DISTRIBUCIÓN ALTITUDINAL DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN RESERVAS ECOLÓGICAS

ALTITUDINAL DISTRIBUTION OF PERSISTENT ORGANIC COMPOUNDS
IN ECOLOGICAL RESERVES

Daisy Escobar C¹., María del Carmen González L¹.,
José del Carmen Rejón O., Hugo Alejandro Guillén T.¹

RESUMEN

Una de las propiedades más importantes de los plaguicidas organoclorados es su persistencia en el ambiente debido a su resistencia a la degradación fotolítica, química y biológica. Estos compuestos se descomponen muy lentamente en el suelo y son capaces de viajar largas distancias principalmente adheridos al material particulado en las masas de aire, migrando mediante procesos de evaporación y re-deposición desde zonas cálidas a regiones frías, resultando en una amplia distribución incluso encontrándose en regiones donde nunca han sido utilizados.

Los resultados obtenidos indican que, si bien el gradiente altitudinal no tiene una relación directa con la presencia de hexaclorociclohexano en las Reservas Ecológicas estudiadas, su presencia en concentración similares a las encontradas en zonas agrícolas cercanas, nos indican que los procesos de transporte descritos anteriormente se están llevando a cabo.

Palabras clave: Plaguicidas, Reservas de la Biosfera, contaminación.

ABSTRACT

One of the most important properties of organochlorine pesticides is their persistence in the environment due to their resistance to photolytic, chemical and biological de-

gradation. These compounds decompose very slowly in the soil and are able to travel long distances mainly adhered to the particulate material of the air masses, migrating through evaporation and redeposition processes from warm to cold regions, resulting in a wide distribution even in regions where they have never been used.

The results obtained indicate that although the altitudinal gradient does not have a direct relationship with the presence of Hexachlorocyclohexane in the studied Ecological Reserves, its presence in concentration similar to those found in nearby agricultural areas, indicate that the transportation processes described above are conducting.

Keywords: Pesticides, Biosphere Reserves, pollution.

INTRODUCCIÓN

En 1995, el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas determinó el grupo de Compuestos Orgánicos Persistentes (Compuestos orgánicos persistentes) prioritarios para la eliminación de su producción de los cuales, ocho son plaguicidas; aldrín, Clordano, DDT, dieldrin, endrín, heptacloro, mirex y toxofeno; policlorobifenilos (PCBs) y hexaclorobenceno (HCB) como compuestos químicos industriales; y dioxinas y furanos como subproductos de producción no intencional (Linares, 2007).

Los plaguicidas organoclorados son compuestos orgánicos complejos que en su estructura incluyen carbono e hidrogeno (H) y radicales de cloro (Cl), sustituye uno o varios átomos de H por átomos de Cl (Pitarch, 2001) siendo por esto último, persistentes en el ambiente, resistentes a la degradación química, biológica o fotolítica (Orozco et al, 2009). Estos Son de bajo costo y amplio espectro, su persistencia va desde moderada a muy persistentes, y sus residuos se encuentran en el ambiente y en los seres vivos, son compuestos liposolubles, tienen alta solubilidad

¹ Profesores-investigadores de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Chiapas.

en medios hidrocarbonados, como la materia grasa de los seres vivos, se acumulan en el tejido graso y se metabolizan lentamente. Son estables química y bioquímicamente.

Fueron de gran uso hasta la década de 1970 y por sus características de persistencia, se siguen encontrando en el medio ambiente.

El interés por el estudio de los compuestos orgánicos persistentes en zonas altas deriva de estos compuestos permanecen estables durante mucho tiempo y dada su propiedad semivolátil, pueden dispersarse a largas distancias, condensar en las regiones más frías, pasar fácilmente en la atmósfera y depositarse en zonas lejanas a su emisión por lo que se encuentran en todo el mundo independientemente de la zona donde se hayan utilizado. Cuanto más frío es el clima, menor es la tendencia de los Compuestos orgánicos persistentes a evaporarse (Wannia and Mackay, 1996).

En las zonas altas, las temperaturas de aire de día son relativamente bajas, las cantidades de precipitación, la velocidad de viento y el flujo de radiación son relativamente altas comparadas a zonas bajas, mientras que la presión atmosférica es inferior. La interacción de elevación y declives topográficos causa un grado alto de la diversidad de hábitat, o ambiental desigual. Muchas de estas características influyen en el comportamiento ambiental de productos químicos orgánicos, originando que el destino y movimiento de éstos contaminante sea diferente en zonas de montañas que en tierras bajas.

El motivo para estudiar contaminantes orgánicos en ecosistemas altos está relacionado con el impacto potencial en la gente, su vida depende de los recursos obtenidos de esos ecosistemas. Las regiones de montaña sirven como un abastecimiento de agua, tanto directamente como indirectamente dado que generan fuentes de agua para las superficies bajas, además, generan un impacto potencial en sus mismos ecosistemas. Las áreas de montañas altas a menudo acogen especies de plantas únicas y variedades de especies animales de gran valor ecológico.

El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de hexaclorociclohexano (HCH) en diferentes gradientes altitudinales comprendidos dentro del municipio de la Concordía, Chiapas, lo que permito además evaluar el efecto de la materia orgánica en la retención de los compuestos orgánicos persistentes al

abarcas áreas de elevada intensidad agrícola (Distrito de Riego No. 101, Cuxtepequex) y la Reserva de la Biosfera el Triunfo (REBITRI).

Con la finalidad de establecer si existe la relación entre la presencia de Compuestos orgánicos persistentes en la REBITRI debido a la cercanía al Distrito de Riego, se acordó determinar la presencia de HCH en la Reserva de la Biosfera El Ocote (REBISO) como área de elevada vegetación sin áreas agrícolas cercanas.

ÁREAS DE ESTUDIO

La reserva de la Biosfera el Triunfo (REBITRI)

La Reserva de la Biosfera El Triunfo (REBITRI) se localiza en la porción central de la Sierra Madre de Chiapas, entre los 15° 09' 10" y 15° 57' 02", latitud norte y 92° 34' 04" y 93° 12' 42", longitud oeste. Cuenta con una superficie total de 119,177-29-00 has, y abarca parte de los municipios de Pijijiapan, Mapastepec, Acacoyagua, Ángel Albino Corzo, La Concordia, Villa Corzo y Siltepec, forman parte de las regiones económicas Frailesca, Sierra, Istmo-Costa y Soconusco, del estado de Chiapas.

El Triunfo es una de las reservas más diversas del país, se han documentado 989 especies vegetales para la zona núcleo y zona de amortiguamiento. En cuanto a fauna, los vertebrados terrestres de la reserva representan el 24% de ellos en el país y el 47% de las especies de Chiapas. Ocupa el segundo lugar en número de especies de mamíferos (116). Por otra parte, la Sierra Madre de Chiapas es una de las regiones más importantes de hábitat crítico para las aves migratorias, y uno de los sitios prioritarios para su conservación a nivel internacional. Aunado a lo anterior La REBITRI protege a 10 tipos de vegetación, de los 19 con los que cuenta Chiapas, entre ellos destacan dos de los más amenazados en México y en el Estado: el Bosque de Niebla y el Bosque Lluvioso. El primero es reportado como uno de los de mayor diversidad de especies de árboles en Norte y Centro América, y uno de los remanentes más extensos en el país.

La REBITRI se encuentra a 1,850 – 2,150 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), con temperaturas que van de 18–22 °C, por las altas precipitaciones alcanzadas en la reserva, numerosos arroyos y ríos descienden a zonas más baja.

MATERIALES Y MÉTODO

Muestreo

Las muestras de suelo para este estudio fueron obtenidas de la Reserva de la Biósfera el Triunfo, el Distrito de Riego No. 101, Cuxtepeques por su cercanía a la REBITRI y ser una zona de gran actividad agrícola (536-590 m.s.n.m.), y de la Reserva de la Biosfera El Ocote (749-810 m.s.n.m.), cuyas características respecto a actividades antropogénicas son completamente distintas, posteriormente se trataran a detalle. Se obtuvieron 10 muestras compuestas de 15 muestras puntuales cada una; de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.

El muestreo de suelos se realizó a finales del mes de abril encontrándose altitudes entre los 535 y 2,089 m.s.n.m. con características de vegetación similares dependiendo del área estudiada.

En la Reserva de la Biosfera El Triunfo se tomaron 40 muestras puntuales a diferentes altitudes siguiendo el camino principal de la localidad Santa Rita hacia el campamento El Triunfo, ubicado en la zona núcleo 1. En la zona núcleo 3 se tomaron 4 muestras compuestas de 15 muestras simples cada una, en esta última, el muestreo se realizó en línea recta de hasta 3 km tomando de referencia los senderos Finca Cuxtepec, Nueva Alemania, Cerro el Quetzal y Sendero Concepción.

Estas muestras se mezclaron para obtener una muestra representativa de 2 kg por el método de cuarteo; la muestra homogenizada se dividió en cuatro secciones y se eliminaron 2 secciones opuestas. Esta actividad se repitió hasta obtener una muestra representativa no menor a 1 kg. Debido al área que abarca el DDR y la REBISO se colectaron de igual manera 13 y 10 muestras compuestas respectivamente.

Análisis

Los parámetros de materia orgánica (Gaudette et al, 1974), pH (NMX-AA-008-SCFI-2000) y conductividad (NOM-021-RECNAT-2000) fueron determinados para conocer las características de cada tipo de suelo en particular.

Determinación de Compuestos Organoclorados

El control analítico y el análisis de las muestras se efectuó de acuerdo con métodos estandarizados

de UNEP/IOC/IAEA, (1998). Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo marca Varian modelo 3800 equipado con una columna DB-5 (5% fenil) Metilpolisiloxano de 30 m x 0.25 mm x 0.32 mm y un detector de captura de electrones (DCE) con una fuente de Ni⁶³.

Para la identificación de los plaguicidas (compuestos orgánicos persistentes) se usó una mezcla de estándares con α , β , δ y γ -HCH, heptacloro, aldrín, epóxido de heptacloro, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato, dieldrín, *p,p*, DDE, endrín, endrín aldehído, *p,p*, DDD y *p,p*, DDT (SUPELCO® 47426-U CLP Organochlorine Pesticida Mix). La extracción fue asistida por microondas (MAE) Mars Xtraction, CEM Corporation Matthews, modelo 907501, siguiendo la técnica descrita por Wentao et al, 2007. Todas las muestras fueron reconstituidas con hexano hasta 2 mL y que se inyectó al cromatógrafo 1 microlitro. Para obtener las concentraciones, el peso de cada una de las muestras de suelo fue de 5 gr base seca.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron las estadísticas descriptivas correspondientes a 71 muestras de suelos base seca, las cuales se distribuyeron altitudinalmente de la siguiente manera: REBITRI a 1234-2089 m.s.n.m. (n= 48), REBISO a 749-810 m.s.n.m. (n=10) y DDR No. 101 a 536-590 m.s.n.m. (n= 13). La estadística descriptiva se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Estadística descriptiva para Compuestos orgánicos persistentes en las regiones de estudio (REBITRI, REBISO y DDR).

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Σ HCH	0.000	159.357	16.659	29.926

Se comprobó la normalidad de los datos con una prueba de Lilliefors en el programa StatSoft, Inc. (2001) STATISTICA (data analysis software system), versión 7, encontrándose que la materia orgánica es la única que cumple con el supuesto de normalidad (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de normalidad para los Compuestos orgánicos persistentes de las Reservas Ecológicas y Zona Agrícola.

	Prueba de Lilliefors	
	D	p-valor
ΣHCH	0.289	< 0.0001
Materia orgánica	0.094	0.128

Se procedió a realizar las pruebas de homocedasticidad mediante la prueba de Levene, demostrándose que no existe homogeneidad en las variables de acuerdo con el gradiente altitudinal. Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos de estudio se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de HCH en suelos de la REBITRI, REBISO y DDR.

Localidad	altitud	Alfa HCH	Beta HCH	Delta HCH	gama HCH	ΣHCH
REBISO	749	N.D	N.D	0.0360	N.D	0.0360
REBISO	776	17.479	58.4173	0.0371	N.D	75.9335
REBISO	760	N.D	47.4673	0.0098	N.D	47.4771
REBISO	779	N.D	0.0432	0.0123	15.1810	15.2365
REBISO	781	N.D	22.9685	N.D	N.D	22.9685
REBISO	779	N.D	56.9793	0.0264	6.9237	63.9293
REBISO	774	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBISO	790	N.D	53.2193	N.D	N.D	53.2193
REBISO	810	N.D	N.D	N.D	20.9391	20.9391
REBISO	759	N.D	42.9422	N.D	N.D	42.9422
Distrito de Riego	539	N.D	N.D	N.D	35.3199	35.3199
Distrito de Riego	536	N.D	33.4699	N.D	14.3924	47.8623
Distrito de Riego	558	N.D	80.9768	N.D	N.D	80.9768
Distrito de Riego	554	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
Distrito de Riego	572	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
Distrito de Riego	567	N.D	21.3326	N.D	N.D	21.3326
Distrito de Riego	586	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
Distrito de Riego	590	N.D	73.3778	N.D	13.7081	87.0859
Distrito de Riego	575	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
Distrito de Riego	575	N.D	N.D	N.D	7.4397	7.4397
Distrito de Riego	570	N.D	N.D	N.D	11.5974	11.5974
Distrito de Riego	570	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
Distrito de Riego	550	6.9628	21.2930	N.D	N.D	28.2558
REBITRI	2035	N.D	N.D	N.D	8.7792	8.7792
REBITRI	2079	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2078	5.7114	N.D	0.0081	N.D	5.7195
REBITRI	2077	N.D	N.D	0.0138	N.D	0.0138
REBITRI	2070	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2081	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2074	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2069	N.D	30.7258	0.0160	N.D	30.7418
REBITRI	2079	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2089	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2078	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001

Tabla 1. (continuación) Niveles de HCH en suelos de la REBITRI, REBISO y DDR.

Localidad	altitud	Alfa HCH	Beta HCH	Delta HCH	gama HCH	ΣHCH
REBITRI	2083	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2074	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2066	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	2085	N.D	N.D	0.0025	N.D	0.0025
REBITRI	2042	N.D	N.D	0.0037	N.D	0.0037
REBITRI	2010	N.D	N.D	0.0073	N.D	0.0073
REBITRI	1957	N.D	24.8155	N.D	N.D	24.8155
REBITRI	1935	N.D	24.4065	N.D	N.D	24.4065
REBITRI	1871	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1794	N.D	N.D	N.D	7.0802	7.0802
REBITRI	1767	N.D	N.D	0.0103	N.D	0.0103
REBITRI	1752	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1698	N.D	84.6707	N.D	35.1112	119.7819
REBITRI	1684	N.D	N.D	0.0042	N.D	0.0042
REBITRI	1641	N.D	N.D	N.D	10.6812	10.6812
REBITRI	1559	N.D	21.9263	N.D	12.2121	34.1383
REBITRI	1599	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1573	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1553	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1540	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1495	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1485	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1417	N.D	101.1088	N.D	58.2480	159.3569
REBITRI	1452	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1354	N.D	14.2613	N.D	N.D	14.2613
REBITRI	1417	N.D	16.5832	N.D	N.D	16.5832
REBITRI	1438	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1384	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1234	N.D	N.D	0.0315	N.D	0.0315
REBITRI	1824	N.D	26.4382	N.D	6.0481	32.4862
REBITRI	1824	N.D	N.D	0.0068	N.D	0.0068
REBITRI	1953	N.D	N.D	0.0162	N.D	0.0162
REBITRI	1953	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1719	N.D	N.D	N.D	6.0191	6.0191
REBITRI	1719	N.D	N.D	N.D	N.D	0.0001
REBITRI	1730	N.D	N.D	N.D	7.0860	7.0860
REBITR	1730	N.D	18.1795	N.D	N.D	18.1795

Una vez verificados los supuestos se procedió al análisis de los datos mediante pruebas no paramétricas. Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis se comparó los niveles de concentración de contaminantes y los gradientes altitudinales.

Los valores de la prueba de Kurskal-Wallis indican que no existe una diferencia significativa entre la concentración de los compuestos orgánicos persistentes y el gradiente altitudinal: Materia orgánica (K-W H= 60.8496, p=0.4091), Sum HCH (K-W H= 63.5516, p=0.3193).

Cuadro 3. Correlación de Spearman para muestras en las Reservas Ecológicas y Zona Agrícola.

	Altitud	Materia Orgánica	β-HCH	γ-HCH	ΣHCH
Localidad	0.765	0.204	-0.366	-0.182	-0.394
Altitud	1.000	0.293	-0.333	-0.250	-0.360
Materia Orgánica	0.293	1.000	0.213	-0.091	0.142

La correlación de Spearman (Rs) se realizó con la finalidad de determinar si existía una relación significativa entre la altitud y las concentraciones de compuestos orgánicos persistentes detectados en los suelos (Cuadro 3).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten observar que si bien el gradiente altitudinal no tiene una relación directa con la presencia de los HCH e incluso en algunos casos esta correlación tiende a ser negativa, la sola presencia de este compuesto orgánico persistente en las Reservas de la Biosfera en una mayor concentración que en el DDR, nos indica que si se están llevando a cabo los procesos de transporte descritos anteriormente y que la materia orgánica presente en estas regiones (REBITRI MO= 0.6994-10.77%; REBISO MO= 8.12-21.64%, DDR MO= 0.19-6.56%), la temperatura, la cobertura vegetal y los regímenes de lluvia pueden estar influyendo para que los valores mayores de HCH se encuentre en las Reservas Ecológicas (valor máx. Σ HCH= 159 ppm en la REBITRI).

Los resultados obtenidos para cada uno de estos compuestos orgánicos persistentes son comparables a los encontrados por Nizzetto et al, (2006) en la región del Valle de Lys, Aosta, Italia cuyas altitudes van de 1100 a 1790 m.s.n.m. a continuación se expresan los valores de la media $\pm$ desviación estándar: α -HCH_{1100m.s.n.m.} = 16 $\pm$ 91, α -HCH_{1400m.s.n.m.} = 35 $\pm$ 166, α -HCH_{1800m.s.n.m.} = 121 $\pm$ 175 en pg/g), a su vez. Estellano et al, (2006) reporta para la Cordillera Real de los Andes, Bolivia, Σ HCH=0.6 $\pm$ 37.61, Tremolada et al, (2007) en Italia, α -HCH=0.06 $\pm$ 0.11, β -HCH=0.04 $\pm$ 0.13, γ -HCH=0.38 $\pm$ 0.43, δ -HCH=0.03 $\pm$ 0.10, Σ HCH=0.51 $\pm$ 0.62, en ng/g base seca, Koci et al,(2007) (α -HCH= <17, β -HCH= <19, γ -HCH=120 $\pm$ 169, δ -HCH= <35, Σ HCH=120 $\pm$ 169, en ng/g base seca.

CONCLUSIONES

El estudio de que los suelos son un excelente medio de transporte para los compuestos orgánicos persistentes, quedó comprobado así como el de que la materia orgánica presente en ellos favorece la retención de estos.

El estudio de compuestos orgánicos persistentes

en regiones montañosas tiene una gran importancia debido a que las reservas generan muchos servicios ambientales necesarios para la salud de los ecosistemas (Daly and Wannia, 2005).

Este trabajo puede ser un acercamiento al conocimiento que juegan no solo el gradiente altitudinal y la temperatura en la migración de los compuestos orgánicos persistentes, sino que además se debe comenzar a estudiar el papel que desempeñan los diferentes tipos de vegetación de las zonas de estudio en la retención de este tipo de compuestos (Nizzetto et al, 2006).

REFERENCIAS

- Daly, G.L.; Wannia, F. (2005): Organic contaminants in mountains.- Environ. Sci. Technol., 39 (2): 385-398.
- Estellano, Victor. (2006). Concentración de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en un gradiente altitudinal durante las estaciones de verano y otoño en la cara oriental de la cordillera Real de los Andes, Bolivia. Acta Nova. 3. 155-169.
- Gaudette, H.E., Flight, L., Toner, D., Folger, M. (1974). A inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. J. Sedim. Petrol., 249-253.44.
- Koci, V., Mlejnek, M. y Kochankova, L. (2007). Toxicological Evaluation of exposed SPMD membranas. Central European Journal of Chemistry, 1:28-34.
- Linares, Reina M. (2007). Evaluación ambiental de plaguicidas organoclorados en sedimentos de la laguna de Chantuto (Chiapas, México) y de la bahía de Santander (Cantabria, España). Tesis doctoral. Universidad de Cantabria, España. Ingeniería Química. 180p.
- Navarrete, D.A., M.P. Alba, I.J. March & E. Espinoza. (1996). Mamíferos de la Selva El Ocote, Chiapas. Pp. 179-207. In: Vázquez, M. A., e I. March (eds). Conservación y desarrollo sustentable en la selva El Ocote, Chiapas. El Colegio de La Frontera Sur, Centro de Estudios para la Conservación de los Recursos Naturales, A. C., y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Nizzetto, L., Jones, K.C., Cerabolini, B., Guardo, A.D. (2006). Acumulación de contaminantes orgánicos persistentes en doseles de diferentes bosques tipo: papel de la composición de las especies y gradientes de temperatura y altitud. Sci. Technol. 40, 6580-6586

- Orozco, F.A., Cole, D.C., Forbes, G., Kroschel, J., Wanigaratne, S., and Arica, D. (2009). Monitoring adherence to the International Code of Conduct: Highly hazardous pesticides in central Andean agriculture and farmers' rights to health. *Int J Occup Environ Health* 15:255–268.
- Pitarch, A. (2001). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. Tesis doctoral, Universidad de Jaume I de Castellón, Castellón.
- Wannia, F. y Mackay, D. (1996) Rastreando la distribución de contaminantes orgánicos persistentes. *Ciencia y tecnología ambientales*, 30, 390A-396A. <http://dx.doi.org/10.1021/es962399q>.
- Wentao, W., Bingjun, M., Xiaoxia, L., Yu, L., Shu, T. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between soxhlet extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chemical Acta*. 602: 211-222.