction times, free organic solvents, which reduces cost and toxicity. The methodology developed allows the simple, fast and selective determination of organochlorine pesticides in soils from and agricultural origin and provides a promising and viable alternative to other extraction techniques.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology Project N° PPQ2002/04683.

## REFERENCES

- [1] E. Kusvuran, O. Erbatur, Journal of Hazardous Materials 106B (2004) 115-125
- [2] Stockholm Convention on Pops: A Global Public Health Treaty. Sweden, 2001.
- [3] H.M. Shivaramaiah, I.O.A. Odeh, I.V. Kennedy, J.H. Skerritt, Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (2002) 5360-5367
- [4] W. Chen, L. Zhang, L. Xu, X. Wang, L. Hong, H. Hong, Marine Pollution Bulletin 45 (2002) 385-390
- [5] A. Nawab, A. Aleem, A. Malik, Biosource Technology 88 (2003) 41-46
- [6] M. Megharaj, D. Kantachote, I. Singleton, R. Naidu, Environmental Pollution 109 (2000) 35-42
- [7] H. Mwevura, O. Othman, G.L. Mhehe, Marine Pollution Bulletin 45 (2002) 262-267
- [8] M. Maroni, C. Colosio, A. Ferioli, A. Fait, Toxicology 143 (2000) 61-75
- [9] U.S. Environmental Protection Agency. Toxic Substance Control Act, US EPA, Washington DC, 1979.
- [10] J. Boer, R.J. Law, Journal of Chromatography A 1000 (2003) 223-251
- [11] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé. Trends in Analytical Chemistry 18 (1999) 557-567
- [12] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Femández, J.M. Madariaga, Fresenius J. Anal. Chem. 367 (2000) 733-737
- [13] V. López-Ávila, R. Young, Analytical Chemistry 66 (1994) 1097-1106
- [14] F.A. Esteve-Turillas, C.S. Aman, A. Pastor, M. de la Guardia, Analytica Chimica Acta 522 (2004) 73-78

- [15] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Femández-Fernández, Journal of Chromatography A 1008 (2003) 115-122
- [16] C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analytica Chimica Acta 524 (2004) 133-139
- [17] C. Padrón Sanz, R. Halko, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analytica Chimica Acta 524 (2004) 265-270
- [18] Z. Sosa Ferrera, C. Padrón Sanz, C. Mahugo Santana, J.J. Santana Rodríguez, Trends in Analytical Chemistry 23 (7) (2004) 469-479
- [19] AOAC Official Method 994.16. AOAC Official Methods of Analysis. Fertilizers, 2000, chapter 2, p. 40.
- [20] W. Sauerlandt, H. Berwecke, Z. Pflanz. Düng. Bodenk. 56 (1952) 204-226
- [21] N. Tomiyama, H. Tsuji, M. Watanabe, M. Takeda, T. Harada, H. Kobayashi, Journal of Chromatography B 748 (2000) 361-368
- [22] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, J. Chromatography A 869 (2000) 515-522.
- [23] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, Intem. J. Environ. Anal. Chem. 81 (2001) 281-294
- [24] S. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, NY, 1992, p. 71.
- [25] S. Dupeyron, P.M. Dudermel, D. Counturier, Analusis 25 (1997) 286-292
- [26] W. Huang, P. Peng, Z. Yu, J. Fu, Applied Geochemistry 18 (2003) 955-972
- [27] S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H.R. Schuelten, P. Leinweber, Journal of Environmental Quality 33 (2004) 1331-1342
- [28] A. J. Aquino, D. Tunega, G. Haberhauer, M. Gerzabek, H. Lischka, Journal of Computational Chemistry 24(15) (2003) 1853-1863
- [29] G. Kiflom, S.O. Wandiga, P.K. Ng'ang'a, G.N. Kamau, Environmental Internacional 25(4) (1999) 479-487
- [30] S.B. Hacothome, E. Björklund, S. Bowadt, L. Mathiasson, Environ. Sci. Technology 33 (1999) 3152-3159
- [31] J. Dec, J. Bollag, Soil Science 162 (1997) 858-874
- [32] F. Kopinke, J. Pörschmann, U. Stottmeister, Environ. Sci. Technology 29 (1995) 941-950

## Tables

Table 1.- List of organochlorine pesticides, wavelengths and retention times.

Nº	Compound	Abbreviation	λ (nm)	t <sub>R</sub> (min)
1	4,4'-Dichlorodiphenyl dichloroethane	4,4'-DDD	238	8.4
2	Dieldrin	Dieldrin	220	9.5
3	4,4'-Dichlorodiphenyl trichloroethane	4,4'-DDT	238	13.3
4	2,4'-Dichlorodiphenyl trichloroethane	2,4'-DDT	238	14.7
5	4,4'-Dichlorodiphenyl dichloroethylene	4,4'-DDE	238	16.6
6	Aldrin	Aldrin	220	18.1

Table 2. Soil characteristics.

Soil	Agricultural Uses	Particle size (%)				pH	Organic matter (%)	Conductivity ( $\mu$ S/cm)
		0.3 mm	0.2 mm	0.15mm	$\leq 0.1$ mm			
Tafira	Garden	44.4	17.2	14.6	23.8	8.3	4.8	292
San Roque	Bananas	52.1	20.0	13.2	14.6	7.86	12.54	3266
Sta Brigida	Pine Forest	56.5	17.8	12.8	12.8	5.9	3.9	483
Valleseco I	Potatoes	36.33	16.43	15.19	32.06	4.84	4.4	202
Valleseco II	Potatoes	25.16	13.17	14.38	47.29	3.91	6.21	100

Table 3.- Design matrix in the screening design (2<sup>4</sup>)

Run	Power (W)	Time (min)	Surfactant Volume (ml)	Surfactant Concentr. (% v/v)
1	100	14	5	1
2	800	2	15	5
3	100	2	5	5
4	800	14	15	1
5	800	14	5	5
6	100	2	15	1
7	800	2	5	1
8	100	14	15	5
9	100	2	15	5
10	100	2	5	1
11	800	14	15	5
12	800	2	5	5
13	100	14	15	1
14	800	14	5	1
15	100	14	5	5
16	800	2	15	1

Table 4.- Relevant variables and correlation between variables<sup>a</sup>  
using Cetyl mixture as extractant

Correlation	4,4'-DDD	Dieldrin	4,4'-DDT	2,4'-DDT	4,4'-DDE	Aldrin
Power	0.245	0.331	0.239	0.05	0.366	0.322
Time	-0.008	0.403	-0.006	-0.055	0.249	0.201
Volume	-0.091	-0.069	-0.246	-0.336	-0.09	-0.808
Concentrat.	0.587	0.197	0.599	0.595	0.538	0.248
Power x Conc.	-0.1832	-0.1474	-0.1838	-0.0371	-0.2504	-0.2429
Time x Conc.	0.0056	-0.0088	0.0048	0.0408	-0.1638	0.098
Power x Time	0.0019	-0.0717	0.0016	0.0028	-0.1009	0.0842

<sup>a</sup> The maxima correlations are +1 and -1

Table 5. Analytical parameters for the determination of pesticides under study using MAME procedure\*

Compound	<i>Cetyl mixture (from Valleseco I)</i>		<i>Stearyl mixture (from Tafira)</i>	
	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
4,4'-DDD	8.43	27.2	9.66	67.4
Dieldrin	7.09	198.3	9.73	183.5
4,4'DDT	6.53	41.8	5.22	42.9
2,4'DDT	5.18	21.6	7.5	71.3
4,4'-DDE	7.45	33.9	8.25	37.7
Aldrin	5.38	201.6	9.08	148.3

\* n=6

Table 6. Extraction of pesticides compounds using MAME with Stearyl mixture in a certified reference material<sup>a</sup>.

Compound	Reference Value <sup>b</sup>	RSD (%)	Confidence Interval	Concentration found
4,4'-DDD	1.531	0.476	1.294 – 1.767	1.733 ± 0.009
Dieldrin	1.863	0.655	1.539 – 2.186	2.242 ± 0.084
4,4'-DDT	1.060	0.275	0.926 – 1.195	1.079 ± 0.015
4,4'-DDE	1.520	0.410	1.325 – 1.715	1.502 ± 0.022

<sup>a</sup>All values are expressed in µg/g

<sup>b</sup>The pesticides values in the sample were certified by USEPA SW846 (3rd edition). Extraction Methods 3540A/3541 (soxhlet), 3550 (sonication) and Analysis Method 8081

Table 7a. Recoveries obtained after MAME procedure for the pesticides in five different soils using Cetyl mixture\*.

<b>Soil</b>	<b>4,4'-DDD</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>4,4'-DDT</b>	<b>2,4'-DDT</b>	<b>4,4'-DDE</b>	<b>Aldrin</b>
Tafira	99.11	66.17	67.66	58.55	64.99	62.98
San Roque	69.39	44.69	78.01	59.43	67.13	52.56
Sta Brigida	96.81	80.74	84.00	75.08	73.09	63.80
Valleseco I	78.29	73.32	76.52	66.28	65.30	64.35
Valleseco II	65.17	72.29	61.68	59.41	56.14	60.21

\* Mean of three determinations

Table 7b. Recoveries obtained after MAME procedure for the pesticides in five different soils using Stearyl mixture\*.

<b>Soil</b>	<b>4,4'-DDD</b>	<b>Dieldrin</b>	<b>4,4'-DDT</b>	<b>2,4'-DDT</b>	<b>4,4'-DDE</b>	<b>Aldrin</b>
Tafira	103.56	78.62	101.81	62.8	71.78	79.37
San Roque	101.28	46.05	94.37	86.22	75.96	79.96
Sta Brigida	84.72	80.81	78.84	62.43	66.02	65.64
Valleseco I	55.21	56.33	100.65	83.51	44.82	57.45
Valleseco II	54.32	50.2	98.29	68.38	49.15	72.84

\* Mean of three determinations

## Figures

Figure 1

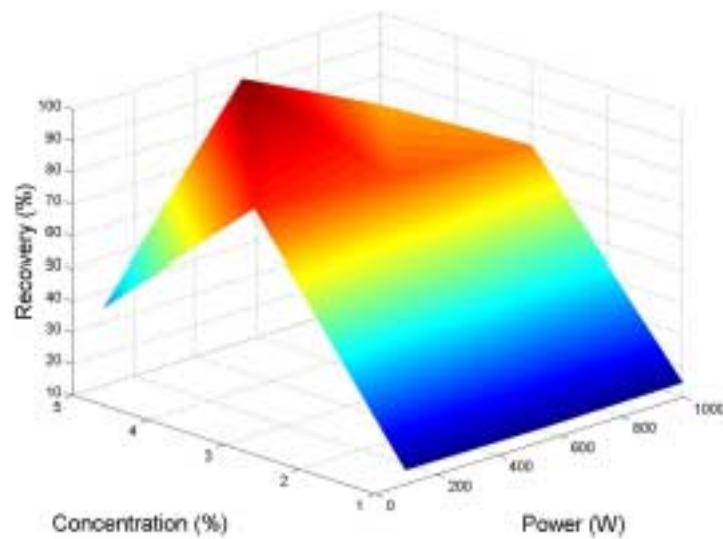


Figure 2a

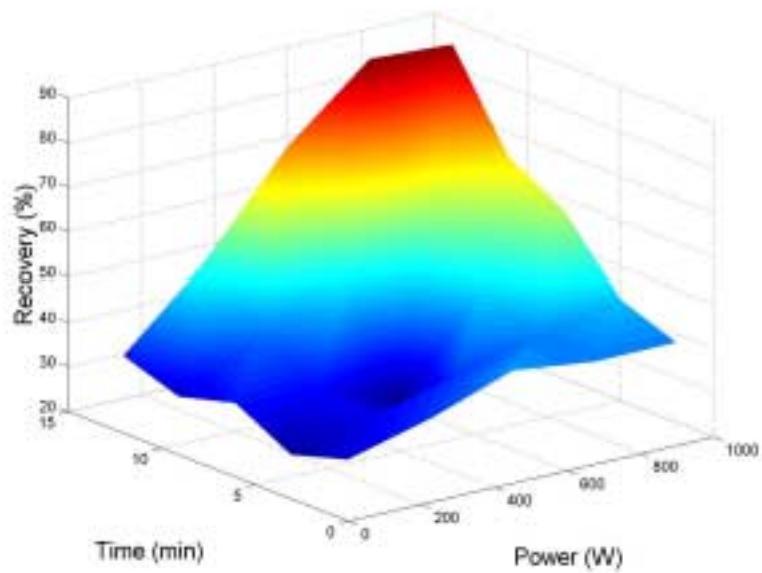


Figure 2b

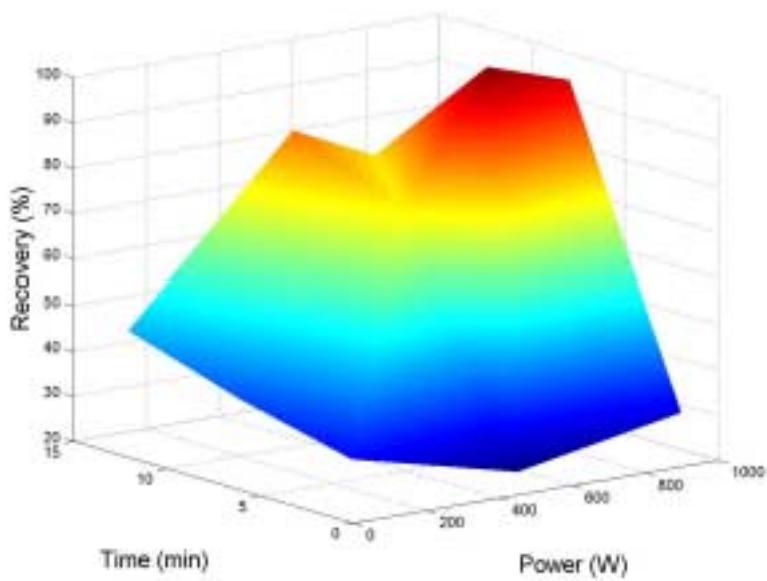


Figure 3

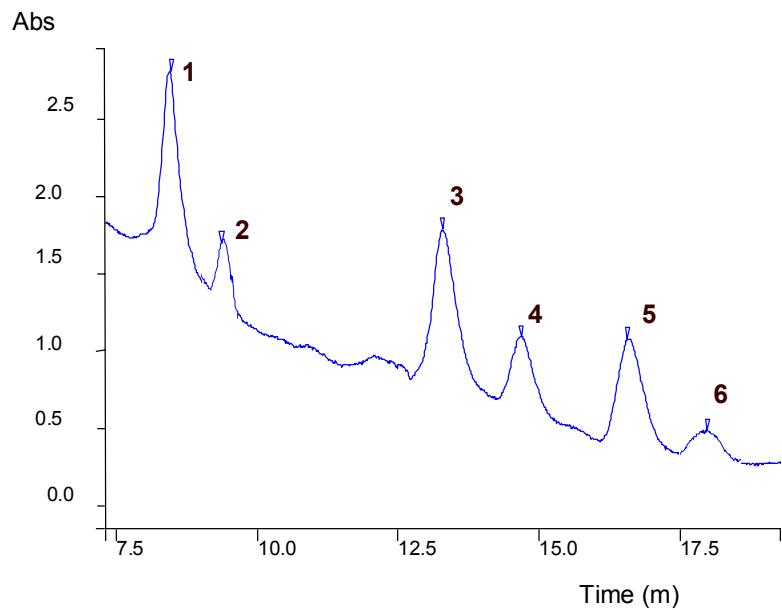


Figure 4a

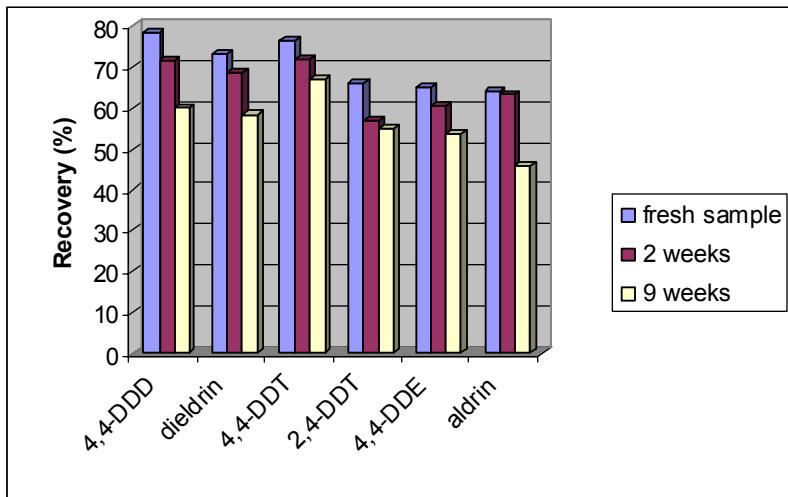
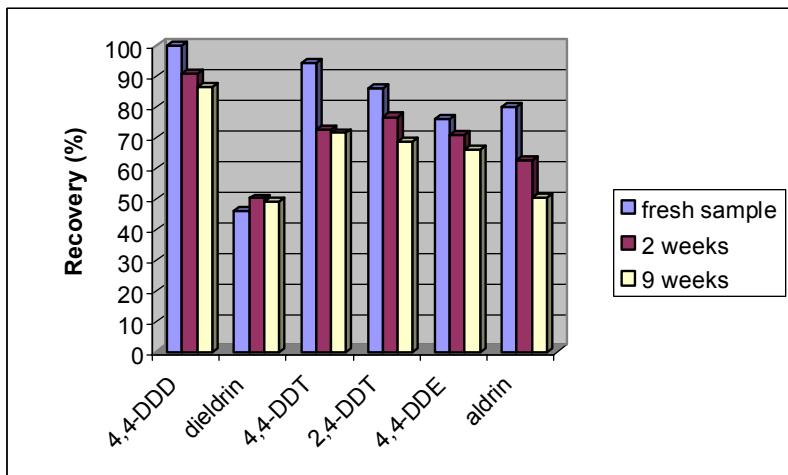


Figure 4b



### **FIGURE CAPTIONS**

Figure 1. Response surface for the effect of surfactant concentration and power on the extraction of 4,4'-DDT using Stearyl mixture.

Figure 2. Response surface for the effect of power and time on the extraction of 4,4'-DDT using Cetyl mixture (a) and Stearyl mixture (b)

Figure 3. Chromatogram of an extract of a spiked Tafira soil after MAME procedure. Chromatographic conditions as described in the text. The numbering refers to table 1.

Figure 4. Recoveries obtained after MAME procedure for the pesticides for three different aging times for Valleseco I soil using Cetyl mixture (a) and San Roque soil using Stearyl mixture (b).