

## METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE HEXACLOROCICLOHEXANO EN EL ENTORNO DEL POLÍGONO INDUSTRIAL DE TORNEIROS (PORRIÑO-PONTEVEDRA)

E. Concha Graña<sup>1</sup>; M. Barriada Pereira<sup>1</sup>; I. Turnes Carou<sup>1</sup>; M.J. González Castro<sup>1</sup>; S. Muniategui Lorenzo<sup>1\*</sup>; P. López Mahía<sup>1,2</sup>; D. Prada Rodríguez<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica. Universidad de A Coruña, Campus da Zapateira, E-15071 A Coruña, España

<sup>2</sup>Instituto Universitario de Medio Ambiente. Universidad de A Coruña. Liáns, Oleiros, 15179, España.

(\*autor para correspondencia: E-mail: smuniat@udc.es)

**RESUMEN:** Aunque el lindano está prohibido, su persistencia en el medio ambiente y su toxicidad hace que esté incluido como contaminante prioritario en la legislación y sea necesario su evaluación en diferentes matrices ambientales. En este trabajo se proponen y comparan diferentes procedimientos para el análisis de isómeros de HCH y otros pesticidas organoclorados en aguas, suelos y vegetación. Así para muestras líquidas se proponen técnicas de extracción tales como: extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), y extracción micro-líquido-líquido (MLLE). Por lo que respecta a muestras sólidas se estudian técnicas de extracción Soxhlet o con ultrasonidos (US) extracción con energía de microondas (MAE), extracción con líquidos presurizados (PLE). Todos los métodos propuestos tienen buena exactitud, precisión y sensibilidad. La selección del método más adecuado en cada caso dependerá de las características de la muestra que tenga que ser analizada. La metodología desarrollada fue aplicada para evaluar la contaminación causada por residuos de HCH en el polígono de Torneiros, en Porriño.

**Palabras Clave:** Hexachlorociclohexano, métodos de extracción, lindano, PLE, MAE, SPME, SPE, MLLE.

**ABSTRACT:** Lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) and its isomers are toxic and persistent compounds, and for this reason has been restricted by the most recent legislation, and its presence in different environmental compartments is regulated. In this work we propose and compare different sample handling procedures for the determination of these compounds in liquid samples and solid samples: solid and vegetation samples. For liquid samples analysis, the SPE, SPME and MLLE methods were compared. To the analysis of solid matrices different extraction techniques were also proposed: Soxhlet, US, microwave assisted extraction and pressurised liquid extraction. All the methods proposed provide good recoveries, precision and sensitivity, and therefore the selection of the most adequate method depends on the characteristics of the samples to be analysed. An example of application of the methods to the analysis of an area contaminated by hexachlorocyclohexane was also included.

**Keywords:** Hexachlorocyclohexane, extraction methods, lindane, PLE, MAE, SPME, SPE, MLLE.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los pesticidas organoclorados (OrganoChlorine Pesticides, OCPs) son un tipo de productos fitosanitarios destinados a la prevención y/o al control de las plagas que merman o dañan la producción agrícola. La aplicación de estos productos lleva asociada su diseminación en el medioambiente y en algunos casos, la persistencia en el mismo durante largos periodos de tiempo. Esto puede provocar efectos no deseados en organismos y entornos para los que su uso no estaba destinado inicialmente, incluyendo riesgos para la salud de la población expuesta.

Cuando un determinado grupo de compuestos se introduce en el medio ambiente se puede degradar o permanecer en el mismo durante tiempo. En el caso de los pesticidas organoclorados su resistencia a la degradación ha tenido como consecuencia su presencia en aguas, suelos y alimentos (Singh, 2001), ya que una vez volatilizados se distribuyen en el medioambiente contaminando áreas a gran distancia de las regiones agrícolas, e incluso en las zonas ártica y antártica. Debido a la elevada toxicidad su uso es muy restringido, llegando a estar prohibidos en muchos países (Spiric y Saicic, 1998). A pesar de ello, este tipo de compuestos se sigue empleando en muchos países en vías de desarrollo, donde se aplican para luchar contra los insectos y favorecer la producción de alimentos (Pandit, et al., 2001). Su utilización fue desplazada paulatinamente debido a la aparición de nuevos productos. Así, a partir de 1950 los plaguicidas organofosforados ganaron importancia frente a los organoclorados; a finales de los 50 se empezaron a utilizar los carbamatos y a finales de los 70 las piretrinas, que presentan baja toxicidad para las plantas y mamíferos, aunque elevada toxicidad para peces, insectos e invertebrados.

Los OCPs comprenden un grupo de compuestos orgánicos de síntesis derivados

de hidrocarburos complejos, en los que uno o varios átomos de hidrógeno están sustituidos por cloro. Según su estructura, los OCPs se pueden dividir en cinco grupos: DDT y derivados, isómeros del HCH, derivados del ciclodieno, toxafeno y compuestos relacionados, y sustancias con estructuras tipo mirex y clordecon (García Cambero and Soler Rodríguez, 2005).

Tienen una gran estabilidad tanto química, debida a su baja reactividad, como frente a agentes como el aire, la luz y el calor. Esta estabilidad se manifiesta en su persistencia en el medio ambiente que se incrementa cuanto mayor es el grado de cloración del compuesto.

El gran tamaño y la masa de los átomos de cloro reducen la solubilidad de estos compuestos en agua, e incrementa su solubilidad en lípidos y por consiguiente, la bioacumulación. Debido a esta propiedad, los pesticidas organoclorados pueden alcanzar concentraciones elevadas en depredadores que se encuentran en la cima de la cadena trófica. Este fenómeno se denomina biomagnificación.

La molécula de hexaclorociclohexano (HCH) (**figura 1**) tiene 8 posibles isómeros dependiendo de la posición de los átomos de cloro. De todos ellos, el isómero  $\gamma$  (llamado lindano) es el biológicamente más activo, mientras que los isómeros  $\alpha$  y  $\delta$  son mucho menos tóxicos, y los isómeros  $\beta$  y  $\epsilon$  son casi inertes. La mezcla técnica contiene un 13% del isómero  $\gamma$ , 68% de  $\alpha$  y pequeñas cantidades de  $\beta$  y  $\delta$ .

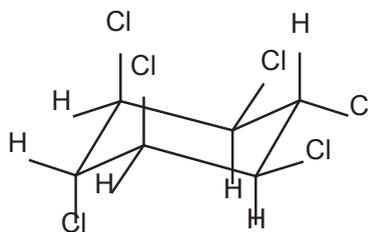


Figura 1. Lindano ( $\gamma$ -HCH).

Tabla1. Propiedades físicas de los isómeros mayoritarios de HCH. ([www.pops.int/documents/meetings/poprc/submissions/Comments\\_2006/draft\\_risk\\_profile/techcomments16june/lindane/Physical%20chemical%20properties%20of%20HCH.doc](http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/submissions/Comments_2006/draft_risk_profile/techcomments16june/lindane/Physical%20chemical%20properties%20of%20HCH.doc))

Nombre	g-HCH (lindano)	a-HCH	b-HCH
	(1a,2a,3b,4a,5a,6b)- 1,2,3,4,5,6- hexachlorociclohexano	(1a,2a,3b,4a,5b,6b)- 1,2,3,4,5,6- hexachlorociclohexano	(1a,2b,3a,4b,5a,6b)- 1,2,3,4,5,6- hexachlorociclohexano
CAS#	58-89-9	319-84-6	319-85-7
Punto de ebullición (°C) <sup>a</sup>	112-113	159-160	309-310
Solubilidad en agua a 25°C (S <sub>ws</sub> , mol/m <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	0.0074-0.052	0.00560-0.00698	0.000688-0.00241
Presión de vapor a 20°C (sólido, Pa) <sup>b</sup>	1.25-23.3 x 10 <sup>-3</sup>	3.33 x 10 <sup>-3</sup>	2.90-3.73 x 10 <sup>-5</sup>
Cte de Henry a 20-25°C (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0.140-0.52	0.38-1.239	0.022-0.045
Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>	3.7 ± 0.5	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1
Log K <sub>oc</sub> <sup>c</sup>	3.0, 3.57	3.57	3.57

<sup>a</sup>cited in Willett et al., 1998 (Willett, et al., 1998) based on laboratory studies and general populations. Higher in cold-climate ecosystems (see section on bioconcentration)

<sup>b</sup>Xiao et al., 2004 (Xiao, et al., 2004). Range reported from literature

<sup>c</sup>cited in [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43-c4.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43-c4.pdf)

El lindano puro es un sólido blanco casi inodoro, poco soluble en agua, moderadamente soluble en keroseno y muy soluble en acetona y es estable a la luz y al calor. Las propiedades más destacadas para los isómeros mayoritarios se recogen en la **tabla 1**.

El isómero gamma es tóxico para el hígado, el sistema inmunológico, y reproductivo. Los efectos más comunes, asociados a la exposición oral a lindano, son los neurológicos, incluyendo ataques y convulsiones en personas que accidental o intencionadamente tomaron lindano contenido en bolitas de insecticida, en líquido antipiojos o en alimento contaminado. Se ha demostrado que los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  tienen efectos neurotóxicos, hepato-tóxicos y causan efectos inmuno-supresores y cancerígenos en animales de laboratorio. Algunos estudios epidemiológicos indican que podrían estar vinculados al cáncer de mama en seres humanos.

El uso de isómeros de HCH como insecticidas se ha restringido desde los años 70 debido a su toxicidad, pero el problema de

la presencia de residuos de isómeros de HCH aún continúa debido a su persistencia en el medio ambiente (Gupta, et al., 2001).

Los pesticidas organoclorados se han incluido en el Protocolo de COPs (Contaminantes Orgánicos Persistentes) del órgano ejecutivo del Convenio de Ginebra de 1998, en el Reglamento 850/2004/CE (2004) y en la lista de sustancias a eliminar y/o restringir a escala global por el Convenio de Estocolmo (Cuarta Reunión de la Conferencia de las Partes del Convenio de Estocolmo celebrada en Ginebra en mayo de 2009). Igualmente en el Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo y del Reglamento 850/2004 sobre COPs.

Además, la presencia de isómeros de lindano en distintos medios está legislada; así, en la Directiva Marco del Agua 2000/60/CE y en la Directiva hija 2008/105/CE se establece una concentración máxima admisible para el hexaclorociclohexano de 0.02-0.04  $\mu\text{g/L}$  dependiendo del tipo de agua superficial considerada. Recientemente, esta última Directiva ha sido transpuesta a la legislación española, mediante el Real

Decreto 60/2011 (BOE nº19 de 22 de enero de 2011), de 21 de enero, sobre normas de calidad ambiental en el ámbito de políticas de aguas. Asimismo, incorpora los requisitos técnicos sobre análisis químicos establecidos en la Directiva 2009/90/CE de la Comisión, de 31 de julio de 2009; es decir, los criterios mínimos que se deberán aplicar a los métodos de análisis para el seguimiento del estado de las aguas, sedimentos y biota, así como las normas dirigidas a demostrar la calidad de los resultados analíticos. En la Comunidad Autónoma de Galicia, estas Directivas han sido transpuestas mediante la Ley 9/2010, de 4 de noviembre, de aguas de Galicia (DOGA nº222 de 18 de Noviembre de 2010).

En cuanto a suelos, en la Comunidad Autónoma de Galicia, el Decreto 263/1999 de 30 de septiembre (DOGA 186 de 24 de septiembre de 1999) (corrección de errores DOGA 210 de 29 de octubre de 1999) fija la concentración límite en suelos afectados por vertidos de residuos de HCH. La concentración límite (límite superior de aceptabilidad de riesgo) de HCH que establece para la intervención en suelo, cualquiera que sea su naturaleza y uso, es de 2 mg/kg (materia seca), entendiéndose como HCH la suma de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  del hexaclorociclohexano.

En aire no están legislados estos compuestos. En matrices vegetales hay legislación referente a los límites máximos de residuos (MRLs) de plaguicidas en frutas y hortalizas. El marco actual de la fijación de MRLs en España, se basa en el Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establecen los límites máximos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, que supone la incorporación al Ordenamiento jurídico interno de la Directiva 90/642/CEE. Actualmente la Directiva 90/642/CEE ha sido derogada por el Reglamento (CE) nº 396/2005, con el que se proponen límites máximos

armonizados para todos los productos alimenticios, incluyendo además la misma protección para los productos alimenticios destinados a los animales. No están sujetos a los límites establecidos en este Reglamento los productos destinados a la siembra o a la plantación, a pruebas autorizadas sobre las sustancias activas, a la fabricación de productos que no sean alimentos o a la exportación fuera de la Unión Europea. De acuerdo con este Reglamento el contenido máximo de residuos de plaguicidas en los alimentos se sitúa en 0.01 mg/kg. Este límite general es aplicable por defecto, es decir, en todos los casos en que no se haya fijado un MRL específico para un producto o tipo de producto.

Dadas las características de los pesticidas organoclorados y la legislación mencionada para cada tipo de matriz, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos exactos, precisos, sensibles y rápidos que permitan determinar estos compuestos en diferentes matrices ambientales a concentraciones inferiores a las establecidas en la legislación. Las técnicas analíticas utilizadas habitualmente para su determinación se centran en la cromatografía de gases (GC) acoplada con distintos sistemas de detección como el detector de captura de electrones (ECD) o la espectrometría de masas (MS), uniéndose así el poder de separación de la cromatografía de gases con la sensibilidad y selectividad de estos detectores. A pesar de la buena sensibilidad de la técnica, y dada la necesidad de proponer metodologías aplicables a diferentes matrices en las cuales los pesticidas se encuentran normalmente a niveles de traza y en presencia de otros compuestos altamente similares, será necesario desarrollar diferentes protocolos de preparación previa de la muestra en función de la matriz que interese analizar en cada caso y de los niveles de concentración que sea necesario alcanzar.

En este trabajo se presentan los resultados más destacables del Convenio financiado por la Xunta de Galicia relacionado con el “Establecimiento de métodos analíticos, caracterización de la zona de estudio y seguimiento de los niveles de pesticidas en los procesos de biorremediación aplicados en los suelos afectados por HCH en el polígono de Torneiros, Porriño-Pontevedra”. En dicho estudio además del análisis de suelos hubo que aportar soluciones para el análisis de todas las matrices relacionadas: muestras acuosas y lixiviados, vegetación y medios de cultivo empleados en estudios de biorremediación en la zona. También se ha demostrado la aplicabilidad de la metodología propuesta al análisis de pesticidas organoclorados en otro tipo de muestras de interés ambiental y alimentario.

A continuación se proponen y comparan diferentes procedimientos para el análisis de pesticidas organoclorados en aguas, suelos, vegetación y otras matrices de interés. Así para muestras acuosas se proponen diferentes técnicas de extracción tales como: extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), y extracción micro-líquido-líquido (MLLE). Por lo que respecta a muestras sólidas, tanto de suelos como de vegetación se estudian desde técnicas más clásicas como extracción Soxhlet o con ultrasonidos (US) pasando por técnicas de extracción con energía de microondas (MAE), a técnicas de extracción con líquidos presurizados (PLE) y microextracción en fase sólida acoplada a extracción con agua subcrítica (PHWE –SPME). Este estudio y comparación de métodos puede ser de utilidad para laboratorios de análisis y control, ayudándoles a seleccionar el método más apropiado en función de la matriz y los niveles a los que tengan que determinar los pesticidas organoclorados.

## 2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ISÓMEROS DE HEXACLOROCICLOHEXANO

Como ya se ha mencionado para el análisis de pesticidas organoclorados, y por tanto de isómeros de hexaclorociclohexano, compuestos relativamente volátiles y termoestables, la técnica más ampliamente utilizada es la cromatografía de gases, debido a su alta resolución y a la posibilidad de utilizar detectores muy sensibles y específicos. Aunque esta investigación se centra en el estudio de los isómeros del HCH, se han desarrollado metodologías que permiten la separación en un único análisis de 21 pesticidas organoclorados susceptibles también de poder estar presentes en las muestras.

Las columnas cromatográficas que se utilizan en la separación de los pesticidas son capilares recubiertas de fases no polares, siendo las más habituales las que contienen un 5% de fenil-metilsiloxano. Existen también columnas especiales para el análisis de pesticidas organoclorados, con fase metil-fenil-cianosilicona, que consiguen una mejor separación de los compuestos. Aunque para separar los cuatro isómeros de HCH no es necesario utilizar una columna especial.

En lo referente a la detección, normalmente se utiliza un detector específico como el detector de captura de electrones, altamente sensible a compuestos con átomos electronegativos en sus moléculas, como es el caso de los pesticidas organoclorados (Concha-Graña, et al., 2001).

Con el fin de mejorar la sensibilidad se han estudiado diferentes modos de incrementar la cantidad inyectada en el cromatógrafo. Además de la inyección habitual de Split/splitless, se ha optimizado un método de inyección con temperatura programada (PSS) que permite aumentar hasta 20  $\mu$ L la cantidad de muestra que se puede introducir en el

cromatógrafo con la consiguiente reducción de los límites de detección y de la cantidad de muestra que se necesita procesar, tanto para matrices líquidas como sólidas (Concha-Graña, et al., 2004).

También se ha estudiado la inyección de grandes volúmenes directamente en la columna cromatográfica (LVOCI *large volume on column injection*). Este sistema de inyección ofrece ciertas ventajas como precisión, mayor transferencia de muestra, eliminación del sangrado del septum y no descomposición de productos termolábiles dado que la inyección se hace a la temperatura de la columna. Con el método propuesto se ha conseguido alcanzar holgadamente los restrictivos límites establecidos en la nueva directiva de aguas en vigor (Concha-Graña, et al., 2009).

A pesar de que la técnica GC-ECD es altamente utilizada en los laboratorios de rutina y control, la tendencia actual en el análisis de pesticidas es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas dado que este sistema de detección proporciona una mayor información cualitativa permitiendo la confirmación mediante el espectro de masas, auténtica

huella dactilar del compuesto. La combinación de técnicas de inyección de gran volumen y la detección con espectrometría de masas (Concha-Graña, et al., 2002) ha supuesto una importante contribución a la determinación de pesticidas en matrices complejas y de gran utilidad cuando es necesario la identificación de productos de degradación a niveles de ultratrazas (Barriada-Pereira, et al., 2005, Concha-Graña, et al., 2006).

Se ha evaluado también el acoplamiento de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) a un equipo de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. La ventaja fundamental de este método es que permite una mayor automatización de todo el proceso (Concha-Graña, et al., 2007).

Resaltar que todos los métodos cromatográficos propuestos fueron convenientemente validados en términos de linealidad, precisión y sensibilidad. A modo de ejemplo en la **figura 2** se muestra un cromatograma obtenido con el método GC-ECD utilizando una columna capilar de fase específica metil-fenil-cianosilicona en el cual se puede observar la separación de los isómeros de HCH y de los otros pesticidas incluidos en estos estudios.

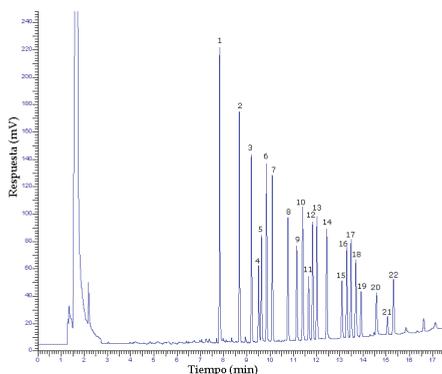


Figura 2. Cromatograma de un patrón de pesticidas organoclorados analizado por GC-ECD. 1TCMX (IS), 2  $\alpha$ -HCH, 3  $\gamma$ -HCH, 4  $\beta$ -HCH, 5 Heptacloro, 6  $\delta$ -HCH, 7 Aldrín, 8 Isodrín, 9 Heptacloropóxido, 10  $\gamma$ -Clordano, 11  $\alpha$ -Clordano, 12  $\alpha$ -Endosulfán, 13 p,p'-DDE, 14 Dieldrín, 15 Endrín, 16 p,p'-DDD, 17  $\beta$ -Endosulfán, 18 p,p'-DDT, 19 Endrín aldehído, 20 Endosulfán sulfato, 21 Metoxicloro 22 Endrín cetona.

### 3. TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ISÓMEROS DE HCH

En el análisis de pesticidas en muestras medioambientales es muy importante tener en cuenta la concentración del analito en la muestra, la complejidad que presenta la matriz en cuanto a su composición y presencia de sustancias interferentes a la hora de elegir la técnica de preparación de muestra más adecuada en cada caso.

A continuación se llevará a cabo una breve descripción de diferentes métodos de tratamiento de muestra utilizados en el análisis de isómeros de HCH tanto en matrices líquidas (aguas, lixiviados...), como sólidas (suelos, sedimentos, vegetación, etc)

#### 3.1. Muestras líquidas

Las técnicas más empleadas en la preconcentración de pesticidas en muestras líquidas pueden englobarse en dos grupos: aquellas en las que se produce la extracción a una fase líquida (extracción líquido-líquido, microextracción líquido-líquido, extracción con fluidos supercríticos, extracción con membranas semipermeables...); y aquellas en las que se produce el atrapamiento de los analitos sobre un adsorbente (extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, extracción con barra agitadora...). En este caso, para el análisis de isómeros de hexaclorociclohexano en muestras acuosas se proponen tres métodos.

El primero de ellos consiste en el empleo de la extracción en fase sólida. La SPE es una de las técnicas que la Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (USEPA) propone para el análisis de pesticidas organoclorados de muestras de aguas, Método EPA 508.1. El método de SPE que se propone en este trabajo se basa en el uso de discos laminares  $C_{18}$  cuya ventaja sobre los discos clásicos de SPE consiste en que permite un mejor contacto entre el adsorbente

y los analitos, y por lo tanto se pueden aplicar unos flujos más elevados de paso de muestra, incluso en el caso de muestras que contengan sólidos en suspensión, sin necesidad de realizar una filtración previa para evitar la obturación de los poros del adsorbente. Esto se consigue gracias a la disposición de las partículas del adsorbente sobre una estructura laminar. Para el análisis se pasan 500 mL de agua mediante aspiración a través del disco, convenientemente acondicionado. Una vez pasada toda la muestra se seca el disco mediante aspiración, y posteriormente los analitos son eluidos del mismo con 10 mL de acetato de etilo y 3 mL de hexano. El eluato se concentra en rotavapor y corriente de nitrógeno, y se redissuelve en 1 mL de hexano que será inyectado en el cromatógrafo (Concha-Graña, et al., 2001). Este método es laborioso, pero permite analizar bajas concentraciones de isómeros de hexaclorociclohexano, incluso de muestras acuosas "sucias", o que contengan particulado como pueden ser las muestras de lixiviados.

El segundo método que se propone es la microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica consiste en poner en contacto un pequeño volumen de muestra (en este caso 18 mL de agua) al que se le añade un 5% de metanol, con una fibra de sílice fundida recubierta con una fase mixta de 65  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB). La fibra se expone durante 45 minutos a la muestra que se mantiene a 60 °C y se agita en el accesorio de incubación del inyector automático del cromatógrafo. Una vez extraídos los analitos, son directamente desorbidos térmicamente en el inyector del cromatógrafo y analizados por GC-MS. La principal ventaja de este método es que está totalmente automatizado, reduciendo al máximo la manipulación de la muestra, y las pérdidas por evaporación durante la etapa de concentración de los isómeros de HCH. Como inconveniente, se precisa de

Tabla 2. Características analíticas de los métodos propuestos para el análisis de los isómeros de HCH en muestras acuosas.

Pesticida	SPE-GC-ECD		SPME-GC-MS-SIM		MLLE-LVOCI-GC-ECD	
	LD (ng/L)	%R (%DER)	LD (ng/L)	%R (%DER)	LD (ng/L)	%R (%DER)
$\alpha$ -HCH	2.3	98 (3)	7.0	91 (4)	1.76	69 (0.9)
$\beta$ -HCH	6.9	104 (4)	16.5	92 (8)	25.2	90 (0.9)
$\gamma$ -HCH	1.1	96 (5)	23.6	88 (8)	1.74	73 (1)
$\delta$ -HCH	4.0	97 (7)	22.2	94 (7)	17.0	97 (0.6)

equipamiento especial para poder llevar a cabo todo el proceso de forma automatizada (Concha-Graña, et al., 2007).

El tercero de los métodos propuestos es la microextracción líquido-líquido (MLLE), que se ha desarrollado basándose en el método EPA 505. Para ello 10 mL de muestra de agua se extraen con 2 mL de acetato de etilo mediante agitación mecánica durante 1 min. 100  $\mu$ L del extracto orgánico obtenido se inyectan en un GC-ECD equipado con inyector de grandes volúmenes on-column (LVOCI), con el fin de obtener la sensibilidad suficiente para la determinación de los isómeros de hexaclorociclohexano (Concha-Graña, et al., 2009). Las principales ventajas de este método son su rapidez, el bajo volumen de muestra, y no requerir equipamientos costosos. El principal inconveniente es que este método solo puede aplicarse a muestras acuosas relativamente limpias, y sin particulado, ya que de lo contrario el sistema cromatográfico puede resultar dañado.

En la **tabla 2** se muestran los límites de detección (LD), las recuperaciones analíticas (%R) y desviaciones estándar relativas (%DER) obtenidas para los 4 isómeros más importantes del hexaclorociclohexano en muestras de agua superficial con los métodos propuestos.

Como se puede observar, las mayores recuperaciones analíticas se obtienen con el método de SPE y de SPME, mientras que con el de MLLE las recuperaciones de los isómeros  $\alpha$  y  $\gamma$  son algo bajas, debido probablemente a pérdidas en el sistema de

inyección. Las desviaciones estándar relativas están en todos los casos por debajo del 10 %, lo cual indica una muy buena precisión, siendo especialmente bajas las obtenidas con el método MLLE-LVOCI-GC-ECD. En cuanto a los límites de detección, los mejores valores son los obtenidos con el método de SPE, pero hay que tener en cuenta que en este caso el volumen de muestra procesado es de 500 mL, mientras que en los otros dos casos no llega a 20 mL. Por lo tanto, a la hora de seleccionar cual de estos métodos es el más adecuado para las muestras que queremos tratar, habrá que tener en cuenta, como se dijo anteriormente, el nivel en el cual se encuentran los analitos en la muestra, las sustancias interferentes, etc.

### 3.2. Muestras sólidas

Las técnicas más utilizadas en la extracción de pesticidas organoclorados de muestras sólidas pueden agruparse en técnicas que utilizan disolventes para la extracción (agitación, extracción Soxhlet, extracción mediante energía de microondas, extracción con líquidos a presión...), la extracción con fluidos supercríticos, y la extracción con agua subcrítica.

Las técnicas clásicas, como la extracción Soxhlet o la agitación, presentan algunas desventajas tales como el uso de grandes volúmenes de disolvente orgánico y largos tiempos de extracción. Con el fin de mejorar estas limitaciones, se han desarrollado nuevas técnicas en las que se mejora el contacto de los analitos con el disolvente de extracción,

mediante el uso de energía de microondas (MAE) o altas presiones (PLE) que permiten un mayor calentamiento, y así reducir el volumen de disolvente necesario para realizar la extracción y el tiempo empleado en la misma.

La extracción mediante energía de microondas ha sido ampliamente utilizada en el análisis de compuestos orgánicos desde la primera aplicación en el año 1986 (Ganzler, et al., 1986) y ha sido propuesto por la EPA en su método 3546 para el análisis de compuestos orgánicos.

Se han optimizado métodos basados en la extracción con energía de microondas tanto para muestras de suelo (Concha-Graña, et al., 2003) como de vegetación (Barriada-Pereira, et al., 2003). Para ello, la muestra se introduce en un reactor de teflón, se le añaden 10 mL de una mezcla hexano:acetona (1:1) como extractante y se somete a un determinado programa de potencia de energía de microondas con una rampa que sube de 100 a 800W durante 2 minutos y luego se mantiene a esta potencia durante 8 minutos. En estas condiciones se alcanza una temperatura dentro de los reactores comprendida entre 95 y 107 °C. En el caso de la vegetación se ha realizado también una comparación del método propuesto con la extracción en Soxhlet, que es una técnica clásica que, todavía se emplea en muchos laboratorios para análisis de rutina y como técnica de referencia con la que comparar otras técnicas más recientes dada su gran reproducibilidad y efectividad (Quan, et al., 2004).

En la **tabla 3** se muestran los límites de detección, las recuperaciones analíticas y desviaciones estándar relativas obtenidas para los 4 isómeros más importantes del hexaclorociclohexano en muestras de hierba con el método MAE y el método Soxhlet (nivel de concentración de 330 µg/kg muestra liofilizada).

Tabla 3. Comparación de las características analíticas de los métodos de extracción con energía de microondas y de Soxhlet propuestos para el análisis de los isómeros de HCH en hierba.

Pesticida	MAE-GC-ECD		Soxhlet-GC-ECD	
	LD (µg/kg)	%R (%DER)	LD (µg/kg)	%R (%DER)
α-HCH	16	94 (6)	17	95 (6)
β-HCH	13	101 (3)	16	93 (5)
γ-HCH	11	98 (1)	12	99 (4)
δ-HCH	14	108 (4)	16	116 (6)

Las recuperaciones obtenidas muestran que ambos métodos son adecuados para la determinación de pesticidas organoclorados en muestras de vegetación. El test de varianza (ANOVA) mostró que no había diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre ambas.

Cuando se realiza la extracción de los isómeros de HCH de matrices de gran complejidad, como suelos, sedimentos, y vegetación es necesario eliminar los componentes interferentes presentes en cada tipo de matriz, para evitar resultados inexactos, reducir los límites de detección y de cuantificación y además retrasar el deterioro de la columna cromatográfica (Vidal et al., 2002). Para ello es necesario realizar una etapa de purificación, previa a su análisis cromatográfico. Esta etapa habitualmente consiste en una extracción en fase sólida, utilizando el adsorbente más apropiado en función de las características particulares de cada matriz. Se han estudiado diferentes adsorbentes como el florisil, gel de sílice, alúmina y carbón activo o incluso combinaciones de los mismos. El adsorbente con mayor capacidad de limpieza de los extractos ha sido el carbón activo. Aunque en algunas aplicaciones concretas se han utilizado florisil o alúmina, han sido los cartuchos SPE que contienen 1 g de Envi-carb de 100 m<sup>2</sup>/g los propuestos para la limpieza de la mayoría de los extractos (Concha-Graña, 2004).

Otro método utilizado para el análisis de isómeros de hexaclorociclohexano de muestras sólidas consiste en la extracción mediante líquidos a presión (PLE), introducida en 1995 por Richter y recogida en el método EPA 3545. Este tipo de extracción realizada en un equipo ASE® de Dionex, está totalmente automatizada. Presenta algunas ventajas frente a la extracción con energía de microondas, como es una menor pérdida de compuestos térmicamente lábiles gracias al uso de altas presiones, la posibilidad de uso de casi cualquier tipo de disolvente, no precisa de filtración del extracto y es posible realizar diferentes ciclos de extracción sobre una misma muestra. Su principal inconveniente es el elevado coste de los equipos y fungibles, y la falta de reproducibilidad del volumen del extracto obtenido (Giergielewicz-Mozajska, et al., 2001).

Esta técnica de extracción también ha sido aplicada a las diferentes matrices de interés en esta investigación después de haber superado ciertos problemas con los blancos de las celdas de extracción (Fernández-González, et al., 2005). Para el análisis de muestras de suelos y sedimentos se mezcla en un mortero 1 g de muestra con 0.25g de tierra de diatomea, que es un agente dispersante utilizado para mejorar el contacto entre la muestra y el disolvente, hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación esta mezcla se introduce en las celdas de acero de 5 mL, en la cual se ha introducido un filtro de celulosa para evitar el taponamiento de las fritas con partículas de muestra. La celda es introducida en un horno donde se extrae con una mezcla de hexano:acetona (1:1) a 100°C y 1500 psi durante 5 minutos de tiempo de extracción estática. Este método de extracción fue validado utilizando materiales certificados de distinta matrices sólidas: suelo, sedimento y polvo urbano. Se ha obtenido una buena concordancia estadística entre los resultados aplicando el método propuesto y los valores

certificados o de referencia indicados en cada material (Concha-Grana, et al., 2007).

En la **tabla 4** se detallan los límites de detección, las recuperaciones analíticas y desviaciones estándar relativas (nivel de concentración de 100 µg/kg) obtenidas para los 4 isómeros más importantes del hexaclorociclohexano en muestras de suelo con el método MAE y el PLE propuestos y purificados siguiendo los esquemas descritos en los párrafos anteriores.

Tabla 4. Características analíticas de los métodos propuestos para el análisis de los isómeros de HCH en muestras de suelo.

Pesticida	MAE-GC-ECD		PLE-GC-ECD	
	LD (µg/kg)	%R (%DER)	LD (µg/kg)	%R (%DER)
α-HCH	5.3	109 (5)	6.1	97 (4)
β-HCH	0.39	102 (14)	8.1	130 (16)
γ-HCH	5.3	108 (4)	2.9	96 (4)
δ-HCH	7.7	109 (4)	7.9	103 (4)

Como puede observarse, con los dos métodos se obtienen resultados similares y ambos pueden considerarse adecuados para la determinación de los isómeros de HCH de muestras de suelos.

También se ha optimizado y propuesto un método de PLE para las muestras de vegetación. Para esta aplicación la cantidad de muestra se ha reducido hasta 0,3 g de muestra liofilizada y manteniendo la misma proporción de agente dispersante. Se ha realizado el análisis en las mismas condiciones descritas para suelos excepto que la temperatura se ha incrementado hasta 110 °C (Barriada-Pereira, et al., 2007).

En la **tabla 5** se muestran los límites de detección, las recuperaciones analíticas y desviaciones estándar relativas obtenidas para los 4 isómeros más importantes del hexaclorociclohexano en muestras de espinaca con los métodos MAE y el PLE propuestos (nivel de concentración de 16 µg/kg muestra).

Tabla 5. Características analíticas de los métodos propuestos para el análisis de los isómeros de HCH en muestras de espinaca (ejemplo de matriz vegetal).

Pesticida	MAE-GC-ECD		PLE-GC-ECD	
	LD (µg/kg)	%R (%DER)	LD (µg/kg)	%R (%DER)
α-HCH	0.7	87 (3)	1.8	97 (4)
β-HCH	1.8	108 (15)	4.1	83 (2)
γ-HCH	0.9	81 (4)	2.1	99 (12)
δ-HCH	1.0	89 (2)	2.3	97 (8)

Las recuperaciones analíticas obtenidas con los métodos propuestos fueron cercanas al 100% y las desviaciones estándar relativas inferiores al 15%. Los valores obtenidos para los límites de detección muestran que ambos métodos son adecuados para la extracción de isómeros de HCH en muestras de hortalizas en las concentraciones establecidas por la Unión Europea en los MRLs,

A pesar de que las técnicas clásicas de extracción han sido sustituidas en muchos casos por técnicas más actuales en ocasiones estas técnicas pueden resultar muy útiles para el análisis de determinados tipos de muestra. Cuando se analiza una muestra sólida con una elevada concentración de contaminante, a veces puede realizarse una simplificación del tratamiento de muestra, y puede resultar más rápido y económico el empleo de una técnica clásica.

Por este motivo, se propone un método de extracción mediante agitación con ultrasonidos, que se utilizará para el análisis de los isómeros de HCH en aquellas muestras con un elevado contenido de HCH (superiores a 5 µg/g), o como método *screening*. (Concha-Graña, et al., 2006).

Se utiliza un baño de ultrasonidos en el cual pueden extraerse varias muestras simultáneamente. 0.4 g de suelo seco y tamizado se extraen con 30 mL de la mezcla hexano:acetona (1:1), durante 30 min de agitación. En este caso, dado los niveles de

concentración de los isómeros de HCH para los cuales se propone el método (>5 µg/g), no es necesario concentrar el extracto. Tampoco se realizará la purificación del mismo, ya que los posibles interferentes apenas tienen influencia en los resultados.

En la **tabla 6** se muestran las recuperaciones analíticas, desviaciones estándar relativas y límites de detección obtenidos para este método (a un nivel de sobrecarga de 6250 µg/kg).

Tabla 6. Características analíticas del método de extracción con ultrasonidos propuestos para el análisis de suelos con altos niveles de los isómeros de HCH.

Pesticida	US-GC-ECD	
	LD (µg/kg)	%R (%DER)
α-HCH	23	84 (1.6)
β-HCH	106	94 (1.4)
γ-HCH	28	88 (0.7)
δ-HCH	32	80 (7)

Como se puede observar al comparar estos resultados con los de los otros dos métodos propuestos para suelo, los límites de detección obtenidos son más altos en el caso del método de agitación con ultrasonidos. Esto es debido a que en este método se ha tomado una menor cantidad de muestra, y el extracto obtenido se lleva a un volumen mucho mayor (50 mL, frente 1 mL de los otros dos métodos).

Finalmente, con el fin de estudiar procesos de biorremediación para la reducción/eliminación de estos compuestos, se ha desarrollado un método para la determinación de HCH en medios de cultivo. Aunque el método más ampliamente utilizado para la extracción de isómeros de HCH en medios de cultivo es la extracción con agitación mecánica, en este estudio se empleó la extracción con disolventes en ultrasonidos ya que proporciona un contacto más eficaz entre la muestra y el disolvente de extracción que la extracción con agitación mecánica.

El medio de cultivo utilizado en este estudio está constituido por agar-agar (15 g/L), glucosa (10 g/L) y extracto de malta (3.5 g/L), sobrecargado con isómeros de HCH a un nivel de 5000 µg/kg.

El método propuesto consiste en extraer las muestras (0.5 g) con 20 mL de hexano:acetato de etilo (80:20) en baño de ultrasonidos durante 30 minutos. Con objeto de eliminar los posibles restos de agua contenidos en el extracto, éste se pasa por una columna de sulfato sódico anhidro. A continuación el extracto se concentra con rotavapor a 30°C y 70 rpm hasta un volumen de unos 0.5-1 mL y finalmente se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno. Posteriormente, los extractos se redisolvieron en 1 mL de hexano y se analizaron mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC-ECD) (Barriada-Pereira, et al., 2008).

En la **tabla 7** se muestran las recuperaciones analíticas, desviaciones estándar relativas (a un nivel de sobrecarga de 5000 µg/kg), y límites de detección obtenidos para este método.

Tabla 7. Características analíticas del método propuesto para el análisis de los isómeros de HCH en muestras de agar-agar.

Pesticida	US-GC-ECD	
	LD (µg/kg)	%R (%DER)
α-HCH	3	84 (0.7)
β-HCH	9	101 (2)
γ-HCH	4	93 (4)
δ-HCH	4	101 (2)

#### 4. APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS AL ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE LA ZONA AFECTADA POR CONTAMINACIÓN DEBIDA A HCH EN PORRIÑO

##### 4.1 Descripción del área de estudio

Entre los años 2001 y 2003, en el marco del Convenio para la "Evaluación y bioremediación de la contaminación por

isómeros de HCH en suelos del polígono industrial de Torneiros, Porriño-Pontevedra" "financiado por la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia se ha llevado a cabo el estudio de un área altamente contaminada por residuos procedentes de la fabricación de lindano (γ-HCH). El área de estudio, situada en el polígono industrial de Torneiros (Porriño, Pontevedra), corresponde a los terrenos en los que desde 1947 hasta 1964 se localizaba una fábrica dedicada a la síntesis de lindano.

En el proceso de fabricación se obtiene una mezcla de 4 isómeros en las siguientes proporciones: 67-70% α-HCH, 5-6% β-HCH, 13% γ-HCH y 6% δ-HCH. De esta mezcla sólo el isómero γ presenta efectividad como insecticida, y por lo tanto los isómeros α, β, γ y δ son considerados residuos, y como tales desechados. A partir de 1964 dejó de fabricarse el lindano, procediéndose sólo a su envasado y manipulación, reduciéndose así la generación de residuos. A pesar de ello, y debido a la persistencia de los mismos, los residuos que durante años se acumularon en los terrenos próximos, aún permanecen en la zona.

El área afectada alcanza una superficie de unos 45000 m<sup>2</sup>, incluyendo tanto suelos, como los acuíferos de la zona (Martínez-Lozano and González-Rodríguez, 1999), pudiéndose observar en algunos puntos a simple vista residuos sólidos de los isómeros de HCH. Un primer sector de dicha zona fue declarado suelo contaminado en la Orden del 8 de octubre de 1999 (DOGA 197 de 11 de octubre de 1999), y posteriormente una segunda fase en la Orden del 20 de septiembre de 2001 (DOGA 185 de 24 de septiembre de 2001).

Hoy en día parte del terreno se ha transformado en área urbana, por lo que se han llevado a cabo estudios de regeneración y descontaminación de la zona, procediéndose al sellado de los depósitos de residuos. En

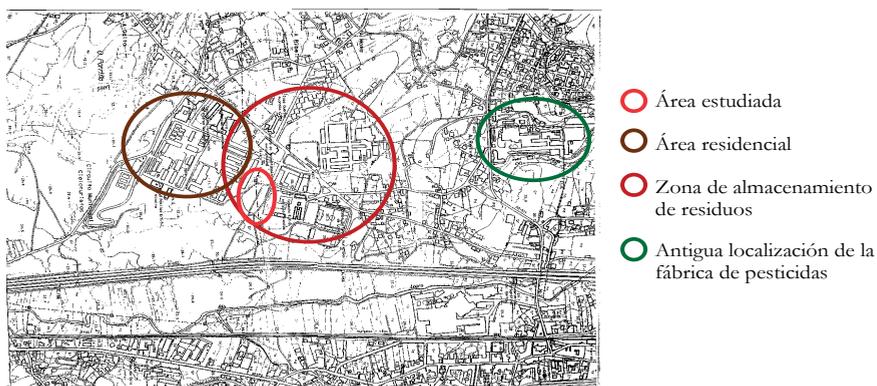


Figura 3. Área afectada por la contaminación de residuos de HCH en Porriño

la **figura 3** se muestra un plano de la zona afectada.

#### 4.2 Caracterización del residuo encontrado en la zona

La primera parte de los estudios realizados en el área afectada fue la caracterización de un residuo que apareció abundantemente en la zona tanto superficialmente como al remover el suelo. Su aspecto era similar al de una tiza, blanquecino y de un olor intenso característico y se sospecha que puede ser el producto origen de la contaminación. Aunque parte del mismo se encuentra pulverizado, se pueden encontrar numerosos fragmentos de distintos tamaños.

Dicho residuo se ha caracterizado con el fin de conocer su composición, disolviendo una pequeña porción del mismo en hexano, y analizándolo mediante GC-ECD. La composición porcentual resultante de dicho análisis puede verse en la **figura 4**.

Como se puede observar, el isómero mayoritario en el residuo es el isómero  $\alpha$ , y el menos abundante el  $\delta$ . Este perfil de porcentajes resulta similar al que se obtiene en el proceso de fabricación, teniendo en cuenta que la mayoría del isómero  $\gamma$ -HCH (producto de interés) ha sido separado antes de desechar el residuo.

77%  $\alpha$ -HCH

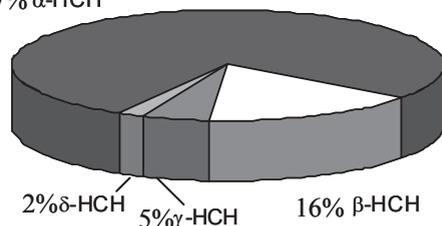


Figura 4. Composición porcentual del residuo de fabricación de Lindano encontrado en la zona de estudio.

#### 4.3 Análisis y caracterización de muestras de suelos y lixiviados

Se han analizado también muestras de suelo procedente de 8 puntos situados en una parcela de estudio de la zona contaminada. En el suelo de dicha parcela podía observarse a simple vista la presencia de residuo blanco de lindano, por lo que se supone una elevada concentración de los isómeros en estas muestras. Por este motivo, de los tres métodos propuestos el que se ha utilizado para llevar a cabo el análisis de estas muestras es la extracción mediante ultrasonidos. Aquellas muestras que dieron valores bajos de concentración de isómeros de HCH o valores incluso por debajo del límite de detección con este método, se analizaron nuevamente

extrayendo las mismas con el método propuesto usando energía de microondas.

En todas las muestras analizadas se han encontrado los isómeros de HCH. En alguna de las muestra se ha detectado la presencia de algún otro pesticida organoclorado fundamentalmente, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT y endrin aldehído en concentraciones comprendidas entre 0.11 y 0.64 mg/kg.

En la **figura 5** se muestran las concentraciones del total de isómeros que se han encontrado en los 8 puntos, comprendidas entre 35 mg/kg y 81461 mg/kg, valores todos ellos muy superiores a los 2 mg/kg que establece la legislación gallega como límite superior de aceptabilidad de riesgo. Las concentraciones más elevadas se han localizado en los puntos C2, C3, C4 y C6, puntos todos ellos próximos entre sí y situados en la zona central de la parcela. . (Concha-Graña, et al., 2006).

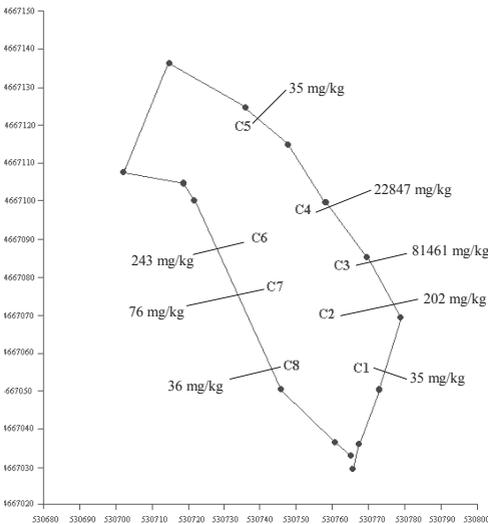


Figura 5. Localización (coordenadas UTM) de los puntos de muestreo y concentración total de isómeros de HCH obtenida en cada punto.

En la **figura 6** se representa el porcentaje de los distintos isómeros que se ha encontrado en las muestras de suelo. La elevada proporción de  $\alpha$ -HCH y baja de  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH mantiene concordancia con los resultados obtenidos en el residuo original. Sin embargo, se aprecia un incremento importante del porcentaje de isómero  $\beta$ , con respecto al porcentaje que se encontraba en el residuo. Esto puede ser debido a que este isómero, debido a la disposición ecuatorial de los átomos de cloro, es termodinámicamente más estable que el resto de los isómeros, por lo que puede haber sufrido menor degradación.

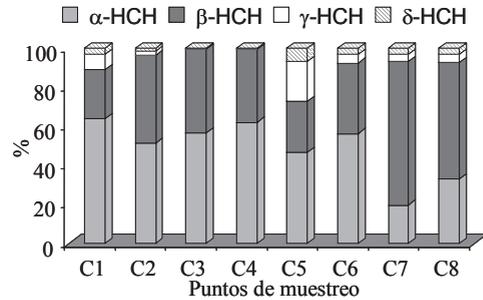


Figura 6. Distribución porcentual de cada isómero de HCH en muestras de suelos de cada punto de muestreo.

Además se ha comparado la distribución de isómeros de HCH en los muestras superficiales de suelo con la distribución obtenida en las muestras de raíces de *Chenopodium vulgare* (Barriada-Pereira, et al., 2005) con el fin de intentar determinar el origen de la contaminación de la raíz. Como puede observarse en la **figura 7**, en algunos puntos el porcentaje de  $\beta$ -HCH es mayor en la raíz que en el suelo. Esto puede deberse a la solubilidad de este isómero que facilita su absorción por la raíz. Sin embargo en otros puntos se produce el efecto contrario. Este efecto puede indicar que la presencia de isómeros de HCH en las raíces puede deberse no sólo a la absorción de los mismos desde

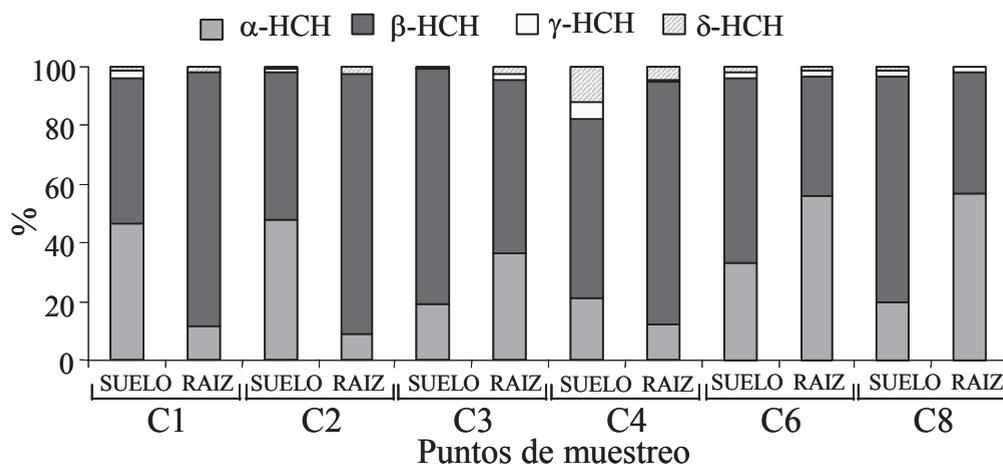


Figura 7. Distribución de los isómeros de HCH en la superficie del suelo y la raíz de *Chenopodium vulgare* recogida en la parcela.

el suelo, sino que puede existir contribución de otros mecanismos como la deposición atmosférica, que afectaría principalmente a los isómeros más volátiles. Se han analizado asimismo muestras de lixiviados naturales de suelos procedentes de la zona de estudio, recogidas en distintas fechas a lo largo del año 2002. Para ello se ha utilizado el método SPE-GC-ECD descrito, analizando en este caso 50 mL de muestra, ya que se presupone una elevada concentración de los isómeros de HCH en las mismas. Las concentraciones encontradas en las muestras, van desde valores inferiores a 0.0018 µg/L del isómero γ para algunas de las muestras, hasta valores de 54.5 µg/L para el isómero β. La concentración total de los isómeros de HCH fue en todos los casos mayor de 0,1 µg/L, valor establecido por la Directiva Europea para aguas superficiales continentales afectadas por vertidos. En la **figura 8** se muestra la distribución de los isómeros de HCH en los lixiviados de suelos. Como se puede observar, el isómero mayoritario en los lixiviados es el β-HCH, y no el α-HCH como sucedía en la mayoría de las muestras de suelo procedentes de la misma parcela.

Esto es debido a que el β-HCH presenta una solubilidad en agua 20 veces mayor que el isómero α (Li, et al., 2002).

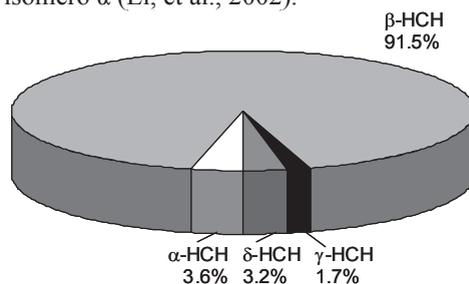


Figura 8. Distribución media de los isómeros de HCH en las muestras de lixiviados.

#### 4.4. Análisis y caracterización de muestras de vegetación

Para llevar a cabo este estudio se analizaron cinco especies de plantas: xesta (*Cytisus striatus* (Hill) Rothm.), avena (*Avena sativa* L.), tomatillo del diablo (*Solanum nigra* L.), veza común (*Vicia sativa* L.) y cenizo (*Chenopodium vulgare* L.) que se recogieron en seis puntos de muestreo (denominados C1, C2, C3, C4, C6 y C8). Se recogieron cinco especies de plantas con el

objeto de evaluar como varía la acumulación de los pesticidas organoclorados en función de la especie para su utilización en estudios de fitorremediación. También se separaron las partes de cada planta (tallo, hojas, raíces y semillas) para comparar la variación en la capacidad de acumulación de pesticidas organoclorados entre los distintos órganos de las mismas (Barriada-Pereira, et al., 2005).

Independientemente de la especie, parte de la planta o punto de muestreo, los resultados obtenidos permiten comprobar que para todas las muestras, los pesticidas que se encuentran en una mayor concentración son los isómeros del HCH. En algunas muestras se encontraron cantidades más pequeñas de *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE.

Los principales isómeros en todas las muestras son el  $\beta$ -HCH y el  $\alpha$ -HCH mientras que el  $\delta$ -HCH y el  $\gamma$ -HCH están presentes en niveles de concentración muy inferiores. Los niveles tan elevados de  $\alpha$ -HCH y bajos niveles de  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH se pueden explicar teniendo en cuenta la proporción de cada uno de los isómeros en el lindano técnico (67-70% de  $\alpha$ -HCH, 5-6% de  $\beta$ -HCH, 13% de  $\gamma$ -HCH y 6% de  $\delta$ -HCH) (Bidlan, et al., 2004), mientras que los altos valores de  $\beta$ -HCH se pueden atribuir a la mayor estabilidad termodinámica de este isómero en condiciones aeróbicas (Doelman, et al., 1990) (Loibner, et al., 1998); además es el isómero más difícil de degradar por las bacterias.

En este estudio la especie con mayor capacidad de acumulación de los isómeros de HCH fue la *Cytisus striatus* (Hill) Rothm (62.5 mg/kg) mientras que la *Chenopodium vulgare* L. fue la planta con menor capacidad de acumulación (1.7 mg/kg). Estos resultados indican que entre las especies de plantas estudiadas, la más interesante a tener en cuenta para procesos de fitorremediación de suelos contaminados sería la *Cytisus striatus* (Hill) Rothm.

Aunque estas plantas no están destinadas

al consumo humano y, en consecuencia, sus contenidos de plaguicidas no están contemplados en la legislación, es interesante apreciar que las concentraciones que presentan estos compuestos superan en gran medida los MRLs establecidos por la Unión Europea para vegetales comestibles, que dependiendo del tipo de planta considerada puede llegar a ser de 0.1 mg/kg en el caso del isómero  $\gamma$ -HCH y de 0.02 mg/kg para la suma de los isómeros  $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HCH (Directiva 90/642/CEE). En cualquier caso hay que tener en cuenta que estas plantas pueden ser consumidas por otros organismos animales, entrando así en la cadena alimentaria.

Con respecto a las partes de las plantas estudiadas, en general se puede decir que las muestras de hojas tienen mayores niveles de HCH que los niveles contenidos en las muestras de tallos y éstos a su vez son mayores que los de las muestras de raíces. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta fenómenos de deposición atmosférica y al hecho de que las hojas de las plantas superiores están recubiertas con una capa de ceras epicuticulares de carácter hidrofóbico, que por tanto, tienden a adsorber los compuestos lipofílicos que se encuentran en el aire que las rodea (Kylin, et al., 1996). Además hay que tener en cuenta que estos pesticidas son compuestos semivolátiles y, por tanto, tienen tendencia a volatilizarse desde los suelos en los que se encuentran aumentando así su concentración en la atmósfera circundante a las plantas (Simonich and Hites, 1994). Por ello se puede concluir que la hoja es la parte más adecuada de las plantas para realizar seguimientos ambientales de contaminación para los pesticidas considerados. Con respecto a los pesticidas encontrados minoritariamente en las muestras, la presencia de *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE puede ser debida a la degradación de *p,p'*-DDT, que se puede transformar en estos compuestos por deshidrocloración. La tendencia general que siguen estos

compuestos es similar a la de los isómeros del HCH, siendo la hoja la parte de la planta que presenta una concentración más elevada de estos compuestos, especialmente de  $p,p'$ -DDE. A modo de ejemplo, la **figura 9** muestra los valores acumulativos de los isómeros de HCH en la especie *Cytisus striatus*.

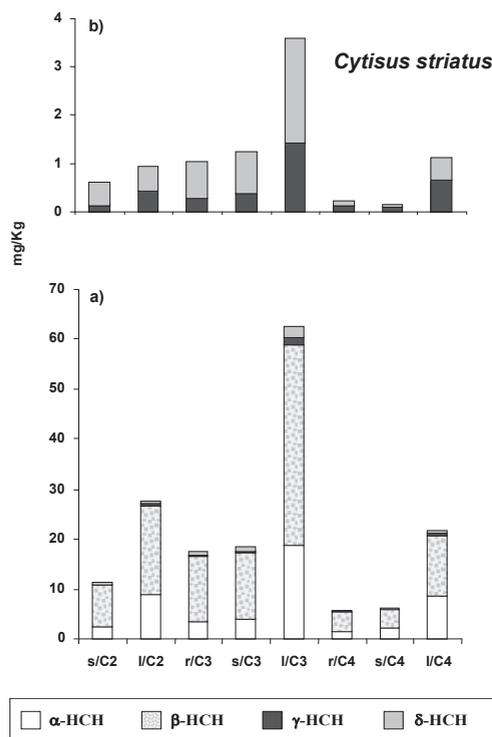


Figura 9. Valores acumulativos de los isómeros de HCH en la especie *Cytisus striatus*.

Con el objeto de estudiar cuán reciente ha sido la introducción de  $p,p'$ -DDT y  $\gamma$ -HCH en el medio ambiente muchas veces se emplean las relaciones existentes entre las concentraciones de  $p,p'$ -DDE y  $p,p'$ -DDT y entre las concentraciones de  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH como indicadores de antigüedad de vertido (Krauthacker, et al., 2001). Las proporciones menores a la unidad indican un vertido reciente. Uno de los factores significativos en los procesos de degradación

de estos pesticidas es la radiación solar a la que han estado sometidos, que será mayor cuanto mayor sea el tiempo de permanencia en el medio. La isomerización del  $\gamma$ -HCH a  $\alpha$ -HCH y la transformación de  $p,p'$ -DDT en  $p,p'$ -DDE por acción de la radiación ultravioleta de la luz solar son procesos que están bien documentados (Kaushik, 1991) (Walker, et al., 1999) (Wei, 1999). Los resultados obtenidos muestran que la relación  $\alpha$ -HCH/ $\gamma$ -HCH se encuentra en un intervalo de 11.3 a 22.8 que, aún teniendo en cuenta las proporciones de isómeros en el lindano técnico, puede indicar un vertido antiguo de estos pesticidas. Esto puede estar relacionado con las fechas de producción de lindano en la fábrica antiguamente ubicada esta zona de estudio (1947-1964). Sin embargo las proporciones entre  $p,p'$ -DDE y  $p,p'$ -DDT no muestran una tendencia clara para todas las muestras, por lo que no es posible establecer de forma concluyente la antigüedad de los vertidos.

#### 4.5. Estudio de productos de degradación

Algunas de las muestras de suelos fueron inyectadas en GC-MS en modo full scan con el fin de buscar posibles productos de degradación. Se ha detectado la presencia de  $\gamma$ -pentaclorociclohexeno ( $\gamma$ -PCCH, m/z: 181), que ha sido citado por diversos autores como producto de degradación de HCH. Este compuesto se forma por la descomposición de  $\gamma$ -HCH por la enzima  $\gamma$ -HCH-dehidroclorinasa (Damborsky, et al., 2000), o por las bacterias *Sphingomonas paucimobilis* (Johri, et al., 1998) o *Pseudomonas sp* (Sahu, et al., 1995). Los productos de degradación que se obtienen por metabolismo aeróbico de HCH son diferentes de los que se obtienen por metabolismo anaeróbico. Así, la presencia de  $\gamma$ -pentaclorociclohexeno ( $\gamma$ -PCCH) y la ausencia de  $\gamma$ -tetraclorociclohexeno, parece indicar que el proceso de degradación producido es aeróbico. Además se ha detectado

en algunas muestras otro compuesto que podría ser también un producto de degradación, el ciclopentiltricloroetano (m/z: 135).

En las muestras de lixiviados también se ha detectado la presencia de algunos productos de degradación. Además del  $\gamma$ -pentaclorociclohexeno que se detectaba en los suelos, se han encontrado otros compuestos clorados, que podrían ser productos de degradación de HCH, como estructuras del tipo tricloroetilenciclopentano ó 4,6,6,6-tetracloro-1-hexeno (**figura 10**)

También se han estudiado los productos de degradación en las muestras de vegetación. Para ello se escogieron 15 muestras, correspondientes a las que contienen una mayor concentración de HCH en cada uno de los órganos de las distintas especies de plantas y se analizaron mediante GC-MS. En la mayoría de las muestras analizadas se ha encontrado pentaclorociclohexeno,

metabolito que también ha sido identificado por otros autores en maíz (Moza, et al., 1974) y en raíz de trigo (Balba and Saha, 1974). Además, en algunas de las muestras analizadas se ha identificado la presencia del ciclopentiltricloroetano y derivados del ácido 6-tricloro,4-en-hexanoico.

El metabolismo de los isómeros del HCH en plantas todavía no es bien conocido pero en cualquier caso, depende de la especie de planta considerada. De las plantas estudiadas, la especie *Cytisus striatus* (Hill) Rothm. que es la que muestra mayor capacidad de acumulación de isómeros del HCH presenta todos los metabolitos anteriormente mencionados en todos los órganos analizados. Por el contrario en la especie *Chenopodium vulgare* L., que presenta una menor capacidad de acumulación para estos pesticidas, no se detectó la presencia de ninguno de estos metabolitos.

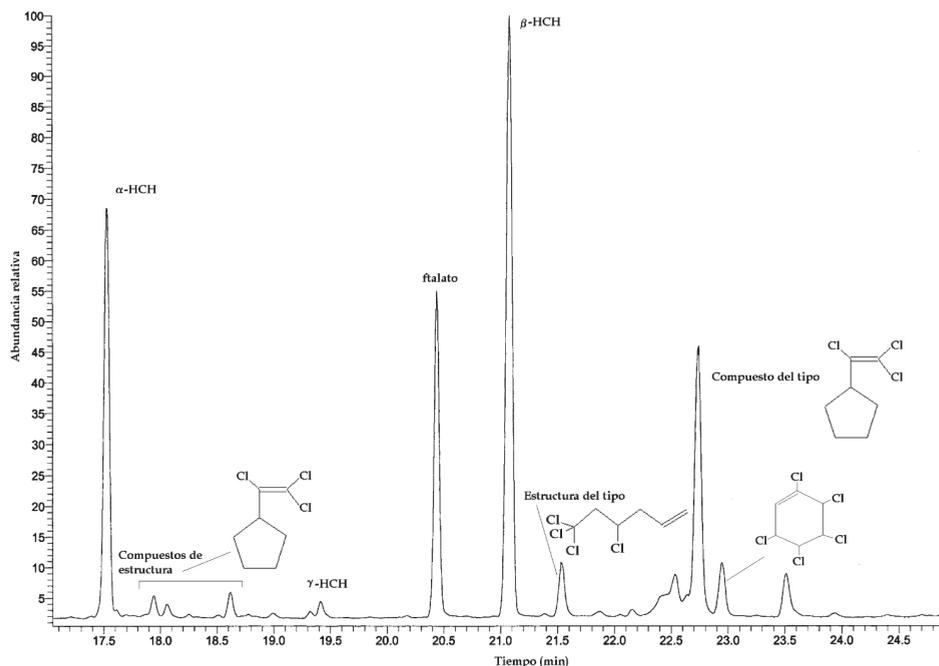


Figura 10. Cromatograma y compuestos detectados en una muestra de lixiviado analizada por PSS-GC-MS en modo full scan. (Concha-Graña, et al., 2006).

#### 4.6. Análisis de aguas y sedimentos del río Louro

Con el fin de completar el estudio de la zona y comprobar la posible contaminación de los acuíferos, se ha llevado a cabo el análisis de algunas muestras de aguas y sedimentos procedentes del río Louro. Este río, considerado uno de los más contaminados de Galicia, se ve afectado por las actividades industriales de la zona que provocan vertidos de naturaleza diversa. Además se analizó también una muestra de agua procedente del arroyo de As Laxes, próximo a la parcela de estudio. En la **figura 11** se muestra un mapa de la zona.

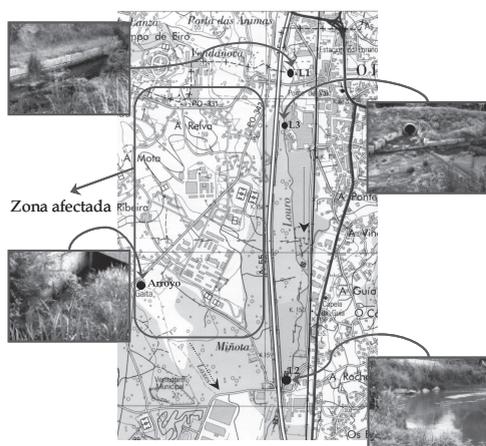


Figura 11. Mapa de localización de los puntos de muestreo de aguas.

Las muestras se han analizado por el método de SPE-PSS-GC-ECD tomando 100 mL de cada muestra para su análisis. En las muestras de aguas y sedimentos procedentes del río Louro no se ha detectado la presencia de ninguno de los isómeros de HCH, posiblemente debido al caudal de este río, que favorece el efecto de dilución. En el arroyo de As Laxes se ha encontrado  $\beta$ -HCH en una concentración de 4.42  $\mu\text{g/L}$  valor superior a 0.1  $\mu\text{g/L}$ , límite establecido por la Directiva

Europea. La presencia de este isómero coincide con los resultados que se obtenían en el análisis de lixiviados, y puede deberse a la escorrentía procedente del área contaminada.

En el caso de las muestras de sedimentos de río analizadas no se ha detectado ninguno de los isómeros de HCH.

#### 4.7. Estudio de la estabilidad de isómeros de HCH en medios de cultivo

Para llevar a cabo estudios de biorremediación de suelos empleando hongos ligninolíticos fue necesario poner a punto el análisis de HCH en medios de cultivo. Dado que los estudios de biorremediación se llevan a cabo durante un largo período de tiempo es importante tener en cuenta la estabilidad de los compuestos considerados en la matriz empleada. Por ello, se realizó un estudio preliminar de la estabilidad de los isómeros de HCH en medios de cultivo de agar-agar en el tiempo en función de la temperatura de incubación. Los matraces se cubrieron y se incubaron estáticamente a tres temperaturas diferentes: 4°C, temperatura ambiente y a 30°C (Barriada-Pereira, et al., 2008).

Se ha observado que a 30°C y a temperatura ambiente se produce un descenso importante en las recuperaciones analíticas de los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH, especialmente en el caso del  $\alpha$ -HCH, mientras que las pérdidas de los otros isómeros son prácticamente despreciables. Esto puede atribuirse a las distintas presiones de vapor de los isómeros y a procesos de adsorción. Los estudios realizados mostraron que las pérdidas por adsorción son despreciables, lo que concuerda con otros autores, cuando se utilizan niveles de sobrecarga superiores a 50  $\mu\text{g/L}$  (Pichon, et al., 1998).

#### 5. OTROS ANÁLISIS COMPLEMENTARIOS

La experiencia y metodología descrita en este trabajo, además de utilizarse en la

determinación de los HCH en la zona de estudio del polígono de Torneiros ha servido de base para la realización de posteriores estudios llevados a cabo por el grupo de investigación de Química Analítica Aplicada relacionada con la determinación de pesticidas organoclorados en otras matrices de interés ambiental y alimentario. En este apartado se realiza una breve revisión de estas aplicaciones.

### 5.1. Análisis de pesticidas organoclorados en vegetales

Debido a que la hoja es la parte más adecuada de las plantas para realizar seguimientos ambientales de contaminación para los isómeros de HCH, se ha desarrollado un método para la determinación de 21 pesticidas organoclorados en hojas de árboles [castaño (*Castanea sativa*), avellano (*Corylus avellana*), roble (*Quercus robur*) y nogal (*Juglans regia*)] basado en la extracción con energía de microondas (MAE) seguida de extracción en fase sólida (SPE) y determinación mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC-ECD) (Barriada Pereira et al., 2004). Después de la extracción con hexano:acetona (50:50), se ensayaron cuatro adsorbentes (Florisil<sup>®</sup>, tandem Florisil<sup>®</sup> + alúmina, sílica gel y carbón) para el proceso de purificación, seleccionando el carbón por su mayor capacidad de eliminar compuestos interferentes.

También se ha realizado un estudio comparativo de dos métodos de extracción, extracción con disolventes a alta presión (PLE) y extracción con energía de microondas (MAE) para la determinación de pesticidas organoclorados en hortalizas (lechuga, tomate, espinaca, patata, grelo y judía) (Barriada-Pereira, et al., 2005) (Barriada-Pereira, et al., 2007). El método se aplicó al análisis de 35 muestras procedentes de mercados de A Coruña, de las que sólo dos

muestras presentaron residuos de pesticidas, pero en valores inferiores a los MRLs establecidos por la legislación de la Unión Europea (Barriada-Pereira, et al., 2005).

### 5.2. Análisis de pesticidas organoclorados en piensos

Se ha optimizado un método para la determinación de 21 pesticidas organoclorados en piensos empleando la extracción con energía de microondas y determinación mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica seguida de cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas. (Iglesias-García, et al., 2008). Se ensayaron tres adsorbentes para el proceso de purificación (Alúmina/ENVI<sup>TM</sup> Florisil<sup>®</sup>, ENVI<sup>TM</sup>-Carb y ENVI<sup>TM</sup>-Carb II/PSA), seleccionando ENVI<sup>TM</sup>-Carb II/PSA. El método fue validado mediante el análisis de un material de referencia certificado (CRM-115 BCR<sup>®</sup>).

### 5.3. Análisis de pesticidas organoclorados en pescados

Se realizó un estudio comparativo de dos métodos de extracción, extracción con disolventes a alta presión (PLE) y extracción con energía de microondas (MAE) para la determinación de pesticidas organoclorados en músculo de pescado mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica (GC-ECD) (Barriada-Pereira, et al., 2008). En ambos casos, las muestras fueron extraídas con hexano:acetona (50:50) y los extractos purificados mediante extracción en fase sólida (SPE) empleando un cartucho de carbón como adsorbente. También se ha desarrollado un método basado en dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción en fase sólida (SPE) optimizando para ello diferentes adsorbentes y eluyentes (Barriada Pereira, et al., 2010) con resultados satisfactorios.

## 6. CONCLUSIONES:

Se proponen y comparan diferentes metodologías desarrolladas para la determinación de isómeros de HCH y otros pesticidas organoclorados, en diferentes matrices ambientales tanto líquidas como sólidas. Todos los métodos propuestos fueron validados y se consideran adecuados para la determinación de los analitos de interés. Se ha seleccionado en cada caso el método más adecuado para la caracterización y evaluación de la contaminación en una zona afectada por residuos de HCH. Se han encontrado valores elevados de HCH en todos los puntos estudiados. La distribución de isómeros de HCH es diferente dependiendo de la matriz analizada y sobre todo de las características físico-químicas de cada isómero lo cual afecta a su degradación y transporte a través de los diferentes compartimentos ambientales. También se han evaluado la presencia de productos de degradación del HCH, encontrándose en la mayoría de las muestras el compuesto  $\gamma$ -pentaclorociclohexano.

## AGRADECIMIENTOS

A la Xunta de Galicia por la financiación del trabajo a través del Convenio "Evaluación y bioremediación de la contaminación por isómeros de HCH en suelos del polígono industrial de Torneiros". Al Prof. Felipe Macías por su colaboración y la efectiva coordinación de todos los grupos de investigación participantes en el estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balba, M.H., & Saha, J.G. (1974) *Environmental Letters*. Metabolism Of Lindane-C-14 By Wheat Plants Grown From Treated Seed.7, 181-194
- Barriada-Pereira, M., Concha-Graña, E., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., & Fernández-Fernández, E. (2003) *J. Chromatogr. A*. Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants.1008, 115-122
- Barriada-Pereira, M., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D., & Fernandez-Fernandez, E. (2005) *Intern. J. Environ. Anal.Chem.* Determination of organochlorine pesticides in horticultural samples by microwave assisted extraction followed by GC-ECD.85, 325-333
- Barriada-Pereira, M., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D., & Fernandez-Fernandez, E. (2007) *Talanta*. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables.71, 1345-1351
- Barriada-Pereira, M., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D., & Fernandez-Fernandez, E. (2008) *Soil and Sediment Contamination. Troubleshooting in the analysis of Hexachlorocyclohexane Isomers in Agar-Agar Culture Media*.17, 12-18
- Barriada-Pereira, M., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., & Fernández-Fernández, E. (2005) *Chemosphere*. Organochlorine pesticides accumulation and degradation products in vegetation samples of a contaminated area in Galicia (NW Spain).58, 1571-1578
- Barriada-Pereira, M., Iglesias-Garcia, I., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., & Prada-Rodriguez, D. (2008) *J. AOAC Int.* Pressurized liquid extraction and

microwave-assisted extraction in the determination of organochlorine pesticides in fish muscle samples.91, 174-180

- Barriada Pereira, M., González Castro, M.J., Muniategui Lorenzo, S., López Mahía, P., & Prada Rodríguez, D. (2010) *J AOAC Int.* Sample preparation for the determination of organochlorine pesticides in fish based on matrix solid phase dispersion (MSPD) and solid phase extraction (SPE) clean-up.93 (3), 992-998
- Bidlan, R., Afsar, M., & Manonmani, H.K. (2004) *Chemosphere.* Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination.56, 803-811
- Concha-Grana, E., Fernandez-Gonzalez, V., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2007) *J. Chromatogr. Sci.* Pressurized liquid extraction of organochlorine pesticides from certified solid materials.45, 369-374
- Concha-Graña, E. (2004) Desarrollo de métodos de análisis de pesticidas organoclorados en matrices ambientales. in Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña, A Coruña
- Concha-Graña, E., Barriada-Pereira, M., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* Microwave extraction of organochlorine pesticides from soils.375, 1225-1228
- Concha-Graña, E., Fernández-González, V., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., & Fernández-Fernández, E. (2007) Análisis de pesticidas organoclorados en aguas de grifo, superficiales y agua de mar mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas. in *II Reunión nacional de dioxinas, furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados*
- Concha-Graña, E., Fernández-Martínez, G., Fernández-Villarrenaga, V., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2009) *Talanta.* A study of large-volume on-column injection GC-ECD for the ultratrace analysis of organochlorine pesticides in water.78, 764-771
- Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., & Prada-Rodríguez, D. (2001) *Chromatographia.* Troubleshooting in the trace analysis of organochlorine pesticides in water samples.54, 501-506
- Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., & Prada-Rodríguez, D. (2002) *J. Chromatogr. A.* Optimisation of a programmed split-splitless injector in the gas chromatographic-mass spectrometric determination of organochlorine pesticides.958, 17-24
- Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Fernández-Fernández, E., & Prada-Rodríguez, D. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* Improvement of sensitivity in the determination of organochlorine pesticides using a PSS injector with GC-ECD.379, 1120-1126
- Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., & Fernández-Fernández, E. (2006) *Chemosphere.* Evaluation of HCH isomers and metabolites in soils, leachates, river water and sediments of a highly contaminat-

- ed area.64, 588-595
- Damborsky, J., Nagata, Y., Trinh, T., & Kang, J. (2000) gamma-Hexachlorocyclohexane pathway map.
- Doelman, P., Haanstra, L., Loonen, H., & Vos, A. (1990) Soil Biol. Biochem. Decomposition of a- and b-hexachlorocyclohexane in soil under field conditions in a temperate climate.22, 629-634
- Fernández-González, V., Grueiro-Noche, G., Concha-Graña, E., Turnes-Carou, M.I., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2005) Anal. Bioanal. Chem. Troubleshooting with cell blanks in PLE extraction.383, 174-181
- Ganzler, K., Salgo, A., & Valko, K. (1986) J. Chromatogr. Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography.371, 299-306
- García Cambero, J.P., & Soler Rodríguez, F. (2005) Los plaguicidas organoclorados y sus implicaciones en el medio ambiente acuático, Los plaguicidas organoclorados y sus implicaciones en el medio ambiente acuático. Universidad de Extremadura, Cáceres
- Giergielewicz-Mozajska, H., Dabrowski, L., & Namiesnik, J. (2001) Critical Reviews in Analytical Chemistry. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-Some aspects of theory and practice.31, 149-165
- Gupta, A., Kaushik, C.P., & Kaushik, A. (2001) Bull. Environ. Contam. Toxicol. Degradation of hexachlorocyclohexane isomers by two strains of *Alcaligenes faecalis* isolated from a contaminated site.66, 794-800
- Iglesias-García, I., Barriada-Pereira, M., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., & Prada-Rodríguez, D. (2008) Anal. Bioanal. Chem. Development of an analytical method based on microwave-assisted extraction and solid phase extraction cleanup for the determination of organochlorine pesticides in animal feed.391, 745-752
- Johri, A.K., Dua, M., Tuteja, D., Saxena, R., Saxena, D.M., & Lal, R. (1998) Biotechnol. Lett. Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by *Sphingomonas paucimobilis*.20, 885-887
- Kaushik, C.P. (1991) Soil Biol. Biochem. Persistence and metabolism of HCH and DDT in soil under subtropical conditions.23, 131-134
- Krauthacker, B., Romanic', S.H., & Reiner, E. (2001) Bull. Environ. Contam. Toxicol. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in vegetation samples collected in Croatia.66, 334-341
- Kylin, H., Nordstrand, E., Sjödin, A., & Jensen, S. (1996) Fresenius J. Anal. Chem. Determination of chlorinated pesticides and PCB in pine needles - improved method for monitoring of airborne organochlorine pollutants.356, 62-69
- Li, Y.F., MacDonald, R.W., Jantunen, L.M.M., Harner, T., Bidleman, T.F., & Strachan, W.M.J. (2002) Sci. Total. Environ. The transport of beta-hexachlorocyclohexane to the western Arctic Ocean: a contrast to alpha-HCH.291, 229-246
- Loibner, A.P., Farthofer, R., & Braun, R. (1998) Aerobic degradation of hexachlorocyclohexane-isomeres in soil monitored by using an on-line GC/MS system. in Int. Symp. Exhib. Environ. Contam. Cent. East Eur. 4th, Warsaw, pp 548-552
- Martínez-Lozano, F., & González-Rodríguez, M.O. (1999) Zonas de actuación den-

- tro del marco de la investigación de suelos contaminados por residuos de Lindano en el polígono de Torneiros-O Porriño (Pontevedra). Consellería de Medio Ambiente. Xunta de Galicia
- Moza, P., Weisgerb, I., Klein, W., & Korte, F. (1974) *Bull. Environ. Contam. Toxicol. Metabolism Of 2,2'-Dichlorobiphenyl-C-14* In *2 Plant-Water-Soil-Systems*.12, 541-546
- Pandit, G.G., Rao, A.M.M., S.K.Jha, Krishnamoorthy, T.M., Kale, S.P., Raghu, K., & Murthy, N.B.K. (2001) *Chemosphere. Monitoring of organochlorine pesticide residues in the Indian marine environment*.44, 301-305
- Pichon, V., Charpak, M., & Hennion, M.-C. (1998) *J. Chromatogr. A. Multiresidue analysis of pesticides using new laminar extraction disks and liquid chromatography and application to the French priority list*.795, 83-92
- Quan, C., Li, S.F., Tian, S.J., Xu, H., Lin, A.Q., & Gu, L. (2004) *Journal Of Supercritical Fluids. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in ginseng*.31, 149-157
- Sahu, S.K., Patnaik, K.K., Bhuyan, S., Sreedharan, B., Kurihara, N., Adhya, T.K., & Sethunathan, N. (1995) *J. Agric. Food. Chem. Mineralization of a-, g-, and b-isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions*.43, 833-837
- Simonich, S.L., & Hites, R.A. (1994) *Environ. Sci. Technol. Vegetation - atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons*.28, 939-943
- Singh, R.P. (2001) *Bull. Environ. Contam. Toxicol. Comparison of organochlorine pesticide levels in soil and groundwater of Agra, India*.67, 126-132
- Spiric, A., & Saicic, S. (1998) *J. AOAC Int. Monitoring chlorinated pesticides and toxic elements in tissues of food-producing animals in Yugoslavia*.81, 1240-1243
- Walker, K., Vallero, D.A., & Lewis, R.G. (1999) *Environmental Science & Technology. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment*.33, 4373-4378
- Wei, C. (1999) *Environmental Science & Technology. Photodechlorination mechanism of DDT in a UV/surfactant system*.33, 421-425
- Willet, K.L., Ulrich, E.M., & Hites, R.A. (1998) *Environ. Sci. Technol. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers*.32, 2197-2207
- Xiao, H., Li, N.Q., & Wania, F. (2004) *Journal Of Chemical And Engineering Data. Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane*.49, 173-185