

Artículo Original

**COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
SEDIMENTOS MARINOS EMPLEANDO SOXHLET
Y BAÑO ULTRASÓNICO**

**EXTRACTION METHODS FOR POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBONS IN MARINE SEDIMENTS COMPARISON USING
SOXHLET AND ULTRASONIC BATH**

Orlando Manuel Viera Ribot ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9735-0431>
Sergio Morales Fernández ² <https://orcid.org/0000-0001-8395-0084>

¹ Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos. Carretera Castillo Jagua Km 1 1/2. Juraguá, Cienfuegos, Cuba.

² Departamento de Licenciatura en Farmacia. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

Recibido: Septiembre 5, 2019; Revisado: Noviembre 11, 2019; Aceptado: Diciembre 17, 2019

RESUMEN

Introducción:

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) son moléculas de dos o más anillos aromáticos fusionados, de baja solubilidad en agua y elevada en disolventes orgánicos, además de reconocida capacidad mutagénica y carcinogénica, El Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos cuenta con un método validado de acuerdo con las normas cubanas, para determinar estos compuestos en sedimentos marinos que emplea la extracción con Soxhlet

Objetivo:

Evaluar la sustitución del procedimiento de extracción con Soxhlet por el de extracción con ultrasonidos, por ser esta tecnología más eficiente en cuanto a gasto energético, tiempo de extracción, volumen de disolvente y número de muestras a analizar simultáneamente

Materiales y Métodos:

Se realizaron ensayos comparativos mediante extracción por Soxhlet y baño de ultrasonidos, ocho muestras en cada caso, a un material de referencia certificado. El contenido de HAP se determinó en mediante un cromatógrafo de gases (SHIMADZU)



Copyright © 2020. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

* Autor para la correspondencia: Orlando Viera, Email: oviera@gestion.ceac.cu



GC-2007 con detector de ionización por llama (FID).

Se procedió de acuerdo con lo establecido en las normas cubanas relacionadas con la validación y verificación de métodos analíticos, es decir, evaluar los parámetros de precisión y veracidad para cada procedimiento de extracción, mediante análisis de varianza (ANOVA).

Resultados y Discusión:

Los resultados revelaron que no existen diferencias significativas entre los dos procedimientos de extracción en cuanto a los parámetros precisión y veracidad.

Conclusiones:

Es posible sustituir la extracción por soxhlet con la extracción asistida por ultrasonidos, para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos.

Palabras clave: extracción por Soxhlet; extracción por ultrasonidos; hidrocarburos aromáticos policíclicos; sedimentos.

ABSTRACT

Introduction:

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are molecules with two or more fused aromatic rings with recognized mutagenic and carcinogenic capacity, they have low water solubility and high solubility in organic solvents. The Center for Environmental Studies of Cienfuegos has a validated method, according with Cuban standards, to determine these compounds in marine sediments, which uses Soxhlet extraction.

Objective:

The aim of this work is to evaluate the substitution of Soxhlet extraction procedure by ultrasound extraction, which is a more efficient method in terms of energy consumption, solvent volumes, extraction time and number of samples to could be analyzed.

Materials and Methods:

Comparative tests were carried out by Soxhlet extraction and ultrasonic bath, eight samples in each case, to a certified reference material. PAH content was determined by a gas chromatograph (SHIMADZU) GC-2007 with flame ionization detector (FID). It was proceeded in accordance to Cuban standards related to analytical methods validation and verification, that is, to evaluate precision and veracity parameters for each extraction procedure, by means of variance analysis (ANOVA).

Results and Discussion:

Results revealed that there were no significant differences between the two extraction procedures in terms of precision and veracity.

Conclusions:

Soxhlet extraction can be substituted by ultrasound-assisted extraction to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments.

Keywords: Soxhlet extraction; ultrasound extraction; polycyclic aromatic hydrocarbons; marine sediments.

1. INTRODUCCIÓN

La extracción por Soxhlet es uno de los métodos más utilizados para la extracción de contaminantes orgánicos en muestras ambientales sólidas (Kennicutt et al., 2002, Nieto et al., 2006, Sanz, 2009 y Antizar, 2009). La extracción por Soxhlet ha sido durante muchos años el método estándar de preparación de un extracto a partir de matrices sólidas, es la principal técnica de extracción en estudios de rutina (Sanz et al., 2006) y continúa sirviendo de referencia para comparar la eficacia de nuevas técnicas (Ribot, 2011).

Por otra parte, una técnica de extracción muy sencilla y también ampliamente utilizada es someter la muestra sólida, en contacto con un disolvente, a un tratamiento con ultrasonidos, mediante inmersión en un baño o empleando una sonda, lo que produce una cavitación del disolvente alrededor de las partículas de la matriz, aumentando el contacto con el disolvente y mezclándolo con la muestra. Normalmente se utiliza para muestras granulares, tales como suelos, (López et al., 2016) sedimentos, (Ribot et al., 2018) con un disolvente orgánico apropiado y a temperatura ambiente. La mezcla de muestra y disolvente suele separarse por centrifugación y decantación del disolvente. Esta técnica es sencilla, rápida y permite la extracción de grandes cantidades de muestra con un coste relativamente bajo (López, 2001). Aunque con este método de extracción se obtienen recuperaciones comparables al Soxhlet para determinados analitos y a partir de diversas matrices, (Marvin et al., 2002) normalmente no son superiores a las obtenidas mediante Soxhlet (Sanz, 2009).

La técnica de extracción de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) mediante ultrasonidos se ha utilizado en muestras de alimentos, (Wang et al., 1999) suelos (Coria, 2008) y en sedimento, comparándola con la extracción con Soxhlet (Pörschmann y Plugge, 2008), (Ribot, 2011) y se han obtenido muy buenos resultados con ambos procedimientos. Sin embargo, otros estudios, (Ruiz et al., 2007), muestran que los HAPs de baja masa molar son mejor extraídos con Soxhlet mientras que los de masa molar media y alta no hay diferencias significativas entre Soxhlet y ultrasonidos.

Considerando las ventajas potenciales de la extracción asistida por ultrasonidos para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos, se definió como objetivo de este trabajo, evaluar la posible sustitución del procedimiento de extracción con Soxhlet por el de extracción con ultrasonidos, por ser esta tecnología más eficiente en cuanto a gasto energético, tiempo de extracción, volumen de disolvente y número de muestras a analizar simultáneamente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron ensayos comparativos mediante extracción por Soxhlet (US EPA, 1996) y baño de ultrasonidos (US EPA, 2000) a un material de referencia certificado (IAEA, 2012) que contenía 15 de los 16 HAPs catalogados como contaminantes prioritarios por la agencias medioambientales. En concreto se realizaron ocho extracciones a la misma muestra mediante los dispositivos de extracción por Soxhlet y baño de ultrasonidos, respectivamente.

El estudio estuvo enfocado en la comparación de los resultados de desempeño obtenidos para los parámetros de precisión (bajo condiciones de repetibilidad) y veracidad entre

métodos, de acuerdo con los requerimientos establecidos (ONN, 2010).

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de factor fijo para verificar los valores medios de las concentraciones obtenidas por ambos métodos de extracción, (expresadas en $\mu\text{g/g}$) entre las ocho réplicas para cada compuesto, este análisis de varianza contrastó si la diferencia es significativa o no, en cuanto a la precisión y veracidad de los resultados obtenidos para cada determinación. Para determinar si las diferencias entre los resultados de ambos métodos son significativas, se empleó el contraste estadístico F. Para ello se realizó la siguiente prueba de hipótesis:

- H_0 : No existen diferencias significativas entre réplicas.
- H_1 : Existen diferencias significativas entre réplicas.

Si $F_{\text{Calculada}}$ no excede el valor de $F_{\text{Crítico}}$ de 4,6 (valor de F correspondiente a $n=7$ y $\alpha=0,05$. Tabla de F del análisis de varianza), se aceptará que no existen diferencias significativas entre los resultados del ensayo de recobrado para un 95 % de confianza. Si F calculado es menor que $F_{\text{Crítico}}$, implica que se acepta la hipótesis nula, o sea, los valores de la precisión del método no se afectan por este factor.

Las muestras fueron cuantificadas en un cromatógrafo de gases (SHIMADZU) GC-2007 con detector de ionización por llama (FID) y auto inyector (SHIMADZU) (AOC-20i). Se midieron de acuerdo con la metodología validada según (ONN, 2010) y propuesta en (Ribot et al., 2018).

2.1. Cálculo y expresión de los resultados

El contenido de cada HAPs en $\mu\text{g/g}$, se determinó de la siguiente manera:

$$C_{(\mu\text{g/g})} = \frac{(m*(A_c - A_b) + b)*D*V_{\text{ext}}}{W}$$

(1)

C ($\mu\text{g/g}$): Concentración de HAPs.

m: Pendiente de la curva de calibración del analito.

b: Intercepto de la curva de calibración del analito.

A_c : Área calculada del analito, en μV .

A_b : Área del blanco del analito, en μV .

V_{ext} : Volumen de extracto final, en mL.

D: Factor de dilución.

W: Peso de la muestra inicial, en gramos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación (tabla 1) se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos cuantificados en la medición de ocho réplicas, en condiciones de repetibilidad del material de referencia certificado, por ambos métodos de extracción.

Tabla 1. Resultados obtenidos a partir de la medición realizada a los extractos derivados de las extracciones por Soxhlet y ultrasonido

<i>Compuesto</i>	<i>Extracción por Soxhlet</i>			<i>Extracción por Baño de Ultrasonido</i>			<i>F_{calculada}</i>	<i>F_{Crítica}</i>
	<i>C_{m 8}</i> <i>réplicas</i> <i>(μg/g)</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>	<i>C_{m 8}</i> <i>réplicas</i> <i>(μg/g)</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>		
Naftaleno	0,159	0,015	9,20	0,142	0,007	4,91	8,76	4,60
Acenaftileno	0,044	0,009	21,21	0,037	0,004	11,9	3,15	
Acenafteno	0,171	0,015	8,56	0,165	0,013	7,91	0,95	
Fluoreno	0,199	0,012	5,95	0,202	0,014	6,97	0,16	
Fenantreno	4,006	0,160	4,00	3,891	0,175	4,49	1,90	
Antraceno	0,562	0,029	5,18	0,577	0,065	11,3	0,35	
Fluoranteno	7,919	0,377	4,75	7,881	0,196	2,49	0,80	
Pireno	6,050	0,278	4,60	6,311	0,423	6,71	0,17	
Benzo(a) Antraceno	3,262	0,131	4,02	3,200	0,125	3,90	0,92	
Criseno	3,725	0,214	5,74	3,575	0,192	5,37	2,17	
Benzo(b) Fluoranteno	4,088	0,049	1,19	3,945	0,222	5,62	3,18	
Benzo(k) Fluoranteno	2,037	0,072	3,51	2,071	0,131	6,31	0,41	
Benzo(a) Pireno	2,791	0,078	2,81	2,704	0,200	7,38	1,29	
Indeno(1,2,3- cd) Pireno	2,790	0,228	8,18	2,827	0,154	5,47	0,14	
Benzo(g,h,i) Perileno	2,276	0,126	5,54	2,220	0,085	3,81	1,08	

En cuanto a los coeficientes de variabilidad obtenidos de la medición de las ocho réplicas para cada método de extracción, se observa en la gráfica (figura 1) una tendencia similar para cada uno de los compuestos estudiados. Existe una mayor variabilidad en los resultados de los hidrocarburos aromáticos más volátiles de la mezcla y, por ende, con los menores tiempos de retención. Este incremento es mayor incluso en la extracción mediante el dispositivo Soxhlet, mientras que la extracción por ultrasonidos conduce a mejorías en la precisión de los resultados para los compuestos más volátiles.

Se analizaron los valores de variabilidad de los resultados expresados como CV%. Respecto a la precisión, ambos métodos muestran resultados inferiores al valor normado para cada compuesto (ONN, 2010). Las observaciones muestran una menor variabilidad en los datos analíticos obtenidos con el baño de ultrasonido, respecto a los extraídos por Soxhlet, para los compuestos más volátiles de la mezcla. Este comportamiento se debe al hecho de que en la extracción por ultrasonidos, la agitación es provocada por ondas sonoras que generan ondas de presión cuando se transmiten a través del disolvente y como resultado, se producen burbujas o cavidades en el líquido

que explotan (cavitación). Esto conduce, por una parte, a un incremento local de temperatura que favorece la solubilidad debido a la explosión de la burbuja, y, por otra, a un aumento de presión que provoca una mejor penetración del disolvente al interior del sólido, lo que evita pérdidas de los compuestos más volátiles de la mezcla.

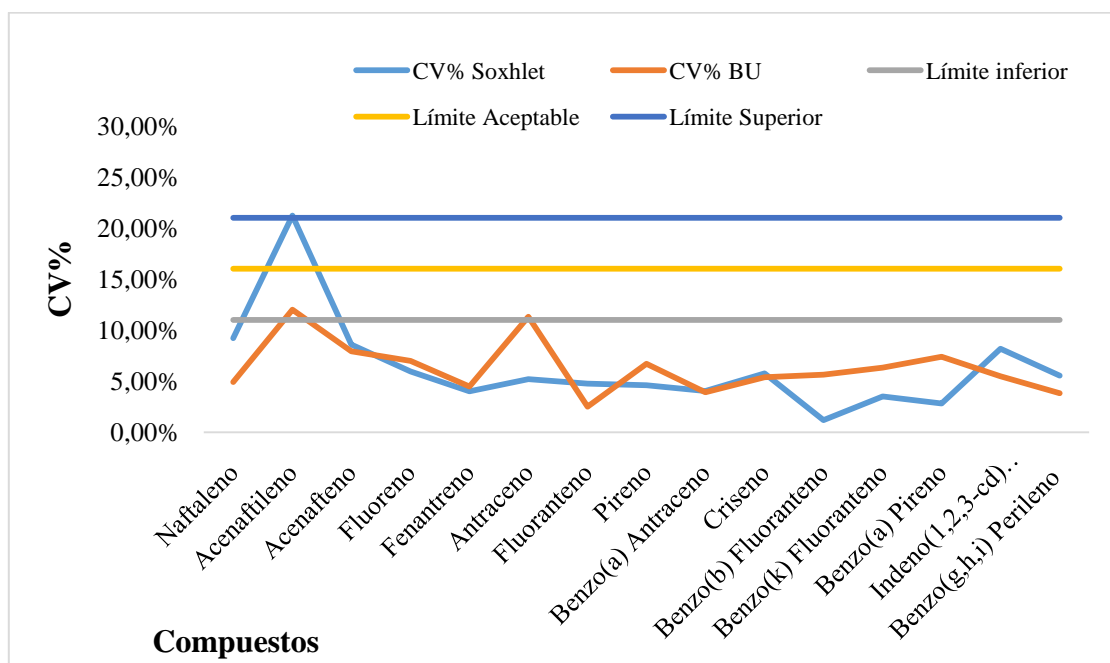


Figura 1. Variabilidad de los resultados para cada compuesto extraído por ambos métodos de extracción

En contraposición, en la extracción por Soxhlet la muestra se encuentra sometida a altas temperaturas (temperatura de ebullición del disolvente) y de forma sostenida, para favorecer los ciclos de extracción. En el resto de los compuestos analizados no existen diferencias marcadas entre ambos métodos en cuanto a la variabilidad de los resultados. Para ampliar el estudio comparativo se realizó un análisis de varianza sobre la base de si existen o no diferencias significativas entre los resultados de ambos métodos. Dicho análisis mostró que: como $F_{Calculada}$ no excedió el valor de $F_{Crítico}=4,6$ (ver tabla 1), se aceptó la hipótesis nula con una confianza del 95 %, por lo tanto, las extracciones realizadas por ultrasonidos no difieren respecto a las realizadas por Soxhlet.

Lo anterior justifica poder utilizar la extracción asistida por ultrasonido para determinar HAPs en sedimentos marinos en lugar del Soxhlet, para aprovechar las ventajas mencionadas previamente. Esto coincide con trabajos similares previamente realizados por Azuola y Vargas (2007) y compuestos de interés ambiental, así como Taborda et al., (2018) para la comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación de aceites esenciales en semillas de quinoa.

La tabla 2, muestra los resultados del ensayo de veracidad obtenidos a partir de la extracción realizada con ambos métodos a una misma muestra certificada.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la prueba de veracidad para los extractos derivados de las extracciones por soxhlet y ultrasonido

<i>Compuesto</i>	<i>Extracción por Soxhlet</i>			<i>Extracción por Baño de Ultrasonido</i>			F_{calc}	$F_{Crít}$
	<i>Recobrado medio</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>	<i>Recobrado medio</i>	<i>S</i>	<i>CV%</i>		
	<i>%</i>			<i>%</i>				
Naftaleno	106,25	9,78	9,20	96,33	7,22	7,49	5,32	4,60
Acenaftileno	102,08	17,14	16,79	85,71	10,24	11,95	2,75	
Acenafteno	95,21	8,15	8,56	93,89	6,49	6,92	0,13	
Fluoreno	93,59	2,87	3,07	96,52	3,97	4,12	3,87	
Fenantreno	102,73	4,11	4,00	99,82	4,51	4,52	1,81	
Antraceno	95,93	2,54	2,64	91,51	10,41	9,38	1,37	
Fluoranteno	102,84	4,89	4,75	102,49	2,83	2,76	0,03	
Pireno	100,83	4,63	4,60	107,78	7,90	7,33	5,58	
Benzo(a) Antraceno	101,93	4,10	4,02	100,77	4,34	4,30	0,30	
Criseno	103,46	5,94	5,74	99,51	5,72	5,75	0,02	
Benzo(b) Fluoranteno	99,70	1,19	1,19	96,49	5,59	5,80	2,52	
Benzo(k) Fluoranteno	101,85	3,58	3,51	103,98	6,93	6,67	1,51	
Benzo(a) Pireno	99,66	2,80	2,81	96,69	7,22	7,46	1,17	
Indeno(1,2,3-cd) Pireno	103,34	8,45	8,18	107,96	8,29	7,68	1,22	
Benzo(g,h,i) Perileno	98,94	5,48	5,54	97,65	4,62	4,73	0,26	

Los porcentajes de recuperación de ambos métodos se encuentran dentro del intervalo establecido para análisis cromatográfico (70-120%), para cada uno de los analitos medidos. De igual manera se puede decir lo mismo en cuanto a los porcentajes de los coeficientes de variación respecto al valor normado (menor que 16%) (ONN, 2010).

Esta comparación permite evaluar la veracidad de ambos métodos de extracción mediante la comparación de los resultados medidos, expresados en el del ensayo de recobrado.

Al trabajar con herramientas estadísticas es muy útil emplear gráficos que ofrezcan información visual del comportamiento de las variables en estudio, especialmente cuando se realizan comparaciones entre métodos. Si no hubiesen diferencias, el comportamiento de los valores graficados se presentaría sobre la línea con valor cero (el resultado de un método es igual al que da el otro método, (figura 2). Sin embargo, si existen diferencias, el comportamiento de los valores se desplazará hacia un lado de la línea correspondiente al cero.

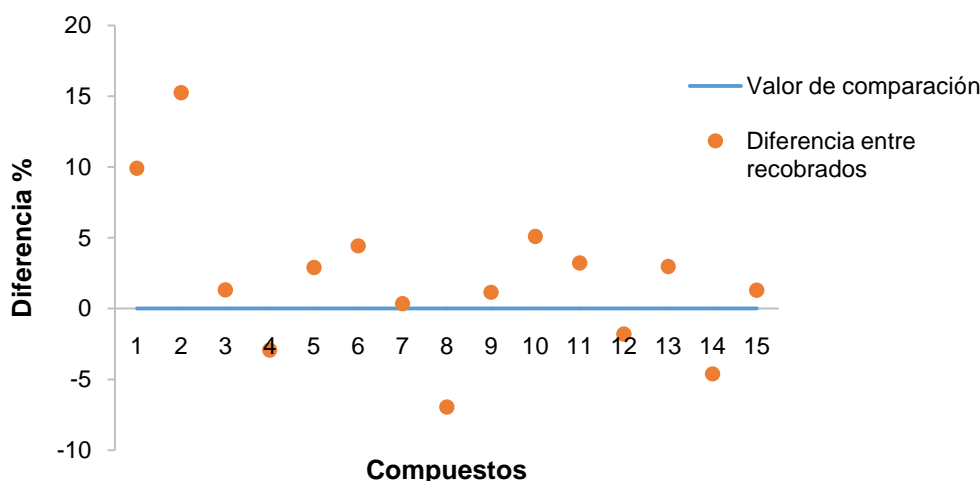


Figura 2. Diferencias entre los valores medios del ensayo de recobrado, obtenidos a partir de la extracción por soxhlet y asistida por ultrasonido

De esto se deriva que teniendo en cuenta los resultados del ensayo de verificación realizado a la extracción por ultrasonido al material de referencia, así como lo obtenidos mediante la comparación de estos con la extracción por Soxhlet previamente validada, los contenidos de HAPs se consideran veraces y el método apto para aplicarse en muestras reales, de acuerdo con lo establecido en la normativa vigente.

4. CONCLUSIONES

1. Según los resultados obtenidos del estudio de precisión para la extracción mediante ultrasonidos y Soxhlet, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos y la variabilidad de los resultados obtenidos por ultrasonidos para todos los compuestos cumple con los valores normados para este parámetro.
2. Los resultados de recobrados para ambos métodos de extracción no muestran diferencias significativas e, igualmente, la extracción por ultrasonido cumple con los valores normados para este parámetro.
3. De acuerdo con la comparación entre ambos métodos de extracción, se puede sustituir la extracción con Soxhlet por la extracción con ultrasonidos en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos.

REFERENCIAS

- Antizar, L.B., Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalates and organotins in northern Atlantic Spain's coastal marine sediments., *Journal of Environmental Monitoring*, Vol. 11, No. 28, 2009, pp. 85-91.
- Azuola, R., & Vargas P., Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EuA)., *Tecnología en Marcha*, Vol. 20, No. 4, Octubre – Diciembre, 2007, pp. 30-40.
- Coria, L.S., Evaluación de la toxicidad de hidrocarburos poliaromáticos en un sistema acuático y su aplicación en la ponderación de evidencias., Tesis presentada en opción al grado Científico de Máster en Ciencias, especialidad de Toxicología, Instituto Politécnico Nacional, México. 2008.

- IAEA., Reference Material IAEA-417, Organochlorine and petroleum hydrocarbons in a sediment sample., AGENCY, Editorial IAEA, Viena, Austria: Analytical Quality Control Services, 2012, pp. 1-8.
- Kennicutt, M.C., McDonald, T.J., Denoux, G.J., & McDonald, S.J., Hydrocarbon contamination on the Antarctic Peninsula I, Arthur Harbor-Subtidal sediments., *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 24, No. 10, 2002, pp. 499-506.
- López A.V., Sample preparation for environmental analysis, *Critical Reviews, Analytical Chemistry*, Vol. 29, No. 3, 2001, pp. 195-230.
- López, G.P, Gómez, P.M. & Duaso, A.I.H., Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados., *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, Vol. 10, No. 1, 2016, pp. 1-15.
- Marvin, C.H., Allan, L., McCarry B.E., & Bryant, D.W., A Comparison of Ultrasonic Extraction and Soxhlet Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Sediments and Air Particulate Material., *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Vol. 49, No. 4, 1992, pp. 221-230.
- Nieto, O., Aboigor, J., Buján, R., N'diaye, M., Graña, M.J., Saco-Alvarez, L., Franco, M.A., Soriano, J.A. & Beiras, R., Temporal Variation of the levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Galician coast after the Prestige oil spill., *Marine Ecology Progress Series*, Vol. 328, 2016, pp. 41-49.
- ONN., Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos., TS 368: 2010 Norma Cubana, Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización, 2010.
- Pörschmann, J., & Plugge, J., Extraction of polar and hydrophobic pollutants using accelerated solvent extraction (ASE)., *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, Vol. 264, No. 7, 2008, pp. 45-56.
- Ribot, O.V., Validación parcial del método analítico para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos por la norma EPA 8100., Tesis presentada en opción al título de Licenciado en Química, Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Cuba, 2011.
- Ribot, O.V., Asencio, M.D. & Gallo, Y.M., Niveles de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) acumulados en sedimentos del embalse Hanabanilla, Villa Clara, Cuba., *Infociencia*, Vol. 22, No. 1, 2018, pp. 1-12.
- Ruiz, F.A., Frignani, C.M., Hillaire-Marcel, C., Ghaleb, B., Arvizu, M.D., Raygoza, V.J.R. & Páez, O.F., Trace Metals (Cd, Cu, Hg, and Pb) Accumulation Recorded in the Intertidal Mudflat Sediments of Three Coastal Lagoons in the Gulf of California, Mexico., *Estuaries*, Vol. 12, No. 2, 2007, pp. 5-13.
- Sanz, J.A.S., Evaluación y seguimiento del contenido del hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del b/t Prestige., Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Química, Universidad da Coruña, España, 2009.
- Sanz, L.J., Bartolome, L., Zuloaga, O., González, I., Dietz, C. & Cámara, C., Accelerated extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 384, No. 6, 2006, pp. 1331-1340.
- Taborda, B., Telles, I., Pareja, L., Niell, S., Jesús, F., López, A., Comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación del perfil lipídico en semillas

de quinoa., Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, No. 17, 2018, pp. 78-87.

US EPA, U., Method 3540c soxhlet extraction. EPA, Washington, Virginia, USA: Environmental Protection Agency of United States of América, 1996, pp. 1-8.

US EPA, U., Method 3540c ultrasonic extraction. EPA, Washington, Virginia, USA: Environmental Protection Agency of United States, 2000, pp. 1-17.

Wang, G., Lee, A.S., Lewis, M., Kamath, B., & Archer, R.K., Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples., Journal of Agricultural & Food Chemistry, Vol. 47, No. 3, 1999, pp. 1062-1066.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

- M.Sc. Orlando Viera Ribot. Realizó el trabajo de evaluación experimental de las muestras, el análisis y discusión de los resultados y preparó la versión inicial del manuscrito.
- Dr.C. Sergio Morales Fernández. Asesoró el diseño del estudio, participó en el análisis y discusión de los resultados obtenidos y en el proceso de corrección del documento escrito.