

IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA SOLUBLE EN LUTITAS Y CALCARENITAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS Y BIOMARCADORES.

Patricia Candelaria Montiel García, Mara Cassandra Quiroz Acuña, Kinardo Flores Castro, Enrique Cruz Chávez, Evodio Pedro Castañeda Ovando

Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, UAEH, Mineral de la Reforma, Hidalgo
pmontiel@uaeh.edu.mx

RESUMEN

Dentro de los parámetros que afectan al método de extracción de materia orgánica soluble en rocas, se encuentra la composición y volumen del disolvente así como las características de la matriz, por lo que en este trabajo de investigación se estudió el efecto de utilizar dos mezclas de disolventes acetona-hexano y acetona-diclorometano, en tres muestras de lutitas y dos de calcarenitas, del Cañón “El Álamo” de Viesca, Coahuila, para la identificación de compuestos orgánicos preservados en la fracción soluble de la materia orgánica sedimentaria (bitumen) recuperados mediante la implementación del método de Extracción Asistida por Microondas (MAE). En el desarrollo de este método de extracción se pesaron 3 g de muestra en vasos de teflón, adicionándoles 25 ml de mezcla de solventes acetona-hexano (1:1) y en otra serie 25 mL con acetona-diclorometano (1:1), los vasos se colocaron en un horno de microondas marca CEM, modelo MARS 5, con una potencia 1200 w, rampa 10:00 min, PSI 100, temperatura 110°C, tiempo de extracción 15 min y tiempo de enfriamiento 15 min. La finalidad de probar dos mezclas de disolventes (acetona-hexano y acetona-diclorometano) es para determinar con que mezcla se obtiene la mayor cantidad de materia orgánica soluble para posteriormente proceder a la identificación de compuestos orgánicos y biomarcadores utilizando la Cromatografía de Gases-Masas. En este trabajo de investigación se demostró que la mezcla de disolvente en donde se obtuvo mayor cantidad extraída de materia orgánica soluble fue la de acetona-diclorometano. Con respecto a la identificación de alcanos lineales y biomarcadores, en los cromatogramas de gases-masas resultantes de la caracterización de las muestras, demostraron que la mezcla de disolvente acetona-diclorometano mostro mejores identificaciones, independientemente del tipo de roca sedimentaria. Esta mezcla permitió la identificación de alcanos de cadena larga ($n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$); más no es así alcanos de cadena corta por debajo de $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ debido a la polaridad que presenta el disolvente, o bien, a que la muestra pudiera presentar biodegradación o alteración térmica.

1. INTRODUCCIÓN

La geoquímica orgánica de biomarcadores potencialmente proporciona una poderosa herramienta para investigar información ambiental oculta en muestras geológicas [9]. Abelson (P.H.) fue uno de los primeros en sugerir que el análisis de los “fósiles bioquímicos” podría proveer explicaciones sobre la evolución de los principios de la vida. Los biomarcadores son fósiles moleculares que se pueden encontrar en rocas y sedimentos los cuales muestran poco o ningún cambio en la estructura de sus moléculas orgánicas principales, preservando toda la información deposicional. Aunque los n -alcanos no se consideran biomarcadores, sus patrones de distribución y parámetros específicos (por ejemplo,

Carbon Preference Index, CPI) permiten discriminar entre las diferentes muestras de rocas, basado en la fuente de entrada de la Materia Orgánica [7].

Es bien sabido que la materia orgánica (MO) puede proporcionar información referente a las condiciones de depositación (marinos, terrestres o ambientes lacustres) y si el ambiente era óxico o anóxico [9, 13].

En términos generales, en condiciones físicas favorables, la MO se convierte principalmente en dos grandes fracciones: bitumen extraíble y kerógeno insoluble. La fracción del bitumen corresponde a la MO extraída por medio de disolventes orgánicos comunes y contiene n-alcenos, metilalcenos y biomarcadores policíclicos complejos tales como hopanos y esteranos. El kerógeno es la fracción insoluble restante después de una extracción con disolvente orgánico y se compone de diversos macerales. Las técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) o la cromatografía de gases multidimensional (GC-GC) son entre las principales técnicas para el análisis de bitumen. El análisis de los biomarcadores, sin embargo, no es una tarea analítica fácil ya que están presentes en cantidades de sub partes por billón y su aislamiento requiere procedimientos de extracción eficientes [7].

La etapa de extracción es la parte menos evolucionado de la mayoría de los procedimientos analíticos, y todavía hoy en día la extracción de Soxhlet se usa en muchos laboratorios de rutina. En la última década ha habido una creciente demanda de nuevas técnicas de extracción, susceptibles de automatización, con tiempos de extracción más cortos y el consumo reducido de disolvente orgánico previniendo la contaminación en los laboratorios de análisis y reducción de los costos en la preparación de muestras. Impulsado por estos fines los avances en la preparación de la muestra ha resultado en un número de técnicas tales como la extracción asistida por microondas (MAE), extracción de fluido supercrítico (SFE) y la extracción presurizada (PLE). La similitud entre estas técnicas es la posibilidad de trabajar temperaturas y presiones elevadas, lo que mejora drásticamente la velocidad del proceso de extracción. Una de las principales ventajas utilizando MAE es la reducción del tiempo de extracción cuando se aplican las microondas. El principio del calentamiento utilizando energía de microondas se basa en el efecto directo de las microondas sobre las moléculas por conducción iónica y por rotación dipolar. En la conducción iónica se lleva a cabo la migración electroforética de iones cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia de la solución a este flujo de iones dará lugar a la fricción y, por lo tanto, la solución se calienta. En la rotación dipolar existe un realineamiento de dipolos con el campo aplicado a 2,450 MHz, que es la frecuencia que se utiliza en los sistemas de microondas, los dipolos se alinean y se presentan de manera aleatoria 49,310 veces por segundo y esto obliga el movimiento molecular resultando en el calentamiento. En el calentamiento convencional se necesita un período finito de tiempo para calentar el recipiente antes de que el calor se transfiera a la solución, mientras que en microondas el calor a la solución es directo, manteniendo el gradiente de temperatura a un mínimo y se acelera la velocidad de calentamiento, además MAE permite una reducción significativa en el consumo del disolvente orgánico, así como la posibilidad de correr múltiples muestras a la vez [12].

La Optimización de las condiciones MAE se ha reportado en varias aplicaciones, los parámetros más comúnmente estudiadas son la composición del disolvente, el volumen de disolvente, temperatura de extracción, el tiempo de extracción y características de la matriz, incluyendo el contenido de agua [5, 14].

Una correcta elección de disolvente es fundamental para la obtención de un proceso de extracción óptima. Al seleccionar el disolvente, se debe considerar las propiedades de absorción de microondas del disolvente, la interacción del disolvente con la matriz, y la solubilidad del analito en el disolvente.

De preferencia el disolvente debe tener una alta selectividad hacia el analito de interés excluyendo los componentes indeseables de la matriz. Otro aspecto importante es la compatibilidad del disolvente de extracción con el método analítico utilizado para la etapa final del análisis. Si la molécula de disolvente no es capaz de absorber la energía de microondas no habrá calentamiento y por lo tanto la extracción no será efectiva [12].

Una de las mezclas más comúnmente utilizado es hexano-acetona (1:1). El hexano no calentará en un campo de microondas, pero mezclándolo con acetona el calentamiento se llevará a cabo en unos pocos segundos, López-Avila et al. extrajeron 95 compuestos orgánicos semivolátiles de un listado de la EPA y se encontró que la mezcla hexano-acetona (1:1) es un extractante prometedor [6]. Esta mezcla de disolventes también se ha encontrado ventajosa para contaminantes ambientales, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos [1,10, 11], hidrocarburos alifáticos lineales (Vázquez et al., 2000), fenoles (Egizabal et al., 1998), OCPs (Chee et al., 1996b) y ésteres de ftalato (Chee et al., 1997) [2-4, 14].

La cantidad de disolvente necesario por una sola muestra suele estar en el rango de 10-30 mL. En algunos casos el volumen de disolvente puede ser un parámetro importante para las extracciones eficientes. El volumen de disolvente debe ser suficiente para garantizar que toda la muestra está sumergida, sobre todo cuando tiene una matriz que se dilata durante el proceso de extracción. El uso del MAE ha aumentado rápidamente en la última década, y para la mayoría de las aplicaciones ha demostrado ser eficaz en comparación con las técnicas de extracción tradicionales. Los principales beneficios son reducción en los tiempos de extracción, reducción en el consumo de disolvente y un mayor rendimiento de la muestra. La técnica es fácil de usar y los sistemas son más baratos en comparación con otras técnicas modernas, como SFE y PLE [12].

Dentro de los parámetros que afectan al método de extracción de materia orgánica soluble en rocas, se encuentra la composición y volumen del disolvente así como las características de la matriz, por lo que en este trabajo de investigación se estudiará el efecto de utilizar dos mezclas de disolventes: acetona-hexano y acetona-diclorometano, en tres muestras de lutitas y dos de calcarenitas, del Cañón “El Álamo” de Viesca, Coahuila, para la identificación de compuestos orgánicos preservados en la fracción soluble de la materia orgánica sedimentaria (bitumen) recuperados mediante la implementación del método de Extracción Asistida por Microondas (MAE).

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El área de estudio pertenece al municipio de Viesca, estado de Coahuila, para llegar a esta zona hay que tomar la carretera federal Saltillo-Torreón km. 40, seguir la desviación al sureste hacia Emiliano Zapata y posteriormente a Viesca, tomar el acceso de terracería de 3 km. en dirección oeste. El afloramiento se encuentra en la sierra El Álamo entre la sierra La Cadena y la unidad El Manco, correspondiendo a las coordenadas geográficas 25°20'N y 102°49'W. Del afloramiento se extrajeron tres muestras de lutita (Vie 21, 26 y 28) y dos muestras de calcarenita (Vie 19 y 20). El muestreo se realizó retirando la roca afectada por intemperismo para obtener una muestra sana. Las muestras se trituraron con apoyo de la pica y se dejaron secar a temperatura ambiente para eliminar cualquier humedad que pudieran tener, posteriormente se pulverizaron (10 min. aprox.) en un pulverizador modelo Pulverisette 2, marca Fristch, constituido por un mortero y un pistilo de ágata. En el desarrollo de este método de extracción se pesaron 3 g de muestra en vasos de teflón, adicionándoles 25 ml de mezcla de solventes acetona-hexano (1:1) y en otra serie 25 mL con acetona-diclorometano (1:1) grado HPLC, 99,8%, los vasos se colocaron en un horno de microondas marca CEM, modelo MARS 5, versión 049031, con una potencia 1200 w, rampa 10:00 min, PSI 100, temperatura 110°C, tiempo de extracción 15 min y tiempo de enfriamiento 15 min. Las muestras se filtraron, utilizando papel filtro Whatman 40, el cual previamente

fue tratado en Hexano para evitar cualquier humedad en el sedimento. El filtrado se colocó en un matraz balón de 250 mL y se colocó en un rotavapor marca Büchi modelo R-205 a una temperatura de 60°C con una rotación de 45 rpm para evaporar el exceso de disolvente hasta obtener aprox. 5 mL de extracto por muestra. El extracto se transfirió con ayuda de una pipeta Pasteur a un vial de vidrio (previamente pesado) y se le colocó una tapa de papel absorbente para permitir la evaporación total del disolvente y prevenir cualquier contaminación por partículas del aire.

Una vez corroborado que no quedara disolvente en los viales, éstos se pesaron para obtener el peso de la MO soluble en el sedimento (bitumen). Los extractos obtenidos en los viales se analizaron mediante un Cromatógrafo de Gases, marca Hewlett Packard (HP) modelo 6890N con sistema de inyección splitless acoplado a un Espectrómetro de Masas marca HP modelo 5973N; las condiciones de operación del cromatógrafo fueron: columna de sílice fundida de 30 m largo x 0.25mm de diámetro, 0.25 mm de grosor; gas acarreador helio a un flujo de 1 ml/min; rampa de temperatura del horno T= 70°C /1 min, 10°C/min hasta 290°C y 290°C por 17 min; temperatura de inyección 250°C y volumen inyectado 1.0 µL. Todos los análisis fueron realizados en el modo SCAN. La distribución de n-alcanos se determinó en modo de control de iones única (SIM), utilizando la mayor abundancia de m/z de los fragmentos (m/z 57, 71, 85). Los n-alcanos fueron identificados a partir de los espectros de masas y la comparación de tiempos de retención con los datos de la literatura. Para la interpretación de los cromatogramas se utilizó el software ChemStation (Agilent) apoyándose de la base de datos Wiley138 con lo que fue posible identificar los compuestos orgánicos presentes en los extractos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los pesos obtenidos de bitumen, después de la extracción, permitieron conocer la cantidad de recuperación del bitumen en ambas mezclas de disolventes (acetona-hexano y acetona-diclorometano) mediante el método de extracción asistida por microondas (Tabla 1).

Tabla 1. Peso del bitumen extraído por MAE utilizando mezclas de disolventes (acetona-hexano y acetona-diclorometano)

Muestra	Tipo de Roca	Peso del bitumen (g)	
		Acetona-Hexano	Acetona-Diclorometano
Vie 19	Calcarenita	0.0015	0.0015
Vie 20	Calcarenita	0.0004	0.0017
Vie 21	Lutita	0.0017	0.0010
Vie 26	Lutita	0.0006	0.0021
Vie 28	Lutita	0.0006	0.0011

De acuerdo con los pesos obtenidos del bitumen presentado en la tabla anterior, se puede apreciar que en las muestras de calcarenita en la Vie 19 el peso del bitumen obtenido utilizando las dos mezclas de disolventes es el mismo (0.0015 g), pero en la muestra Vie 20 el mayor peso se obtuvo en la mezcla de acetona-diclorometano (0.0017 g). Con lo que respecto a las muestras de lutita en la Vie 21 se obtuvo el mayor peso en la mezcla acetona-hexano (0.0017 g) pero en la Vie 26 y Vie 28 se obtuvo el mayor peso en la mezcla de acetona-diclorometano (0.0021 y 0.0011 g respectivamente). De acuerdo con lo anterior se puede sugerir que independientemente del tipo de roca la mezcla de disolventes idónea para la extracción del bitumen fue la de acetona-diclorometano.

Con lo que respecta a los análisis por Cromatografía de Gases-Masa (CG-MS) en las cinco muestras (Vie 19, 20, 21, 26 y 28) se logró identificar en la materia orgánica soluble (bitumen) a los alcanos lineales como compuestos orgánicos principales pero también se encontraron derivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos como naftaleno, azuleno, antraceno y fenantreno además de aromáticos heterocíclicos derivados de furano y tiofeno como compuestos traza.

La identificación de los alcanos lineales encontrados en las cinco muestras analizadas por CG-MS, se presenta a continuación.

Muestra **Vie 19** correspondiente a una calcarenita con la mezcla de disolvente acetona-hexano se identificó una secuencia de alcanos de $n\text{-C}_{14}\text{H}_{30}$ al $n\text{-C}_{36}\text{H}_{74}$ y $n\text{-C}_{43}\text{H}_{88}$ sin presentar $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}$, $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}$ $n\text{-C}_{33}\text{H}_{68}$ y $n\text{-C}_{35}\text{H}_{72}$ como se aprecia en la Figura 1.

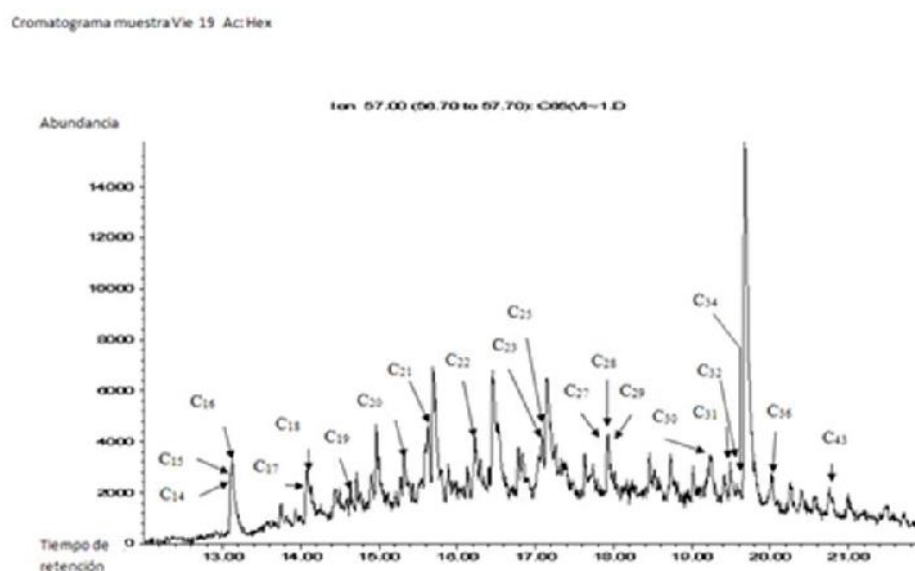


Figura 1. Cromatograma correspondiente a una calcarenita con la mezcla de disolvente acetona-hexano

Muestra **Vie 20** correspondiente a calcarenita con la mezcla de disolvente acetona-diclorometano se identificó una secuencia de alcanos de $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ al $n\text{-C}_{30}\text{H}_{62}$ sin presentar $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}$ y $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}$ como se aprecia en la Figura 2.

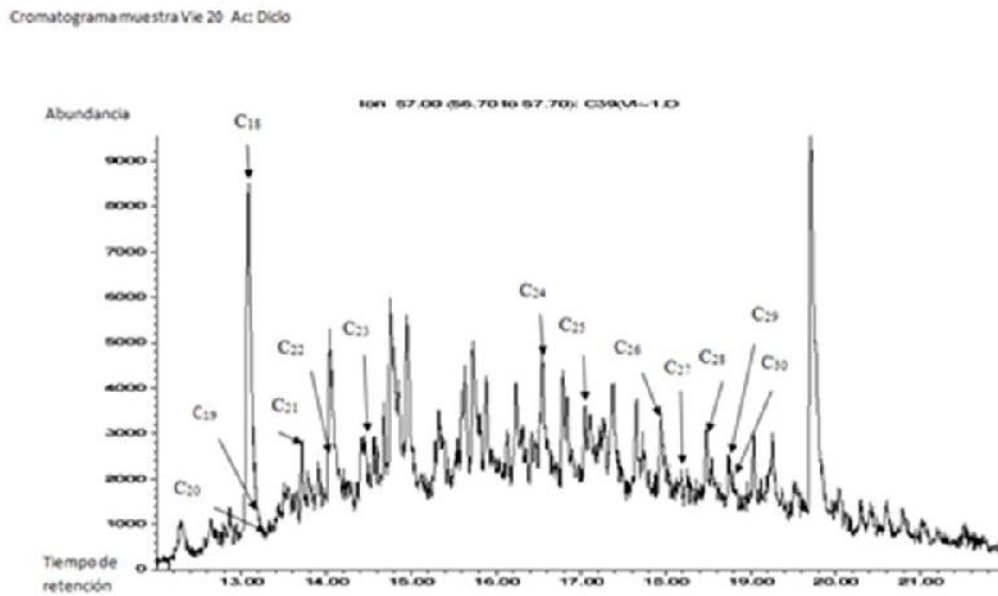


Figura 2. Cromatograma correspondiente a una calcarenita con la mezcla de disolvente acetona-diclorometano

Muestra **Vie 21** correspondiente a lutita con mezcla de disolvente acetona-diclorometano se identificó una secuencia de alcanos de $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$ al $n\text{-C}_{30}\text{H}_{62}$ y $n\text{-C}_{34}\text{H}_{70}$ sin presentar $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}$ y $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}$ como se aprecia en el cromatograma 3.

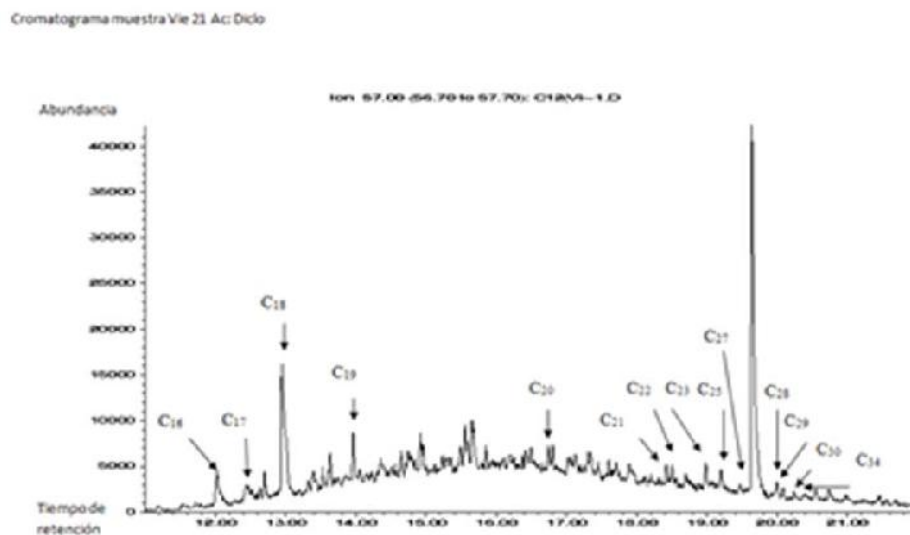


Figura 3. Cromatograma correspondiente a una lutita con mezcla de disolvente acetona-diclorometano

La muestra **Vie 26** corresponde a lutita con mezcla de disolventes acetona-diclorometano se identificó una secuencia de alcanos de $n\text{-C}_{17}\text{H}_{36}$ al $n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$ y $n\text{-C}_{34}\text{H}_{70}$ sin presentar $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}$ y $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}$ como se aprecia en el cromatograma 4.

Cromatograma muestra Vie 26 Ac: Diclo

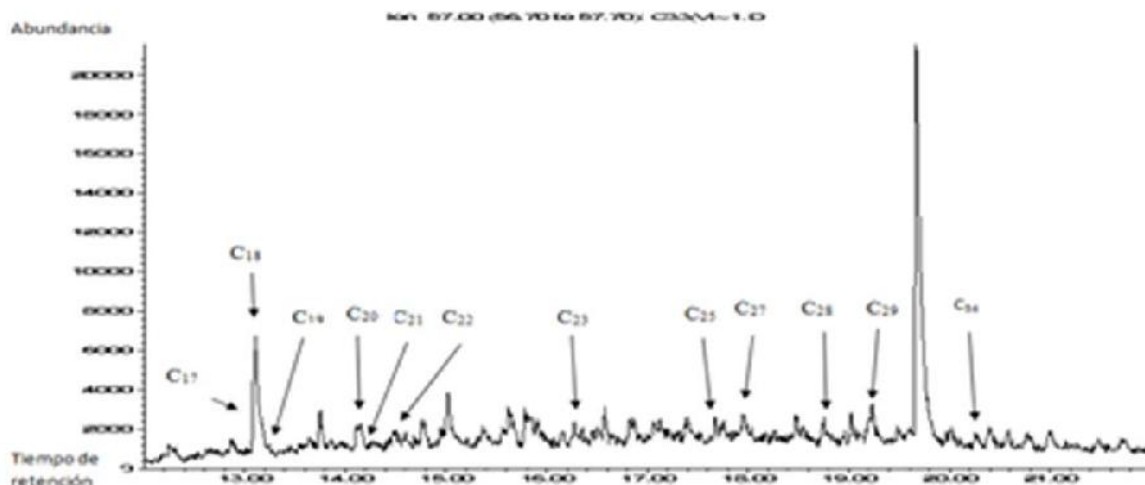


Figura 4. Cromatograma correspondiente a una lutita con mezcla de disolventes acetona-diclorometano

Muestra **Vie 28** corresponde a lutita con mezcla de disolventes acetona-diclorometano se identificó una secuencia de alcanos de $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ al $n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$ sin presentar $\text{C}_{33}\text{H}_{68}$ y $n\text{-C}_{35}\text{H}_{72}$, como se aprecia en el cromatograma 5.

Cromatograma muestra Vie 28 Ac: Diclo

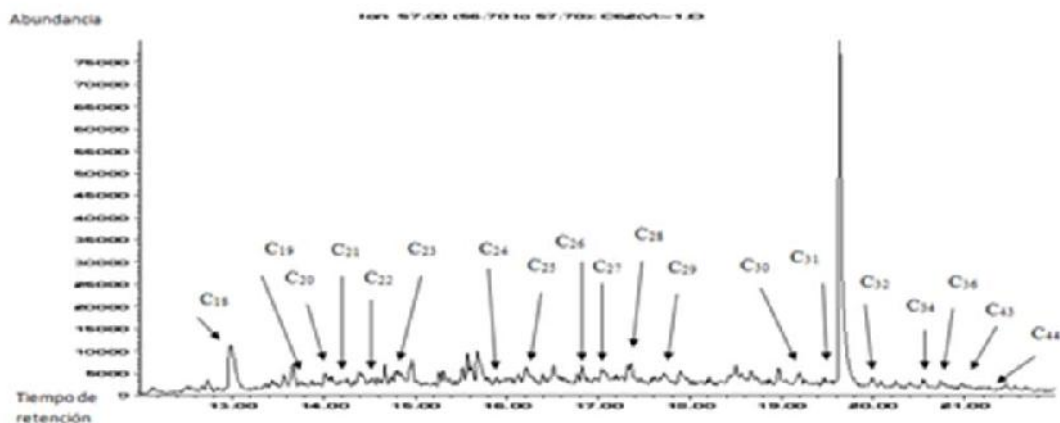


Figura 5. Cromatograma correspondiente a una lutita con mezcla de disolventes acetona-diclorometano

Como se puede observar en los cromatogramas anteriores, los alcanos encontrados con la mezcla acetona-diclorometano van desde $n\text{-C}_{14}\text{H}_{32}$, $n\text{-C}_{16}\text{H}_{34}$, $n\text{-C}_{17}\text{H}_{36}$ y $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ terminado hasta $n\text{-C}_{29}\text{H}_{60}$, $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$, $\text{C}_{36}\text{H}_{74}$ y $n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$, en la mayoría con ausencia de $n\text{-C}_{24}\text{H}_{50}$, $n\text{-C}_{26}\text{H}_{54}$ y $n\text{-C}_{35}\text{H}_{72}$ debido al enmascaramiento con otros compuestos o en su defecto por la contaminación propia de la columna por lo que no se pudieron identificar a excepción de la muestra Vie 28 en donde sí se identificaron, por lo que se puede concluir que en la mezcla acetona-diclorometano se identificaron mejor los alcanos lineales en la mayoría de las muestras independientemente de si se trataba de lutita o calcarenita.

Por otra parte también se pudo apreciar, que solo en una muestra (Vie 19) se identificó alcanos de cadena corta a partir de $n\text{-C}_{14}\text{H}_{32}$, lo que nos indica que los alcanos más pequeños no se alcanzan a separar utilizando la mezcla acetona-diclorometano, pero permite ver alcanos de cadena más larga como $n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$, sin embargo de acuerdo a Pastor, et al., la ausencia de n -alcanos de bajo número de átomos de carbono puede deberse a su eventual evaporación, disolución o biodegradación [8].

CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos podemos concluir que, con respecto al tipo de mezcla de disolventes utilizados para la extracción de la materia orgánica soluble (bitumen) en muestras de lutitas y Calcarenitas, utilizando el método de extracción asistida por microondas (MAE), la mezcla de disolventes que obtuvo la mayor la cantidad de bitumen fue la de acetona-diclorometano, teniendo la ventaja de que en este método reducimos costos tanto de tiempo de extracción, de disolventes y de cantidad de muestra, por lo que para la identificación del origen de la materia orgánica sedimentaria a partir de los alcanos lineales se recomienda el método de extracción asistida por microondas ampliamente.

Con respecto a la identificación de alcanos lineales utilizando la Cromatografía de Gases-Masas, la mezcla de disolvente que mostro mejores identificaciones fue la de acetona-diclorometano, independientemente del tipo de roca, esta mezcla permitió la identificación de alcanos de cadena larga ($n\text{-C}_{44}\text{H}_{90}$); más no es así con los alcanos de cadena corta por debajo de $n\text{-C}_{18}\text{H}_{38}$ debido a su eventual evaporación, disolución o biodegradación.

Finalmente se puede concluir que los cromatogramas obtenidos presentan valores de recuperación altos por lo que se demuestra la eficacia de la extracción utilizando la metodología de extracción asistida por microondas utilizando la mezcla de disolvente acetona-diclorometano.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. K. Chee, M.K. Wong, and H. K. Lee, "Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, vol. 723, 2, 1996a, pp. 259-271.
2. K. K. Chee, M. K. Wong, and H. K. Lee, "Determination of organochlorine pesticides in water by membranous solid-phase extraction, and in sediment by microwave-assisted solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection". *Journal of Chromatography A.*, vol. 736, 1996b, pp. 211-218.
3. K. K. Chee, M. K. Wong and H. K. Lee, "Microwave-assisted solvent-extraction of air particulates for the determination of PAHS. *Environmental Monitoring and Assessment*" vol. 44, 1-3, 1997, pp.391-403.
4. A. Egizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L. A. Fernández, J. M. Madariaga, "Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs", *Analyst*, vol. 123, 1998, pp. 1679-1684.
5. M. P. Llompарт, R. A. Lorenzo, R. Cela and J. R. Paré, "Optimization of a microwave- assisted extraction method for phenol and methylphenol isomers in soil samples using a central composite design". *Analyst*, vol. 122, 1997, 133-137.
6. V. López-Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim and W.F. Beckert, "Extraction of Organic Pollutants from Solid Samples Using Microwave Energy". *Anal. Chem.* Vol. 67, 13., 1995, pp. 2096-2102.

7. M. Olivares, M. Irazola, X. Murelaga, J. I. Baceta, A. Tarrío, K. Castro and N. Etxebarria, "Sourcing sedimentary cherts with archaeological use through the combination of chromatographic and spectroscopic techniques" *Applied Geochemistry*, vol. 33, 2013, pp. 252–259.
8. D. Pastor, J. Sánchez, C. Porte, and J. Albaijes, "The Aegean Sea oil spill on the Galicia Coast (NW Spain). I. Distribution and fate on the crude oil and combustion products in subtidal sediments". *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 42, 2001, pp. 895-904.
9. K. E. Peters, and J. M. Moldowan, "The Biomarker Guide. Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments", in *Prentice Hall, New Jersey*, 1993.
10. M. Piñeiro-Iglesias, P. López-Mahía, E. Vázquez-Blanco, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, "Microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric particulate samples", *J Anal Chem.*, vol. 367, 1, 2000, pp. 29-34.
11. M. M. Punt, G.S.V. Raghavan, J. M. R. Belanger, J. R. J. Pare, "Microwave-assisted process (MAPTM) for the extraction of contaminants from soil. Soil and sediment contamination", vol. 8, 5, 1999, pp. 577 –592.
12. C. Sparr and E. Björklund, "Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography*" A, vol. 902, 2000, pp. 227–250.
13. M. Vandenbroucke and C. Largeau, "Kerogen origin, evolution and structure". *Org. Geochem.* 38, 2007, pp. 719-833.
14. E. Vázquez, P. López, S. Muniategui, D. Prada and E. Fernández, " Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediments: comparison with the Soxhlet extraction method Fresenius". *J Anal Chem.*, vol. 366, 3, 2000, pp. 283-8.
15. M. J. Vázquez, A. M. Carro, R.A. Lorenzo and R. Cela. "Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy", *Anal. Chem.*, vol. 69, 1997, pp. 221-225.