

Coeficientes de partición de hidrocarburos aromáticos policíclicos con sustancias húmicas: un método simple para su determinación

Mastrángelo^{a,1} M, Topalián^a M, Mortier^b C du y Fernández Cirelli^{b,2} A

^a Programa de Ecofisiología Aplicada. Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján. Casilla de Correo 221. B6700ZBA-Luján, Argentina. Tel. +54-2323-420380 (int.246). Fax: +54-2323-425795. e-mail: prodea@mail.unlu.edu.ar

^b Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua y Cátedra de Química Orgánica de Biomoléculas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina

¹ Becaria Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

² Investigadora Principal CONICET

Recibido 24 de Septiembre de 2003 / Aceptado 3 de Mayo de 2005

Resumen: Las sustancias húmicas son componentes importantes de las aguas naturales, son polímeros ácidos, predominantemente aromáticos, que no resultan nocivos a los seres vivos. Sin embargo, su rol en el medio ambiente es importante porque afectan a la biodisponibilidad y toxicidad de muchos compuestos en el ambiente acuático. Por otra parte, entre los contaminantes de los sistemas acuáticos, se hallan los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), algunos de los cuales son cancerígenos. Esta serie de compuestos en general está presente en el ambiente como mezclas complejas, presentando un rango muy variado de propiedades químicas, físicas y toxicológicas.

En el presente trabajo, se estudió la interacción de sustancias húmicas con fenantreno y antraceno, separados o en mezcla, determinándose los coeficientes de partición (K_{oc}) de las sustancias entre el carbono orgánico disuelto y la fase líquida por una metodología sencilla que utiliza extracción en fase sólida y determinación por espectrofotometría UV-visible. Los valores de K_{oc} obtenidos son comparables con los referidos para estos compuestos por aplicación de otras técnicas.

El método descrito es una herramienta que puede ser útil para analizar la interacción de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos con las sustancias húmicas.

Palabras clave: hidrocarburos aromáticos polinucleares* fenantreno* antraceno* sustancias húmicas* coeficientes de partición (K_{oc}).

Abstract: Binding coefficients of polycyclic aromatic hydrocarbons to humic substances: a simple method for their determination. Humic substances are major components of natural water. They are acidic polymers, mostly aromatic and usually harmless. However, they play an important role because they affect bioavailability and toxicity of many compounds in aquatic environments. Polycyclic aromatic hydrocarbons (some of them carcinogenic) are considered to be some of the most common pollutants of aquatic systems. They are usually found in the environment as complex mixtures exhibiting a wide range of physical, chemical and toxicological properties.

In the present work, the interaction between humic substances and phenantrene and anthracene, individually or in mixtures, was studied. Partition coefficients of the substances between

dissolved organic carbon and liquid phase were estimated by a simple methodology involving solid phase extraction and UV-VIS spectrophotometry. K_{oc} values obtained by this means are comparable with those obtained using other methods.

The method described is a valuable tool for analyzing interactions of hydrophobic pollutants with humic substances.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons* phenantrene* anthracene* humic substances* binding coefficients (K_{oc}).

Introducción

El ambiente está sujeto a la influencia de una creciente cantidad de compuestos antropogénicos naturales y sintéticos de una enorme variedad química que pueden producir un conjunto de efectos adversos en el ecosistema el cual posee la capacidad de amortiguar la acción de dichos compuestos a través de sus distintos componentes y mecanismos homeostáticos tales como reacciones químicas, acción de microorganismos, etc. [1]

Un componente importante de las aguas naturales son las *sustancias húmicas* (SH), polímeros ácidos predominantemente aromáticos, que conforman la fracción mayoritaria (50-80%) de la *materia orgánica disuelta* (MOD) [2, 3].

Las sustancias húmicas no resultan, en general, nocivas a los seres vivos. Sus propiedades y su rol en el medio ambiente son importantes en ciertos procesos ligados a la contaminación. Los procesos de sorción afectan la biodisponibilidad y toxicidad de un compuesto en el ambiente acuático. De este modo, el efecto adverso de algún compuesto orgánico en aguas naturales puede ser mitigado por la cantidad y el tipo de sustancias húmicas presentes en dichos sistemas [4-7].

Entre los compuestos orgánicos hidrofóbicos encontrados como contaminantes de los sistemas acuáticos, figuran los *hidrocarburos aromáticos policíclicos* (HAPs). Los HAPs pertenecen a una de las clases de contaminantes hidrofóbicos orgánicos más peligrosas debido a que muchos de los compuestos de la serie son cancerígenos. Fueron identificados tanto en aguas naturales como en las residuales, en particular, en nuestro país se ha documentado su presencia en sistemas acuáticos [8, 9]. Generalmente están presentes como mezclas complejas, presentando un

rango muy variado de propiedades químicas, físicas y toxicológicas [10]. Los altos niveles de HAPs son atribuidos principalmente a fuentes antropogénicas tales como derrames de petróleo, emanaciones de automóviles, procesos de destilación de crudo, combustión incompleta en incineradores, centrales de energía, etc. [7]. Como para otros xenobióticos, el transporte, distribución y biodisponibilidad de los HAPs en el ambiente acuático y terrestre dependen de su partición entre el agua, la materia orgánica disuelta y el suelo o materia orgánica en el sedimento [8, 9].

Considerando el gran número de contaminantes cuyas propiedades fisicoquímicas varían tanto entre sí, y la gran diversidad estructural de las sustancias húmicas presentes en el medio, se hace necesario tener datos suficientes para evaluar la sorción de los tóxicos a la materia orgánica [11]. La relación entre el compuesto unido a la sustancia húmica y el compuesto libre es una medida de su distribución entre la fase acuosa y la materia orgánica en los sistemas naturales y se expresa como Koc, coeficiente de partición de la sustancia entre el *carbono orgánico disuelto* (COD) y la fase líquida.

La interacción de los contaminantes orgánicos con las *sustancias húmicas disueltas* (SHD) se ha estudiado por numerosos métodos, que involucran la separación por diálisis, la cromatografía de exclusión por geles o en fase reversa, y determinación por fluorometría o radioactividad usando material marcado. Todos tienen algún tipo de limitación, que pueden llevar a gran incertidumbre en las determinaciones de Koc [12, 13]. Estos métodos fueron desarrollados para los diferentes HAPs en soluciones individuales de los mismos. Recientemente, se estudió la asociación de los 16 HAPs considerados prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), con coloides [14].

El objetivo de este trabajo fue comparar el comportamiento de fenantreno y antraceno en soluciones individuales o en mezclas en presencia de sustancias húmicas, mediante la determinación de los Koc en cada uno de los casos. Los HAPs se encuentran habitualmente como mezclas complejas y la metodología presentada permitiría estudiar los posibles efectos sinérgicos o antagonistas.

Material y métodos

Reactivos

Se utilizaron fenantreno y antraceno (*Ultrascientific*, 98% pureza), *Acido Húmico* (AH) (*Aldrich*) conteniendo 42% de carbono (determinado por microanálisis). Los solventes utilizados fueron: metanol y hexano (JT Baker, grado analítico), acetonitrilo (Merck, grado HPLC), y agua bidestilada.

Soluciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Se prepararon soluciones patrón disolviendo individualmente fenantreno y antraceno en agua con gotas de acetona en concentraciones menores a la solubilidad acuosa de cada uno de los compuestos. Las mismas fueron almacenadas en oscuridad a 4 °C. Las concentraciones de trabajo fueron 180 µg/L para Fenantreno y 33 µg/L para Antraceno, tanto para las experiencias de interacción de los mismos individualmente como en mezcla.

Soluciones de sustancia húmica

Se considera sustancia húmica disuelta (SHD) a la sustancia húmica que pasa por un filtro de membrana con tamaño de poro de 0,45 µm. Esta es una definición operacional y sin intención de involucrar ningún concepto físico-químico que haga diferencias entre material soluble y coloidal [9]. Se prepararon soluciones patrón de 200 mg/L de SHD, disolviendo AH seco en agua y luego de agitar por lo menos una hora (agitador magnético), se filtró por membrana de poro 0,45 µm. El filtrado se almacenó a 4 °C, por un período no superior a dos semanas [4]. Antes de utilizar la solución patrón de SHD se dejó alcanzar la temperatura ambiente. Se realizaron ensayos con concentraciones de SHD entre 0 y 16 mg/L (correspondientes a 0,00, 0,86, 1,72, 2,58, 3,50, 4,20 y 6,72 mg/L de COD respectivamente), que corresponde a las concentraciones encontradas en los ambientes acuáticos naturales [2,13]. Al graficar, la tendencia lineal se mantenía para las primeras seis, se descartaron los datos pertenecientes a las últimas.

Interacción entre HAPs y SHD

Para determinar los valores de Koc se llevaron a cabo los siguientes experimentos de interacción por triplicado. En frascos de vidrio color ámbar se agregaron alícuotas de soluciones patrón de SHD, de HAP y agua en las cantidades requeridas para alcanzar la concentración deseada en cada experiencia.

Con las SHD en el rango de concentraciones 0-16 mg/L, se realizaron tres series de experimentos: a) con Fenantreno, b) con Antraceno, c) mezcla de Fenantreno y Antraceno. El volumen total de la solución de interacción fue de 40 ml.

Método de extracción

Para la separación de los HAP libres de los unidos a SHD se utilizó extracción en fase sólida. Para ello se utilizaron cartuchos *Sep-Pak* (Merck, Lichrolut® RP-18) rellenos con 100 mg de fase reversa C₁₈, los cuales retienen los HAP libres, poco polares, y dejan pasar los unidos a la SHD, más solubles en la fase acuosa.

En una experiencia típica, las columnas de C₁₈ de los cartuchos fueron preacondicionadas dejando fluir por gravedad sucesivamente 2 ml de metanol, 2 ml de acetonitrilo y 2 ml de agua bidestilada. Después de hacer pasar la solución de interacción a través de los cartuchos, los mismos se enjuagaron con 2 ml de agua. Luego de la extracción, los HAP retenidos en la columna, se eluyeron con 5 ml de hexano protegiéndolos de la luz, para luego medir la absorbancia de los HAP.

Para comprobar la capacidad de retención de los cartuchos se pasaron cantidades conocidas de la solución patrón de cada HAP. En el solvente de lavado, se comprobó que no hubiera absorbancia característica del HAP.

El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente forma:

Se pasó a través de un cartucho de extracción una cantidad de HAP equivalente a la utilizada en cada experiencia de interacción. Una vez eluido con hexano al mismo volumen final de las experiencias (5 ml), se midió la absorbancia en UV-Visible. Para calcular el porcentaje de recuperación de HAP, se comparó dicha absorbancia con la obtenida en el blanco de la experiencia de interacción ([COD]= 0,00 ppm). Los valores obtenidos fueron 80 % y 78 % para fenantreno 180 µg/L y antraceno 33 µg/L res-

pectivamente. De acuerdo a las condiciones de trabajo, se consideró que dicha recuperación era aceptable.

Además, se realizó un blanco de reactivos para cada concentración de SHD. Se prepararon soluciones de agua y SHD en condiciones idénticas a una experiencia de interacción pero sin HAP las que fueron sometidas al proceso de extracción en fase sólida mencionado anteriormente. Esta serie de blancos de reactivos se realizó para comprobar que no quedara SHD retenida al C18 que pudiera eluirse con el hexano utilizado para extraer los HAP. En ningún caso se detectó absorbancia a 254 nm en las fracciones de hexano.

Cuando se trabajó con mezclas de HAP se evaporó el hexano a presión reducida y temperatura no mayor a 65 °C, redisolviendo en volumen conocido de acetonitrilo para posterior cuantificación por CLAR.

Análisis instrumental

Las mediciones de absorbancia de las muestras conteniendo Antraceno o Fenantreno individualmente, se realizaron en un espectrofotómetro JASCO 7500 a 254 nm.

La separación y cuantificación de los HAPs en mezcla se llevó a cabo por *cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)* en un equipo *LKB-Pharmacia* con detector UV-visible. En este caso las condiciones utilizadas fueron: Fase Móvil: Acetonitrilo:Agua (70:30); Columna: Fase Reversa de C₁₈, 250 x 46 mm; Flujo: 1 ml/min; Temperatura: 25 °C; Volumen de inyección: 20 µl; Longitud de Onda: 254 nm.

Cálculo de K_{oc}:

La determinación de la capacidad de interacción SHD-compuesto xenobiótico se lleva a cabo calculando el coeficiente de partición, K_{oc}. Los K_{oc} se calculan en base a la concentración del xenobiótico libre, relacionándola con la cantidad de SHD. Para el cálculo de K_{oc}, se tuvo en cuenta la siguiente relación: $[HAP]_T / [HAP]_{SN} = 1 + K_{oc} [COD]$; siendo $[HAP]_T$ = concentración de hidrocarburo aromático polinuclear total, $[HAP]_{SN}$ = concentración de hidrocarburo aromático polinuclear libre y $[COD]$ = concentración de carbono orgánico disuelto.

Para poder calcular el coeficiente de partición mediante el método presentado, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

La asociación de los HAP con la SHD puede representarse mediante las siguientes ecuaciones



$$K_a = \frac{[HAP - SHD]}{[HAP] \cdot [SHD]} \quad (2)$$

donde $[HAP]$ = concentración de HAP, $[SHD]$ = concentración de sustancia húmica disuelta,

$[HAP-SHD]$ = concentración de HAP unido a SHD y K_a = constante de asociación.

El balance de masa del HAP en solución es

$$[HAP]_T = [HAP] + [HAP - SHD] \quad (3)$$

donde $[HAP]_T$ es la concentración nominal o total de HAP.

De la ecuación 2 y la ecuación 3, y reordenando se llega a:

$$\frac{[HAP]_T}{[HAP]} = 1 + K_a \cdot [SHD] \quad (4)$$

Considerando que la absorbancia (A) es proporcional a la concentración de HAP libre en solución ($[HAP]$), entonces

$$\frac{A_o}{A} = 1 + K_a \cdot [SHD] \quad (5)$$

donde A_o y A son la absorbancia en ausencia y presencia de SHD, respectivamente.

En el rango de las concentraciones de trabajo, la cantidad de SHD sin unirse a HAP es mucho mayor que la que puede estar unida. Por lo tanto, se tiene en cuenta como $[SHD]$ a la cantidad de SHD utilizada para preparar las soluciones.

Por otro lado, el cociente de K_a por la fracción de carbono orgánico en solución (f_{oc}), corresponde a K_{oc} , coeficiente de partición normalizado a carbono orgánico disuelto. Esto es:

$$K_{oc} = \frac{K_a}{f_{oc}}; \text{ donde } f_{oc} = \frac{[COD]}{[SHD]} \quad (6)$$

Reemplazando en la ecuación 5 se llega a:

$$\frac{A_o}{A} = 1 + K_{oc} \cdot [COD] \quad (7)$$

El valor de K_{oc} está referido al carbono orgánico expresado en L/kg.

En los experimentos donde se estudian las mezclas de fenantreno y antraceno en interacción con SHD, se considera el área (S) de los picos de cada uno al separarlos por CLAR proporcional a la concentración de HAP libre en solución, entonces se llega a:

$$\frac{S_o}{S} = 1 + K_{oc} \cdot [COD] \quad (8)$$

Análisis estadístico

Para calcular las regresiones lineales para obtener el valor de K_{oc} en cada serie, se tomaron los promedios de los puntos obtenidos en las determinaciones. El error asociado a los valores de K_{oc} se obtuvo a partir del error típico calculado para la pendiente de cada regresión lineal.

Se utilizó un método de comparación de coeficientes de regresión correspondientes a dos poblaciones de datos, basado en la *t* de Student [15]. Mediante dicho método se compararon las regresiones lineales obtenidos para cada HAP, en condiciones de interacción con SHD en forma individual y en mezcla con el otro HAP. El objeto de comparar dichos valores es estudiar el efecto que produce la presencia de un HAP de la serie cuando se calcula el K_{oc} .

Resultados y discusión

Los valores de Koc para antraceno y fenantreno utilizando como SHD el mismo AH que en el presente trabajo han sido determinados por varios métodos (2,3,12). De esta manera, fue posible comparar los valores de Koc obtenidos por distintos métodos y corroborar que el método aquí presentado es válido para calcular Koc.

Se realizaron experiencias de interacción entre fenantreno o antraceno y SHD. Se trabajó primero con soluciones de un solo HAP en interacción con la SHD. Se calcularon los Koc correspondientes (Koc individuales) y se compararon con los datos bibliográficos.

En la Figura 1, se muestra la regresión lineal utilizada para determinar los Koc individuales para cada HAP ensayado, a partir de la representación de Ao/A vs [COD].

Los valores de los Koc calculados a partir de los datos obtenidos en los experimentos de interacción entre SHD y los HAP utilizados en este trabajo (Figura 1) en el caso de las soluciones de los mismos individualmente son: $5,75 \cdot 10^4 \pm 1,48 \cdot 10^4$ L/kg para fenantreno y $5,56 \cdot 10^4 \pm 0,67 \cdot 10^4$ L/kg para antraceno.

En las Tablas 1 y 2 se muestran nuestros resultados de Koc junto con los valores obtenidos por distintos métodos y por otros autores para antraceno y fenantreno respectivamente. Como se aprecia, los obtenidos en este trabajo estuvieron dentro del rango determinado por otros investigadores, lo cual indica que el método descrito (Extracción en fase sólida y determinación por UV-Visible) es adecuado para estudiar las interacciones entre SH e HAP.

Habiendo corroborado que los Koc obtenidos son comparables a los que aparecen en la bibliografía, se calcularon los valores de Koc pero realizando las experiencias de interacción entre mezclas de fenantreno y antraceno con SHD. La cuantificación de los mismos se realizó por CLAR con detección UV-visible.

En la Figura 2, se muestra la regresión lineal utilizada para determinar los Koc en los experimentos de interacción entre SH y mezcla de fenantreno y antraceno, a partir de la representación de So/S vs [COD] para cada HAP.

Los valores de Koc calculados a partir de los datos obtenidos para los experimentos de interacción entre SH y mezcla de

fenantreno y antraceno son: $5,42 \cdot 10^4 \pm 0,65 \cdot 10^4$ L/kg para fenantreno y $5,86 \cdot 10^4 \pm 2,04 \cdot 10^4$ L/kg para antraceno.

Al efectuar el test de comparaciones de las regresiones lineales, se obtuvieron valores de t menores a los t de Student correspondientes (para antraceno $t_{0,05(2)10}^{student}$: 2,228 y t_{exp} : -0,140, para fenantreno: $t_{0,05(2)7}^{student}$: 2,365 y t_{exp} : 0,449). Estos valores indican que las pendientes no son diferentes para las poblaciones de puntos obtenidos en las experiencias de los HAP individuales y en mezcla. Este resultado indica que se podría determinar el valor de Koc de varios HAP interaccionando con SHD simultáneamente en una misma solución, lo cual es una ventaja, ya que no habría problemas debido a interferencias por la presencia de otros compuestos de la misma serie.

Conclusiones

En este trabajo se presenta un método sencillo para el estudio de la interacción entre HAPs y SHD en soluciones acuosas. Esta interacción puede interpretarse como uno de los mecanismos de reducción de la biodisponibilidad y toxicidad de estos hidrocarburos en el ambiente. Por lo tanto, el cálculo de Koc puede utilizarse para predecir la reducción de la concentración de HAP en el medio acuoso en particular.

El método aquí descrito brinda varias ventajas. Es simple, no requiere instrumentación específica, no se limita a compuestos fluorescentes, por lo tanto es potencialmente aplicable a muchas clases de compuestos que posean la capacidad de absorber en el UV-Visible.

Los Koc obtenidos para los experimentos de cada compuesto individualmente y en competencia no presentan diferencias significativas. Se concluye, entonces, que se puede determinar el valor de Koc de varios HAPs interaccionando con SHD simultáneamente en una misma solución.

Cuando las aguas naturales se hallan contaminadas por hidrocarburos pesados lo están por mezclas de HAPs. De ahí la importancia de poder contar con un método que permita obtener valores de Koc de cada uno de ellos en presencia de los otros. Por ello, consideramos muy útil el método descrito ya que no es necesario aislar los compuestos individuales para estudiar su biodisponibilidad. Esta no se vería afectada, siempre que la concentración de SHD no actúe como limitante en cuanto a los sitios donde puedan unirse los compuestos hidrofóbicos.

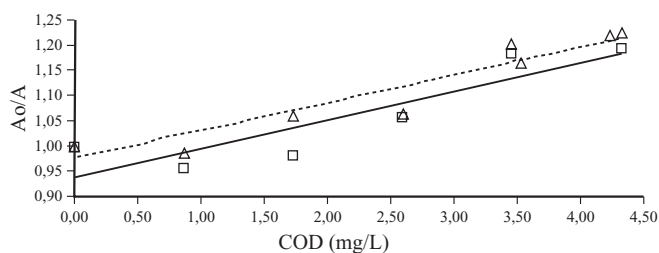


Fig. 1. Representación de Ao/A en función de la concentración de COD para experimentos de interacción entre SH y HAP individualmente. □ fenantreno ($Ao/A=0,0575 \cdot COD+0,9379$; $r^2=0,7903$); Δ antraceno ($Ao/A=0,0556 \cdot COD+0,9754$; $r^2=0,9068$). Los valores de Koc se calculan a partir de las pendientes de las curvas.

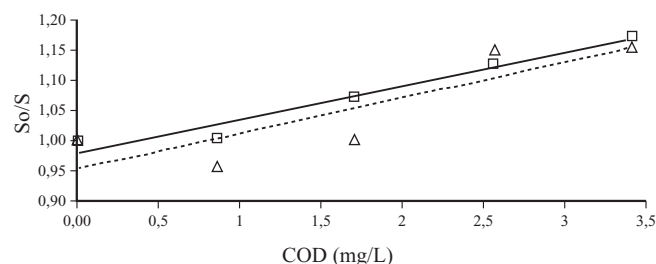


Fig. 2. Representación de So/S en función de la concentración de COD para experiencias de interacción entre SH y mezcla de HAP. □ fenantreno ($Ao/A=0,0542 \cdot COD+0,9821$; $r^2=0,9586$); Δ antraceno ($Ao/A=0,0586 \cdot COD+0,9522$; $r^2=0,7324$). Los valores de Koc se calculan a partir de las pendientes de las curvas.

Tabla 1. Valores de Koc para la interacción de antraceno con SH, obtenidos a partir de distintos métodos. n/d: no determinado.

ANTRACENO				
Koc (L/kg)	Log Koc	Método de Extracción	Método de Detección	Fuente
4,41.10 ⁴	4,15	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
4,41.10 ⁴	4,15	Diálisis	Radioactividad	Burkhard, 2000
4,41.10 ⁴	4,15	n/d	Radioactividad	Burkhard, 2000
1,82.10 ⁴	4,26	Fase reversa	n/d	Gauthier <i>et. al.</i> , 1986
2,00.10 ⁴	4,30	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
2,09.10 ⁴	4,32	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
2,09.10 ⁴	4,32	n/d	Radioactividad	Burkhard, 2000
2,82.10 ⁴	4,45	Fase reversa	n/d	Gauthier <i>et. al.</i> , 1986
3,98.10 ⁴	4,60	Fase reversa	n/d	Gauthier <i>et. al.</i> , 1986
4,37.10 ⁴	4,64	n/d	Radioactividad	Burkhard, 2000
5,25.10 ⁴	4,72	–	Fluorescencia	Gauthier <i>et. al.</i> , 1986
5,56.10⁴	4,75	Fase reversa	UV visible	Este trabajo
6,17.10 ⁴	4,79	Fase reversa	n/d	Gauthier <i>et. al.</i> , 1986
1,00.10 ⁵	5,00	–	Fluorescencia	Perminova <i>et. al.</i> , 1999
1,82.10 ⁵	5,26	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
6,92.10 ⁵	5,84	Fase reversa	n/d	Burkhard, 2000

Tabla 2. Valores de Koc para la interacción de fenantreno con SH, obtenidos a partir de distintos métodos. n/d: no determinado.

FENANTRENO				
Koc (L/kg)	Log Koc	Método de Extracción	Método de Detección	Fuente
8,32.10 ³	3,92	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
1,00.10 ⁴	4,00	Fase reversa	n/d	Burkhard, 2000
1,20.10 ⁴	4,08	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
1,58.10 ⁴	4,20	Fase reversa	Radioactividad	Burkhard, 2000
2,69.10 ⁴	4,43	n/d	Radioactividad	Burkhard, 2000
3,98.10 ⁴	4,60	n/d	Radioactividad	Burkhard, 2000
4,27.10 ⁴	4,63	Fase reversa	n/d	Burkhard, 2000
5,75.10⁴	4,76	Fase reversa	UV visible	Este trabajo
6,92.10 ⁵	5,84	Fase reversa	n/d	Burkhard, 2000

Agradecimientos

Las autoras agradecen al CONICET y a la UBA el financiamiento del presente trabajo.

Las autoras rinden homenaje a la memoria de Mirta Topalián, querida coautora fallecida mientras se terminaba de redactar el presente trabajo.

Bibliografía

- Lyman WJ (1995) Transport and transformation processes. En: Rand GM Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate, and risk assessment. 2° Ed. Taylor and Francis. Washington DC. 449-492.
- Perminova IV, Grechishcheva NY, Petrosyan VS (1999) Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. Environ Sci Technol 33: 3781-3787.
- Gauthier TD, Shane EC, Guerin WF, Seltz WR, Grant CL (1986) Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. Environ Sci Technol 20: 1162-1166.
- Laor Y, Farmer WJ, Aochi Y, Strom PF (1998) Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. Wat. Res 32: 1923-1931.
- Laor Y, Rebhun M (1997) Complexation-Flocculation: A new method to determine binding coefficients of organic contaminants to dissolved humic substances. Environ Sci Technol 31: 3558-3564.
- Engbretson RR, Amos T, von Wandruszka R (1996) Quantitative approach to humic acid associations. Environ Sci Technol 30: 990-997
- Ching Y-P, Aiken GR, Danielsen KM (1997) Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. Environ Sci Technol 31: 1630-1635.

8. Colombo JC, Landoni P, Bilos C (1999) Sources, distribution and variability of airborne particles and hydrocarbons in La Plata area, Argentina. *Environ Poll* 104: 305-314.
9. Colombo JC, Pelletier E, Brochu C, Khalil M, Catoggio JA (1989) Determination of hydrocarbons sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case Study: Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ Sci Technol* 23: 888-894.
10. Peters CA, Knightes CD, Brown DG (1999) Long-term composition dynamics of PAH-containing NAPLs and implications for risk assessment. *Environ Sci Technol* 33: 4499-4507.
11. Nielsen T, Siigur K, Helweg C, Jorgensen O, Hansen PE, Kirso U (1997) Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic acid as studied by High-Performance Liquid Chromatography. *Environ Sci Technol* 31: 1102-1108.
12. Burkhard LP (2000) Estimating dissolved organic carbon partition coefficients for nonionic organic chemicals. *Environ Sci Technol* 34: 4663-4668.
13. Fukushima M, Oba K, Tanaka S, Nakayasu K, Nakamura H, Hasebe K (1997) Elution of pyrene from activated carbon into an aqueous system containing humic acid. *Environ Sci Technol* 31: 2218-2222.
14. Brown JN, Peaje BM (2003) Determination of colloiddally-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fresh water using C₁₈ solid phase extraction disks. *Analytica Chimica Acta* 486: 159-169.
15. Zar JH (1999) *Biostatistical Análisis*. Chapter 18: Comparing simple linear regresión equations. 4th. Edition. Prentice Hall.