

Foto-Oxidación Avanzada de Estradiol (E2) Utilizando Oxígeno, Foto-Sensibilizadores Naturales  
Derivados de Clorofila y Luz Visible

María Beatriz Camargo Montoya y Angie Juliana Osorio Durán

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Julio Roberto Pinzón Joya

Dr. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2022

## **Dedicatoria**

A Dios por su infinita ayuda a lo largo de mi carrera, la constante sabiduría que me brindó para superar todos los obstáculos que se presentaron en mi camino y su amor en los momentos que sólo veía dificultad.

A mi mamá Socorro Montoya quien es mi más grande amor e inspiración en la vida, la cual me enseñó el significado de las palabras perseverancia, esfuerzo y amor, la cual con mucho sacrificio y entrega a sus hijos logró sacarnos adelante y permitirme ser la mujer que soy y obtener los logros alcanzados hasta el día hoy. La cual me llenó de amor y palabras de aliento en estos años de formación profesional y me inculcó que todo lo que me proponga lo puedo lograr y que todos mis sueños los puedo hacer realidad. Todo es por ti y para ti.

A mi papá Jorge Camargo quien es mi ejemplo y más grande modelo para seguir, la persona que me hace querer ser mejor cada día, mi consejero y apoyo en momentos de duda y dificultad, el hombre que con esfuerzo y perseverancia me dio la posibilidad de ser lo que soy, el cual llena de amor y felicidad mi vida con sus charlas que pueden durar horas, con esa sonrisa amorosa y con sus ojos cristalizados de orgullo cuando escucha algo lindo relacionado a su familia. Todo es por ti y para ti.

A mi hermano Jorge Andrés quien es mi mejor amigo y confidente, el cual me apoya siempre y me tiende la mano cuando más lo necesito, A mis hermanas Nayith y Fanny que siempre estuvieron conmigo dándome ánimos y apoyo cuando las necesité. a mi hermano Faber y a mis hermosos sobrinos.

A mi mejor amiga, compañera y colega Juliana por su amor sincero y amistad pura, por acompañarme en los momentos lindos y difíciles de mi vida durante estos años, por enseñarme el significado de una amistad verdadera y desinteresada, por darme el privilegio de poder escogerla

como una hermana de vida, por ser esa persona incondicional que siempre me animaba cuando perdía la esperanza y quería arrojar la toalla, gracias hermanita por estar conmigo y cumplir todos nuestros sueños juntas, este es solo el comienzo de una vida llena de éxitos.

*María Camargo Montoya.*

Primeramente, agradezco a Dios por iluminar mi camino y acompañar todo mi proceso con su infinito amor, por bendecirme en cada momento y guiarme hasta este momento de mi vida. Por darme la fortaleza para continuar en los momentos de adversidad y llenar mi corazón de amor, resiliencia y paz.

A mi mamá, mi ángel, Josefa, quien me dio la dicha de tenerla como madre. Quien me acompañó, me guió y me sostuvo con el más profundo amor que pueda existir. A ella, quien creyó en mis sueños y me empujó a cumplir cada uno de ellos con sacrificio y dedicación. Gracias a ella soy la mujer que soy hoy día, pues fue mi mayor ejemplo de amor, valentía, generosidad y bondad. Hoy su recuerdo vive en mi corazón con la certeza de que el amor que siempre nos unió permanecerá eternamente. Para ella, toda mi vida, mis logros y mi amor.

A mi papá, Huber, por existir y por ser el pilar que me sostiene, porque es el quien con su inmenso amor y apoyo incondicional me ha acompañado a lo largo de mi vida. A quien amo profundamente y le agradezco por ser mis alas en cada uno de mis sueños, por enseñarme a ser una mujer capaz y a luchar incansablemente por los anhelos más grandes de mi corazón. Todo por y para él.

A mis hermanas, Valeria y Katherine, quienes me han dado su amor y su apoyo toda mi vida, son ellas quienes me inspiran a ser una mejor versión de mí, a seguir luchando a pesar de las adversidades y creer en mi en todo momento. Gracias por ser mis fieles acompañantes de vida, por

cuidarme y sobre todo darme la fortuna de tenerlas como hermanas. A ellas todos triunfos y mi amor.

A mi compañera de tesis y mejor amiga, María, con la que he compartido los mejores momentos y experiencias, quien con su amistad y apoyo ha hecho parte de fundamental de esta hermosa etapa de universidad. Gracias por ser mi confidente, amiga y hermana, por acompañarme todo estos años, por ser mi compañera de aventuras, de sueños y de grandes aprendizajes. Para ella, todo mi amor, amistad y profundo agradecimiento.

*Juliana Osorio Durán.*

## **Agradecimientos**

Al profesor Julio R Pinzón, por ser nuestro guía en este camino y acompañarnos en el desarrollo de este proyecto que nos permitió dar lo mejor de nosotras mismas. Todo nuestro cariño y afecto. Al grupo de investigación GIFTEX por brindarnos las herramientas para hacer posible el desarrollo de este proyecto de investigación y contribuir a nuestro crecimiento académico. A la entidad Banco de la República por financiar este proyecto.

A la Escuela de química y todos los docentes que contribuyeron en nuestra formación personal y profesional, quienes nos inspiraron a ser mejores estudiantes y futuras profesionales. Toda nuestra gratitud.

A nuestras amigas y colegas, Laura, Natalia, Silvia, Astrid, Patea, Mila, Michelle y Juliana; por ser nuestro apoyo en todo momento, por brindarnos su valiosa amistad y acompañarnos en cada etapa de nuestra vida. Por enseñarnos el verdadero significado de la palabra amistad, y por regalarnos los mejores recuerdos y experiencias en nuestros años de universidad. Todo nuestro amor y amistad sincera.

A Fabio Pinto por sus consejos cuando los días se ponían oscuros y no veía ninguna salida, por su amor, su ayuda y su compañía durante estos años. Para el todo mi amor y gratitud (María Camargo)

## Tabla de Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Foto-Oxidación Avanzada de Estradiol (E2) Utilizando Oxígeno, Foto-Sensibilizadores Naturales Derivados de Clorofila y Luz Visible .....	16
1.1. Planteamiento del problema .....	16
1.2. Justificación.....	18
2. Objetivos .....	20
2.1. Objetivo General .....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
3. Marco Referencial .....	20
3.1. Marco Teórico.....	20
3.1.1. Contaminación por Estrógenos .....	20
3.1.2. Estradiol .....	21
3.1.3. Clorofila y derivados.....	22
3.1.4. Fotoquímica y Fotosensibilizadores.....	26
3.1.5. Especies reactivas de oxígeno.....	28
3.1.6. Micro y nano burbujas de aire.....	30
4. Diseño Metodológico .....	31
4.1. Equipos.....	31
4.2. Reactivos y Materiales .....	32
4.3. Extracción de Clorofilas.....	32
4.4. Preparación de metilfeoforbida a .....	34
4.5. Experimento de foto-oxidación.....	35

4.5.1. Preparación de soluciones patrón.....	35
4.5.2. Foto – reactor .....	36
4.5.3. Reacción de foto – oxidación.....	37
5. Resultados y Discusión .....	37
5.2. Caracterización de la metilfeoforbida a .....	37
5.2. Curva de calibración del 17 $\beta$ -estradiol .....	44
5.3. Experimentos de foto-oxidación .....	45
5.3.1. Experimento 1 .....	46
5.3.2. Electroquímica .....	48
5.3.3. Experimento blanco catalizador .....	50
5.3.4. Experimento blanco sin luz .....	52
5.3.5. Experimento blanco sin oxígeno .....	53
5.3.6. Experimento 2 .....	55
5.3.7. Cinética de la foto-reacción.....	56
5.3.8. Productos de la degradación.....	60
6. Conclusiones .....	63
Referencias Bibliográficas .....	65
Apéndices .....	69

## Lista de Tablas

**Pág.**

Tabla 1 Estrógenos como contaminantes encontrados en aguas residuales.....	16
Tabla 2 Condiciones de reacción .....	46
Tabla 3 Puntos de intercepto de la Figura 27 .....	57

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1 Presencia de estrógenos en el mundo .....	21
Figura 2 Estructura del 17 $\beta$ -estradiol E2 .....	22
Figura 3 Estructura de la clorofila a y b .....	23
Figura 4 Síntesis de derivados de clorofila .....	24
Figura 5 Espectro de absorción UV de derivados de clorofila.....	25
Figura 6 Diagrama de Jablonski para un fotosensibilizador .....	27
Figura 7 Fotólisis indirecta en agua promovida por un fotocatalizador.....	29
Figura 8 Cromatografía flash de los derivados de clorofila .....	33
Figura 9 Fracciones recolectadas de cromatografía flash .....	33
Figura 10 Estructura de la metilfeoforbida a.....	34
Figura 11 Planos de autocad del foto-reactor.....	36
Figura 12 Longitudes de onda irradiadas en el foto-reactor.....	37
Figura 13 Extracción de los derivados de clorofila con diclorometano .....	38
Figura 14 Biomasa antes y después de las extracciones con diclorometano .....	39
Figura 15 Capa fina de las fracciones separadas mediante cromatografía flash.....	40
Figura 16 Reacción de transesterificación de la feofitina a .....	40
Figura 17 Perfil cromatográfico de alta eficiencia de la metilfeoforbida a obtenida.....	41
Figura 18 Espectro de masas MALDI de la metilfeoforbida a obtenida.....	42
Figura 19 Espectro UV-VIS de la metilfeoforbida a obtenida.....	43
Figura 20 Espectro RMN1H de la metilfeoforbida a.....	43
Figura 21 Curva de calibración del 17 $\beta$ -estradiol .....	45

Figura 22 Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660 nm y 300 ppm del foto- catalizador .....	46
Figura 23 Voltamogramas cíclicos del 17 $\beta$ -estradiol y de la metilfeoforbida a .....	49
Figura 24 Cromatogramas experimento 1 blanco sin foto-catalizador .....	50
Figura 25 Cromatogramas experimento 1 blanco sin luz.....	52
Figura 26 Cromatogramas experimento 1 blanco sin oxígeno.....	53
Figura 27 Cromatogramas experimento 2.....	55
Figura 28 Cinética experimento 1 .....	57
Figura 29 Cinética experimento 2 .....	58
Figura 30 Cinética experimento 2 .....	59
Figura 31 Espectro de masas ESI obtenido después de la degradación del 17 $\beta$ - estradiol .....	61
Figura 32 Posible mecanismo de degradación del 17 $\beta$ -estradiol .....	61

## Lista de Apéndices

	<b>pág.</b>
Apéndice A Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 50ppm del foto- catalizador .....	69
Apéndice B Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 100ppm del foto- catalizador .....	70
Apéndice C Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 200ppm del foto- catalizador .....	71
Apéndice D Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 300ppm del foto- catalizador .....	72
Apéndice E Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 700ppm del foto- catalizador .....	73
Apéndice F Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 50ppm del foto- catalizador .....	74
Apéndice G Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 100ppm del foto- catalizador .....	75
Apéndice H Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 200ppm del foto- catalizador .....	76
Apéndice I Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 300ppm del foto- catalizador .....	77
Apéndice J Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 700ppm del foto- catalizador .....	78
Apéndice K Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm blanco sin foto- catalizador	79

## Resumen

**Título: Foto-Oxidación Avanzada de Estradiol (E2) Utilizando Oxígeno, Foto-Sensibilizadores Naturales Derivados de Clorofila y Luz Visible\***

**Autor: María Beatriz Camargo Montoya, Angie Juliana Osorio Durán\*\***

**Palabras Clave: Foto-oxidación, Estradiol, Fotosensibilizadores, Clorofila, Especies reactivas de oxígeno**

**Descripción:** Los estrógenos son hormonas sexuales femeninas que actúan como los disruptores endocrinos (CDE) más potentes conocidos, estos tienen la capacidad de alterar el funcionamiento de plantas, animales y seres humanos lo que afecta gravemente la salud y el medio ambiente. Estos compuestos llegan a las aguas residuales producto de la excreción de los seres humanos u otros animales, principalmente pollos y cerdos. Este trabajo propone la eliminación del  $17\beta$ -estradiol (E2) mediante un proceso de foto-oxidación avanzada en presencia de foto-sensibilizadores derivados de clorofila a, luz visible y burbujas de aire. Se realizó la extracción de clorofila a desde material vegetal para síntesis de la metilfeoforbida-a, la cual se utilizó como fotosensibilizador natural capaz de absorber luz visible. Luego, se realizaron reacciones de fotooxidación para estudiar la degradación del  $17\beta$ -estradiol a dos longitudes de onda (410nm y 660nm). Se logró evidenciar que ocurre una reacción de foto-oxidación del  $17\beta$  estradiol, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de causar la degradación del E2. Finalmente, se identificó un producto de foto-oxidación del estradiol y se planteó una posible ruta de degradación basados en investigaciones anteriores.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Julio Roberto Pinzón Joya. PhD en Química.

## Abstract

**Title: Advanced Photo-Oxidation of Estradiol (E2) Using Oxygen, Natural Photo-Sensitizers Derived from Chlorophyll and Visible Light\***

**Author(s): María Beatriz Camargo Montoya, Angie Juliana Osorio Durán<sup>1</sup>**

**Key Words: Photo-oxidation, Estradiol, Photosensitizers, Chlorophyll, Reactive oxygen species**

**Description:** Estrogens are female sex hormones that act as the most powerful endocrine disruptors (EDCs) known, they can alter the functioning of plants, animals, and human beings, affecting human health and the environment. These compounds reach the wastewater as a result of the excretion of humans and other animals, mainly chickens and pigs. This work proposes the elimination of 17 $\beta$ -estradiol (E2) using an advanced photo-oxidation process in the presence of photo-sensitizers derived from chlorophyll a, visible light, and air bubbles. Chlorophyll was extracted from plant material for the synthesis of methylpheophorbide-a, which was obtained as a natural photosensitizer capable of absorbing visible light. Then, photooxidation reactions were carried out to study the degradation of 17 $\beta$ -estradiol at two wavelengths (410nm and 660nm). It was evident that a photo-oxidation reaction of 17 $\beta$  estradiol occurs, through the generation of reactive oxygen species capable of causing the degradation of E2. Finally, an estradiol's photo-oxidation product was identified and a possible degradation route was proposed based on previous research.

---

\* Bachelor Thesis

\*\*Science Faculty. School of Chemistry. Director: Julio Roberto Pinzón Joya. Ph.D. in Chemistry

## Introducción

El agua es uno de los recursos más importantes que existen para la supervivencia del planeta, esta afecta cada aspecto de la vida siendo una necesidad básica para todos. Por esto, es de vital importancia su conservación y buena calidad. Las aguas residuales son los desechos y heces provenientes de hogares, hospitales, industria y las ciudades en general. Hoy en día existen diversas problemáticas en el tratamiento y disposición que se realizan en los efluentes residuales, debido a que las metodologías que se aplican en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARs) no eliminan algunas sustancias contaminantes que están presentes en esta, causando así la contaminación de ríos y fuentes hídricas los cuales son el depositario final de estas aguas, trayendo con esto la disminución en la calidad del agua y desencadenando una serie de afectaciones en los humanos, animales y el ecosistema.

Compuestos del tipo fármacos, hormonas, detergentes, pesticidas y productos para el control natal (anticonceptivos) reciben el nombre de Compuestos Disruptores Endocrinos (CDE), La complejidad química de este tipo de compuestos y las bajas concentraciones a la que se encuentran han dificultado su estudio por las técnicas analíticas existentes. Los estrógenos son hormonas sexuales de tipo femenino, son producidos de forma natural o sintética, estos entran al agua residual por medio de las excreciones humanas y las aguas resultantes de industrias de producción de pollos y cerdos, convirtiéndose en compuestos disruptores endocrinos (CDE) y siendo clasificados como uno de los más potentes que existen; los cuales tienen la capacidad de alterar el funcionamiento normal del sistema endocrino causando efectos negativos en la salud de los seres humanos, el medio ambiente y animales. El problema reside en que los estrógenos atraviesan las tecnologías convencionales de las plantas de tratamiento de aguas residuales en Colombia (lodos activados,

reactores UASB y las lagunas facultativas), sin ser degradados o eliminados en su totalidad por lo cual entran directamente a los ríos y fuentes hídricas.

El reto al que nos enfrentamos es buscar una nueva metodología en el tratamiento de las aguas residuales, la cual permita la degradación de este tipo de contaminantes de una manera efectiva y sin contaminar el medio ambiente, es por esto que nuestro proyecto de investigación sugiere la eliminación de estos contaminantes mediante un proceso verde de foto-oxidación haciendo uso de foto-sensibilizadores derivados de la clorofila, el cual es un compuesto natural que no tiene efectos negativos; oxígeno disuelto y luz visible. Con la implementación de este proceso se garantizará una obtención de agua sin carga estrogénica lo que contribuye a la conservación del medio ambiente, a la prevención de enfermedades y otros problemas asociados a la salud en animales y humanos.

# 1. Foto-Oxidación Avanzada de Estradiol (E2) Utilizando Oxígeno, Foto-Sensibilizadores Naturales Derivados de Clorofila y Luz Visible

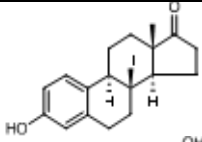
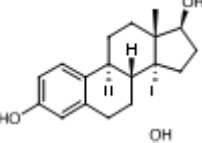
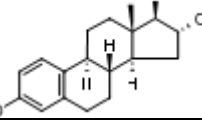
## 1.1. Planteamiento del problema

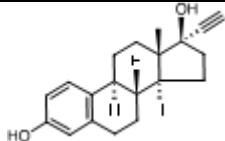
Los compuestos disruptores endocrinos (CDE) son contaminantes que alteran el funcionamiento normal del sistema endocrino (Baycan & Li-Puma, 2018). Muchas sustancias pueden actuar como CDE, por ejemplo, hormonas naturales y sintéticas, productos farmacéuticos, pesticidas, detergentes y plastificantes, entre otros (Cunha et al., 2020).

. Los efectos atribuidos a los CDE incluyen cáncer testicular, de mama y de próstata, disminución de la producción de esperma, feminización, alteración del sistema inmunológico y disminución de la fertilidad en peces, aves y mamíferos (Mol et al., 2000). Los estrógenos son hormonas naturales o sintéticas que actúan como una de las sustancias químicas de alteración endocrina (CDE) más potentes. Debido al uso indiscriminado de estas sustancias, estrógenos como la estrona E1, 17β-estradiol E2, estriol E3 y 17α-etinilestradiol EE2 representan una seria amenaza para los seres humanos.

**Tabla 1**

Estrógenos como contaminantes encontrados en aguas residuales

Nombre	Estructura Química	Fórmula Molecular	CAS	Fuente
Estrona (E1)		$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7	Natural
17β-estradiol (E2)		$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2	Natural
Estriol (E3)		$C_{18}H_{22}O_3$	50-27-1	Natural

17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2)		C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	57-63-6	Sintético
------------------------------------	---	--	---------	-----------

En Floridablanca (Santander), la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR de Río Frío) tiene un sistema de tratamiento anaerobio convencional con 5 reactores anaeróbicos de flujo ascendente (UASB), 2 lagunas facultativas y un sistema de lodo activado, el cual previene la degradación natural por foto-oxidación de los estrógenos. Por su parte en Bucaramanga existe un sistema de tratamiento no convencional, que consiste completamente en sistemas de drenaje, que son tributarios del Río de Oro", ya que después del tratamiento del agua, los desechos se dirigen a los ríos, principalmente al Río de Oro". Floridablanca trata el 100 % de sus flujos residuales al igual que Piedecuesta, Bucaramanga alrededor del 11 % y Girón no tiene un sistema de tratamiento de agua. El promedio del tratamiento de aguas residuales para los cuatro municipios es de aproximadamente el 53 %, lo que significa que el 47 % de las aguas residuales se dirige directamente a los ríos sin ningún tipo de tratamiento (Empas S.A ESP, 2009). Esto causa una contaminación irreversible de los ecosistemas acuáticos y las comunidades cercanas, lo que afecta directamente la salud de las personas aguas abajo. Diferentes estudios muestran que las personas que viven en áreas cercanas a las plantas de tratamiento tienen síntomas significativos, como dolores de cabeza, dolor gastrointestinal, y cansancio inusual, así como la posibilidad de adquirir enfermedades respiratorias y de la piel (Vantarakis et al., 2016).

En el grupo de contaminantes emergentes presentes en las aguas residuales, los CDE han despertado un creciente interés de investigación, dado a las consecuencias que estos producen en los seres vivos y el ecosistema. No obstante, en el contexto colombiano no existe normatividad para su control o regulación en el ciclo de las aguas residuales, es decir, que se encuentran presentes en las fuentes hídricas sin ningún tipo de degradación. En la actualidad, los tratamientos biológicos

convencionales de agua residuales que se realizan tienen serias limitaciones para lograr su degradación o eliminación completa y segura. Una situación similar ocurre en gran parte del país por lo que esta propuesta no sólo tiene relevancia regional, sino nacional e incluso mundial.

## **1.2. Justificación**

Los estrógenos naturales y sintéticos son los disruptores endocrinos más potentes que se encuentran en el agua residual y producen efectos biológicos similares a los inducidos por las hormonas naturales. Estos compuestos son responsables de las alteraciones endocrinas en varios organismos vivos, incluidos peces, aves, reptiles y mamíferos. Las alteraciones endocrinas producen trastornos reproductivos, hermafroditismo, feminización, masculinización, etc. Pueden conducir a trastornos fisiológicos, trastornos del sistema nervioso y funcionamiento inadecuado del sistema inmunológico incluso a concentraciones extremadamente bajas.

Actualmente, los procesos de oxidación avanzada (POA), como foto-oxidación, electroquímica, radiación UV y ozonólisis, son algunas de las estrategias más exitosas para eliminar los CDE. Todos estos procesos aprovechan la alta reactividad de los radicales hidroxilo para oxidar progresivamente compuestos orgánicos a productos no dañinos (Kanakaraju et al., 2018). Uno de los métodos más populares utilizados en la eliminación de CDE es el uso de un foto-catalizador que absorbe luz solar como tratamiento terciario para eliminar los contaminantes emergentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales. En este método se usa  $\text{TiO}_2$  como foto-catalizador que produce una eliminación significativa de todos los contaminantes emergentes ya que la mayoría de ellos apenas se detectan después del tratamiento (Pérez-Larios & Gómez, 2013). Este método tiene una desventaja ya que el  $\text{TiO}_2$  no absorbe a longitudes de onda por encima de 390 nm, por lo tanto, la mayor parte de la energía solar no se absorbe. Un tratamiento similar para eliminar productos farmacéuticos, antibióticos y estrógenos utiliza  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{TiO}_2$  y  $\text{O}_3$  que elimina los contaminantes con alta eficiencia (Carbajal-Morán et al., 2021). También existe una preocupación creciente por la

presencia de compuestos que transmiten mal sabor y olor al agua potable. Los procesos avanzados de oxidación, incluida la ozonización,  $H_2O_2$ , combinación de irradiación y semiconductores, electrólisis y ultrasonido, entre otros, se han utilizado con éxito para la eliminación de este tipo de contaminantes en diversas matrices acuosas (agua residual, potable y subterránea) (Antonopoulou et al., 2014). Estos antecedentes muestran el potencial del uso de la energía solar en combinación con un foto-catalizador para la eliminación de contaminantes del agua. Además de estas técnicas se ha implementado el uso de membranas, biorreactores y filtros para extraer este tipo de contaminantes de las aguas (Baltazar et al., 2013). Estos antecedentes muestran el potencial del uso de la energía solar en combinación con un foto-catalizador para la eliminación de contaminantes del agua.

Este trabajo propone la eliminación del contaminante  $17\beta$ -estradiol E2 en muestras de matrices acuosas, mediante un proceso de foto-oxidación avanzada en presencia de fotosensibilizadores derivados de clorofila a, nano-burbujas de aire y luz visible. En la primera etapa se realizará la extracción de clorofila a desde material vegetal (plantas o microalgas) para usarla como material de partida en la síntesis de metilfeoforbida a. Este compuesto será utilizado como fotosensibilizador capaz de absorber luz visible. En la última etapa se estudiará la foto-oxidación del estradiol (E2) en presencia de los complejos preparados, burbujas de aire y luz visible. Con la implementación de esta propuesta como sistema de tratamiento terciario de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se espera obtener agua con menor carga estrogénica, lo que contribuye a la conservación del medio ambiente y a la prevención de enfermedades y otros problemas asociados al consumo de estrógenos en animales y humanos. Todo esto gracias al uso de materias primas renovables no contaminantes, siguiendo los principios de la química verde.

La metodología en la investigación incluye 6 de los 12 principios de la química verde. La síntesis del fotocatalizador utiliza clorofila el cual actuará como un fotocatalizador eficiente y natural que no representa un peligro de contaminación o toxicidad para la vida humana y el

ecosistema. Además, este proyecto utiliza materias primas completamente renovables: aire y el fotocatalizador para la eliminación de estrógenos. Todos los componentes que se utilizarán son biodegradables y se pueden obtener de los recursos naturales existentes. Esto no solo es amigable con el medio ambiente, sino que también reduce significativamente los riesgos de operación, accidentes químicos y consecuencias en los ecosistemas y la humanidad.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo General**

Estudiar la foto-oxidación de estradiol (E2) en presencia de foto-sensibilizadores derivados de clorofila y burbujas de aire.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Obtener el extracto de clorofilas y sus productos de degradación desde material vegetal.

Sintetizar metilfeoforbida a utilizando como material de partida la clorofila.

Estudiar la foto-oxidación del estradiol (E2) en presencia de los complejos preparados, burbujas de aire y luz visible.

## **3. Marco Referencial**

### **3.1. Marco Teórico**

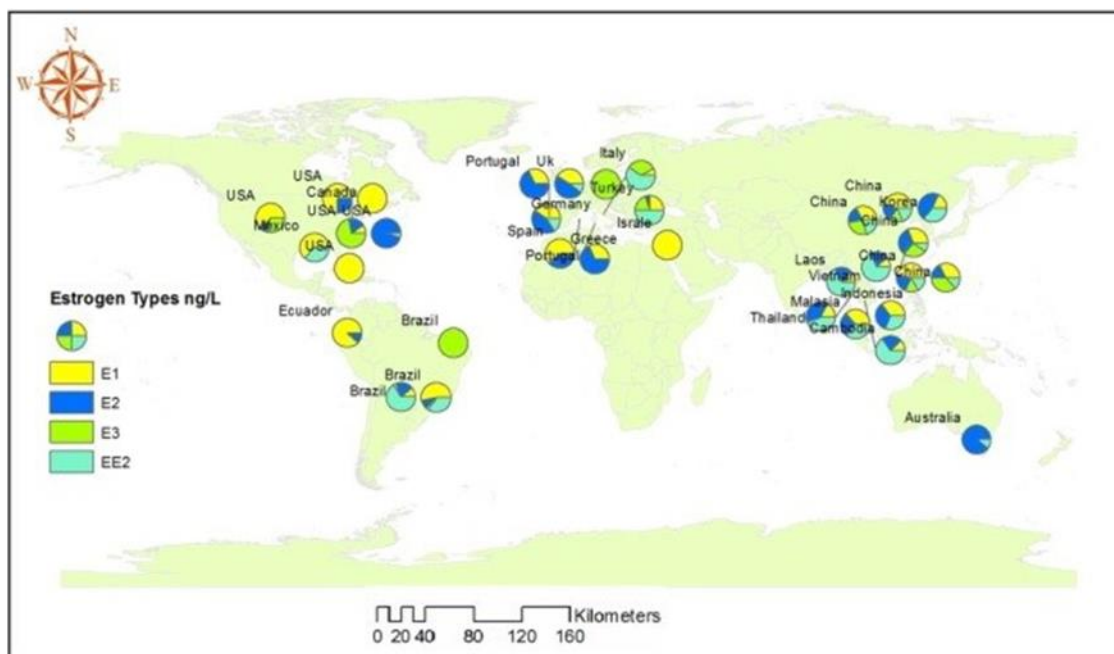
#### ***3.1.1. Contaminación por Estrógenos***

Debido a los altos niveles de concentración en el suelo y el agua, están surgiendo estrógenos como la estrona E1, 17 $\beta$ -estradiol E2, estriol E3 y 17 $\alpha$ -etinilestradiol EE2 como contaminantes que

representan una seria amenaza para los seres humanos<sup>4</sup> y efectos perjudiciales en los ecosistemas. La población humana de aproximadamente 7 mil millones descarga 30 000 kg/año de estrógeno natural (E1, E2 y E3) y 700 kg/año de estrógeno sintético (EE2) por uso de píldoras anticonceptivas. Esto se ha confirmado con recientes detecciones de estrógenos esteroideos en aguas subterráneas que se utilizan parcialmente para el suministro público de agua. Existen preocupaciones similares sobre los niveles de estrógenos en las aguas naturales y su efecto en la fisiología de los peces y otras especies de vida silvestre acuática (Adeel et al., 2017).

### Figura 1

Presencia de estrógenos en el mundo (Adeel et al., 2017)



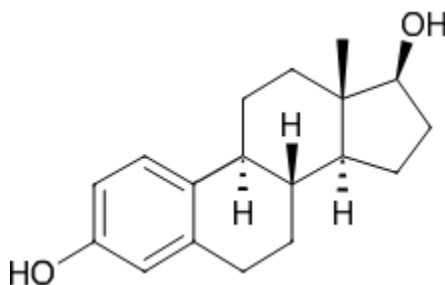
#### 3.1.2. Estradiol

17 $\beta$ -estradiol E2 es la hormona sexual reproductiva más importante, siendo el estrógeno más potente que existe. Este es producido de forma natural en los ovarios de las mamíferos y en una menor cantidad por otras glándulas del cuerpo, lo que significa que esta hormona también está presente en los machos mamíferos. Su estructura está constituida por 18 átomos de carbono,

organizados en cuatro anillos fusionados que forman el esqueleto (Figura 2). El anillo de benceno se designa como anillo A, dos anillos de seis miembros B y C y un anillo de ciclopentano que se designa como el anillo D. El estradiol contiene dos grupos hidroxilo, uno en el C3 del anillo A y otro en el C17 $\beta$ , por lo que en principio lo hace sensible a reacciones de oxidación (Zagalo et al., 2020).

## Figura 2

Estructura del 17 $\beta$ -estradiol E2



El estradiol es clasificado como uno de los compuestos disruptores endocrinos más potentes que existen, siendo perjudiciales incluso a concentraciones de ng/L. Este contaminante causa diversos efectos negativos en el sistema endocrino de animales y humanos. También poseen la capacidad de alterar negativamente el ecosistema debido a que los tratamientos utilizados en la mayoría de PTARs no remueven este tipo de contaminantes. Se ha observado que el estradiol es uno de los contaminantes con mayor actividad estrogénica en las aguas residuales (Zagalo et al., 2020). Asimismo, investigadores han realizado medidas en las cuales han encontrado este tipo de moléculas en aguas superficiales y subterráneas, las cuales son usadas para el suministro y consumo de agua de las personas (Adeel et al., 2017).

### 3.1.3 Clorofila y derivados

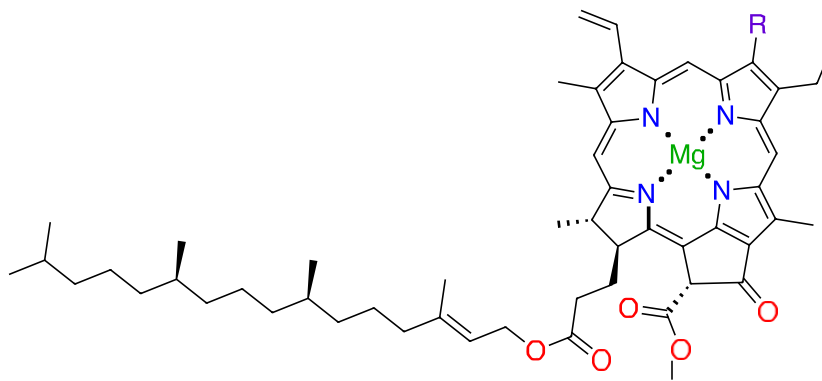
En la fotosíntesis natural, la clorofila, desempeña un papel fundamental como fotopigmento esencial para la absorción de energía de la luz visible en el rango de luces rojas y azules,

conservándola como Trifosfato de adenosina (ATP) y Nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH). Otros pigmentos involucrados absorben luz en otros rangos y conducen la energía al centro de reacción clorofila mediante transferencia de resonancia Förster, a través de anillos y dobles enlaces en la estructura del pigmento.

La estructura de la clorofila se compone de cuatro anillos de pirrólicos unidos entre sí por grupos atómicos intermedios. Cada anillo lleva cadenas laterales. Un átomo de magnesio se encuentra en el centro de la estructura. Entre las cadenas laterales, la más predominante es el fitol. Constituye aproximadamente un tercio de la molécula de clorofila. Tiene una fuerte afinidad por el oxígeno y puede ser responsable de reducir la acción de la clorofila.

### Figura 3

Estructura de la clorofila a y b

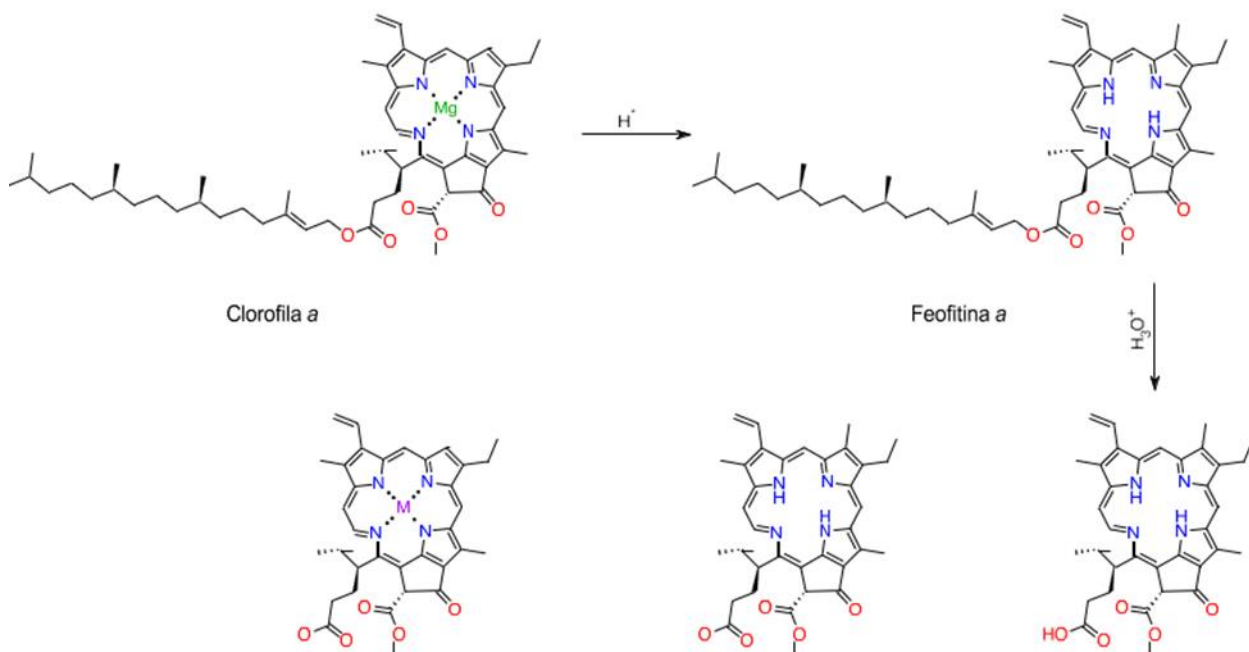


La energía solar es una de las mayores fuentes de energía limpia y sostenible que juega un papel importante en la solución de problemas ambientales. Entre todos los fotocatalizadores más usados en la actualidad, el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es un candidato prometedor en cuanto a su propiedad superior de transporte de carga, no toxicidad y estabilidad química. Sin embargo, el desafío en el uso de  $\text{TiO}_2$  es que se activa principalmente dentro de la región de luz UV debido a su gran brecha de banda, lo que lleva a una utilización significativamente baja de energía solar. Por lo

tanto, el uso de derivados de clorofila ha encontrado una amplia aplicación como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica. Este tipo de compuestos absorbe la luz visible produciendo un estado excitado singulete que sufre un cruce entre sistemas que produce un estado triplete del fotosensibilizador. Este estado triplete reacciona con oxígeno molecular produciendo la especie de oxígeno reactivo. Esta especie no solo puede matar bacterias dañinas y células cancerosas, sino que también puede reaccionar con moléculas orgánicas que producen productos de oxidación.

#### Figura 4

Síntesis de derivados de clorofila

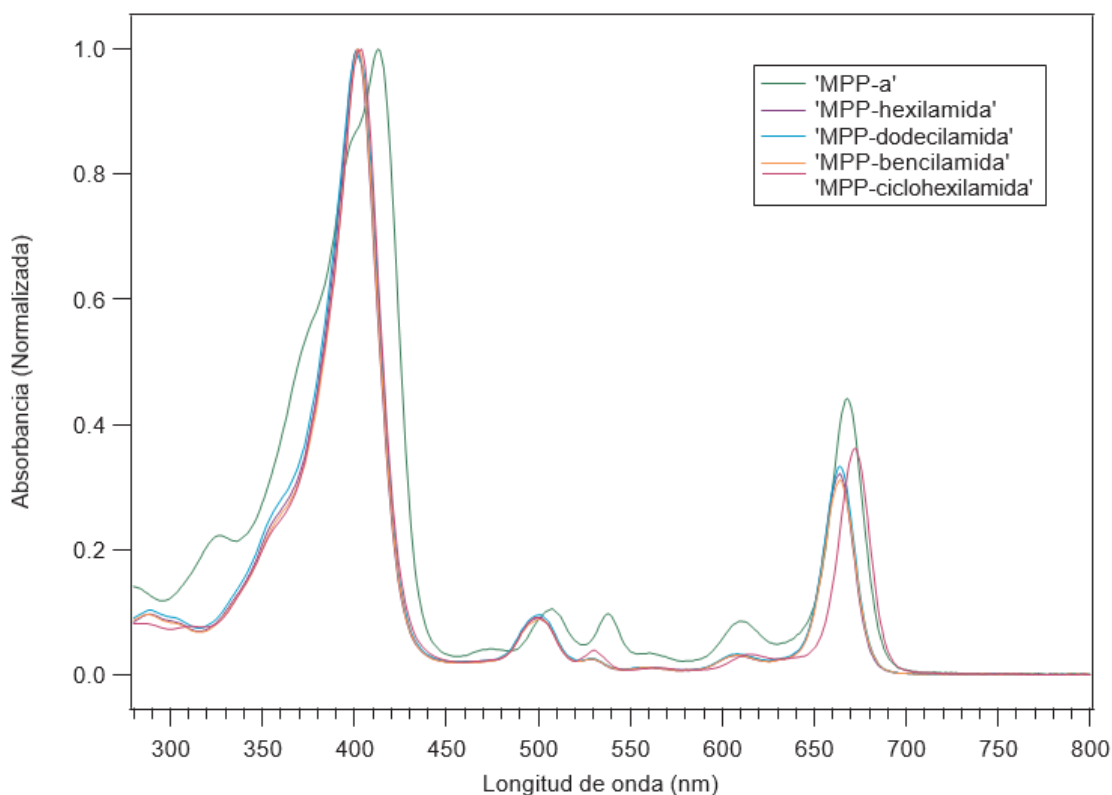


Los principales derivados de la clorofila se muestran en la Figura 4. En condiciones ácidas, la clorofila *a* produce la feofitina a causada por la pérdida del ion  $Mg^{2+}$ . Este compuesto mediante la hidrólisis pierde la cadena fitol y se convierte en feoforbida *a*, que a su vez por la transesterificación se produce la metilfeoforbida *a*. El sistema aromático extendido, permite coordinar cualquier metal con sus átomos de nitrógeno centrales, obteniéndose diversos complejos de coordinación. Estos compuestos son más estables que la clorofila y por tanto son precursores ideales para la síntesis de diversos derivados, los cuales han sido probados en terapia foto-dinámica para tratar enfermedades y como descontaminantes del agua.

Una gran ventaja de usar derivados de clorofila es que tienen coeficientes de extinción muy altos (alrededor de  $110\,000\text{ cm}^{-1}/\text{molar}$  a 420 nm) en el espectro visible de 400 a 500 nm (Banda de Soret) y de 600 a 700 nm (banda Q). Por lo tanto, pueden absorber efectivamente la luz solar (Figura 5). En comparación con otros fotocatalizadores como  $TiO_2$  que requieren fotones con energía superior a 3,2 eV (longitudes de onda inferiores a 390 nm) (Kuznetsov & Serpone, 2006) los foto- sensibilizadores de clorofila tienen la ventaja de poder excitarse con luz visible. Además de eso, no habrá preocupación por la persistencia del catalizador porque sufrirá photobleaching y no dejará residuos dañinos en el agua tratada (Campanholi et al., 2020).

### **Figura 5**

Espectro de absorción UV de derivados de clorofila



### 3.1.4. Fotoquímica y Fotosensibilizadores

La fotoquímica es la interacción entre átomos y moléculas con la radiación electromagnética que permite la inducción de transformaciones químicas. Las transformaciones químicas y los cambios en la reactividad forman la base de los tratamientos de terapia fotodinámica en medicina y en fotocatalisis, por lo tanto, explorar nuevos procesos fotoquímicos en sistemas moleculares orgánicos e inorgánicos abre oportunidades en medicina, materiales y reactividad química. El proceso por el cual ocurre un cambio fotofísico o fotoquímico en una molécula como resultado de la absorción de luz por otra se conoce como fotosensibilización. La molécula que inicialmente absorbe la luz para provocar el cambio se llama fotosensibilizador.

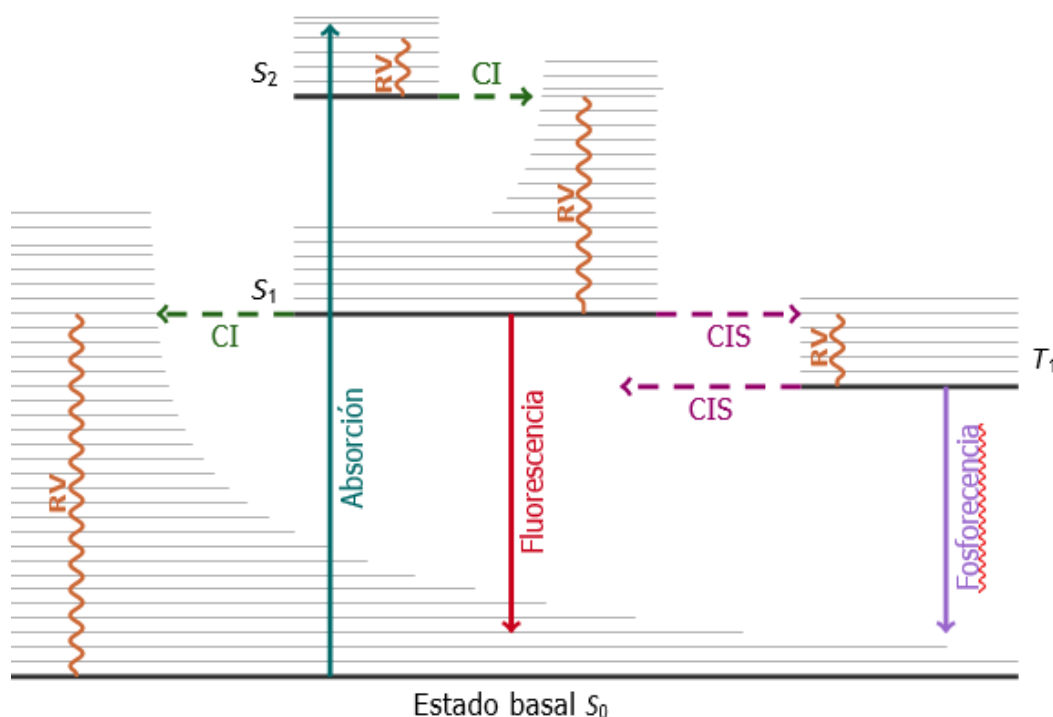
En la Figura 6 se muestra el diagrama de Jablonski de un fotosensibilizador en el cual se explica los estados excitados y los procesos de relajación del sensibilizador al absorber luz visible.

Cuando la molécula de fotosensibilizador absorbe energía se excita a el estado singulete ( $1\text{PhSensibilizador}^*$ ), en este estado la molécula es muy inestable por lo tanto trata de regresar a su estado basal mediante diferentes procesos de relajación. Una de estas rutas es una relajación vibracional, la cual implica la transición de un nivel vibracional mayor que 0 ( $v > 0$ ) a el nivel vibracional  $v=0$ , esto dentro de el mismo estado electrónico excitado (Aly et al., 2010). Otro método de relajación no radiativa es una conversión interna en donde se lleva a cabo una transición interna entre estados excitados de misma energía total y multiplicidad de espín.

Una tercera forma de relajación es un cruce intersistema en el cual ocurre una transición entre estados excitados con diferente multiplicidad de espín, en el caso del fotosensibilizador esta transición se da del estado excitado singulete ( $1\text{PhSensibilizador}^*$ ) al estado excitado triplete ( $3\text{PhSensibilizador}^*$ ). Finalmente, los electrones también pueden relajarse radiativamente mediante procesos de fluorescencia y fosforescencia, los cuales involucran emisión de fotones (Aly et al., 2010).

### **Figura 6**

Diagrama de Jablonski para un fotosensibilizador



### 3.1.5. Especies reactivas de oxígeno

Mientras que la mayoría de las especies moleculares en estado fundamental encontradas son estados singulete, la molécula de oxígeno en estado fundamental es un triplete. El estado excitado más bajo de  $O_2$  es un estado singulete de baja energía, que no puede obtenerse por irradiación directa del estado fundamental del triplete porque es un proceso prohibido por rotación. Sin embargo, se puede utilizar un proceso de fotosensibilización, aunque está en la dirección inversa de lo que generalmente se ve en las reacciones sensibilizadas, que implica la sensibilización de triple estado fundamental a estado singulete excitado. Cualquier molécula con una energía de triplete excitado mayor que la energía del estado excitado más bajo del  $O_2$ , es capaz de provocar la reacción de sensibilización, pero se prefieren las moléculas con bajas energías de estado de triplete excitado ya que evitan la posibilidad de reacciones secundarias no deseadas. Las

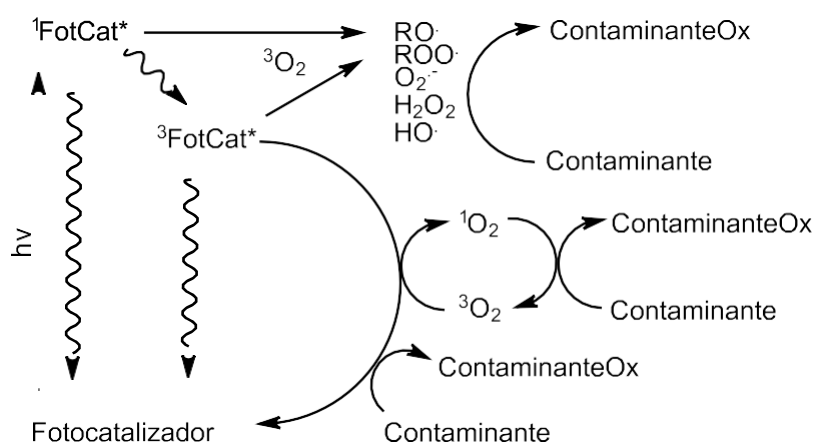
moléculas que absorben en la región visible pueden actuar como sensibilizadores eficaces del oxígeno singlete (Aly et al., 2010).

El diagrama molecular de una molécula de dióxigeno ( $O_2$ ) muestra que el estado  $2\pi^*$  es doble degenerado en el cual se encuentran situados dos electrones. El estado basal es un oxígeno triplete, en este estado el oxígeno no es reactivo; los otros dos son estados de oxígeno singlete, los cuales son una especie altamente reactiva, las cuales poseen la capacidad de degradar contaminantes.

Los fotocatalizadores al entrar en contacto con la luz visible tienen la capacidad de absorber esta energía y excitarse a estados ( $^3\text{PhCat}^*$  y  $^1\text{PhCat}^*$ ) (Figura 7), los cuales pueden conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como radicales libres, oxígeno singlete y especies de oxígeno parcialmente reducidos a través de reacciones tipo I y tipo II, las cuales pueden reaccionar con los contaminantes orgánicos promoviendo así su degradación.

### Figura 7

Fotólisis indirecta en agua promovida por un fotocatalizador



Las reacciones tipo I permite la generación de ERO mediante la transferencia de electrones desde el estado excitado del fotosensibilizador con los alrededores de este mismo, esta reacción

crea aniones radicales y radicales libres. Las reacciones tipo II, crea las ERO por la transferencia de energía a el oxígeno molecular para generar oxígeno singlete altamente reactivo el cual tiene la capacidad de oxidar la mayoría de los contaminantes orgánicos. Considerando que se inyectará oxígeno molecular en los medios acuosos; el aceptor más importante será el oxígeno molecular en su estado fundamental ( $^3O_2$ ), que probablemente será el oxidante principal. Finalmente, algunos de los (3PhCat\*) pueden reaccionar directamente con contaminantes más fácilmente oxidables.

### ***3.1.6. Micro y nano burbujas de aire***

Las burbujas de aire de bajo diámetro fueron ascendiendo en popularidad debido a sus propiedades físicas. Por ejemplo, permanecen en el agua durante un largo tiempo debido a su superficie cargada negativamente, su presión interna es más alta que su entorno, lo que acelera la disolución del gas en el líquido (Ebina et al., 2013). Cuanto menor sea el diámetro de la burbuja mayor será la presión parcial de oxígeno en el agua. Las microburbujas (MB) y nano burbujas (NB) se utilizan en el tratamiento de aguas residuales, tratamiento de agua potable, restauración de sistemas acuáticos, industrias de procesamiento de alimentos, acuicultura, síntesis de productos químicos y productos petroquímicos.

Recientemente, varios estudios revelaron la posibilidad de expansión y aplicación de MB y NB a nivel industrial. Los investigadores sugirieron que las aplicaciones de MB y NB en tecnologías de tratamiento de aguas tienen un gran potencial, ya que se ha encontrado que MB y NB pueden desintoxicar el agua contaminada al catalizar reacciones químicas, mejorando así la eficiencia del proceso de tratamiento. Las NB de aire mejoran la actividad de los microorganismos tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Los procesos que utilizan la tecnología de burbujas en plantas de aguas residuales son la flotación, aireación, desinfección y oxidación avanzada. En la mayoría de las investigaciones, los principales objetivos de la aplicación de las

tecnologías MB y NB son reducir el tamaño de las instalaciones, reducir el tiempo y costos de operación, y el mantenimiento de las plantas de tratamiento de agua, con una mayor eficiencia en la eliminación de contaminantes.

La oxidación de contaminantes usando NB y MB es un método prometedor para el tratamiento de aguas domésticas y aguas residuales, se han aplicado burbujas de aire para el tratamiento del agua debido a su potente capacidad de desinfección en baja concentración y corto tiempo de contacto. Una investigación reciente reveló que la reducción del tamaño de la burbuja también mejoró la oxidación de diferentes contaminantes al aumentar la formación de radicales hidroxilo, ya que reaccionan con compuestos dañinos que conducen a su mineralización (Temesgen et al., 2017).

#### 4. Diseño Metodológico

##### 4.1. Equipos

**UV-Vis:** Espectrofotómetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis de doble haz, lámpara flash de Xenón, detector de fotodiodos duales de silicio, celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

**Cromatografo HPLC (Analítico):** Equipo Agilent serie 1100 con columnas (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 y Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8) 150x4,6 mm, 5,0  $\mu$ m y detector de arreglo de fotodiodos (DAD).

**RMN:** Equipo Bruker Avance 400MHz 1H RMN y como disolvente se empleó cloroformo deuterado CDCl<sub>3</sub> de Merck.

**Masas MALDI:** Espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflexreme (Bruker Daltonics) con láser en estado sólido. Las muestras se realizaron con soluciones de la matriz DCTB en THF.

**Masas ESI:** Espectrómetro de masas Bruker Daltonics (Amazon X) con nebulización por electrospray (ESI) y analizador de trampa iónica (IT). Los espectros de masas se adquirieron mediante inyección directa.

#### **4.2. Reactivos y Materiales**

El estradiol utilizado para la reacción de foto-oxidación fue de la marca Merck. Los solventes diclorometano, n-heptano, acetona, acetonitrilo y metanol utilizados como medio de reacción y en purificaciones cromatográficas de marca J.T. Baker fueron destilados previamente a su uso.

#### **4.3. Extracción de Clorofilas**

Las clorofilas a y b y sus productos de descomposición (feofitinas, feoforbidas y clorofilidas) fueron extraídas de hojas de espinaca. Inicialmente el material vegetal se lavó y sumergió en agua hirviendo por un periodo de 2 minutos para desactivar la enzima clorofilidohidrolasa, luego se deshidrató mediante el equipo deshidratador durante 5 horas a una temperatura de 70°C. Una vez el material vegetal estuvo seco (64,518 g), se procedió a realizar la extracción de los pigmentos, para esto, el material seco se dividió en porciones de 80 g y se introdujeron en botellas usando diclorometano como solvente durante 12 horas. Se filtró el material sólido y se evaporó el solvente en el rotoevaporador obteniendo el crudo, esta operación se realizó 3 veces hasta que el color del extracto disminuyó significativamente.

**Figura 8**

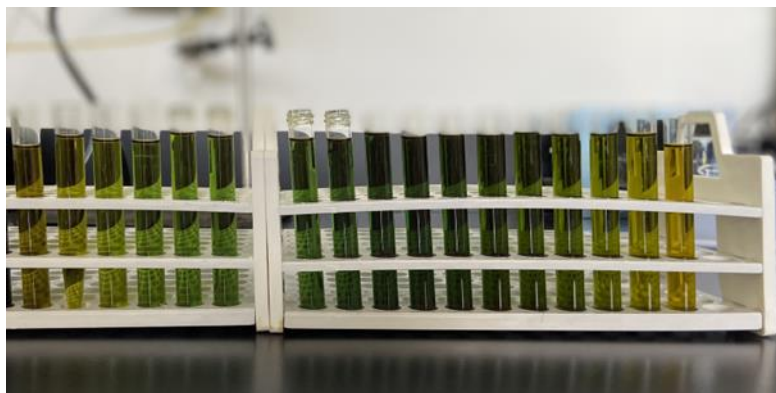
Cromatografía flash de los derivados de clorofila



El crudo final se disolvió en 50 mL de diclorometano y se mezcló con sílice de gravedad hasta formar un sólido compacto, se transfirió en un embudo, donde se eluyó inicialmente con n-heptano para retirar los carotenoides, seguido de diclorometano el cual contenía gotas de ácido acético para convertir las clorofilas en feofitinas. La totalidad de la fracción de color verde se concentró y se evaporó. El sólido crudo con masa 2,136 g se sometió a cromatografía flash en columna seca eluyendo con una mezcla n-heptano/acetona en proporción 2:1 recolectando únicamente la totalidad de la fracción de color verde oscuro perteneciente a las mezclas de feofitinas.

**Figura 9**

Fracciones recolectadas de cromatografía flash

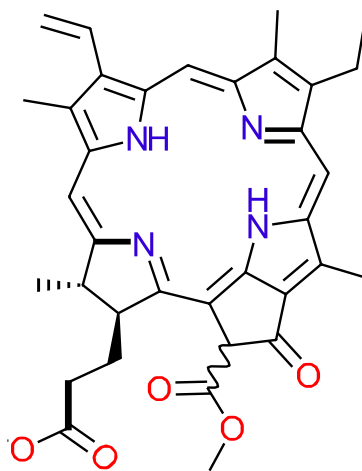


#### 4.4. Preparación de metilfeoforbida *a*

En un balón de Schlenk de 250 mL se disolvió la feofitina obtenida en el paso anterior en 100 mL de MeOH y se agregaron 25 mL de solución al 5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en MeOH. Se selló el balón con un septum y se realizó la reacción en atmósfera de argón; la solución se mantuvo con agitación constante a temperatura ambiente durante un periodo de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se neutralizó el ácido con una solución de de NaHCO<sub>3</sub> al 10 % en agua, luego, se realizó una extracción líquido - líquido agregando 60 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en tres porciones de 20 mL; se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró con papel franja negro y se concentró por rotoevaporación. Se obtuvo un sólido de color verde olivo y luego se purificó la metilfeoforbida *a* como mezcla de epímeros.

#### Figura 10

Estructura de la metilfeoforbida *a*



## 4.5. Experimento de foto-oxidación

### 4.5.1. Preparación de soluciones patrón

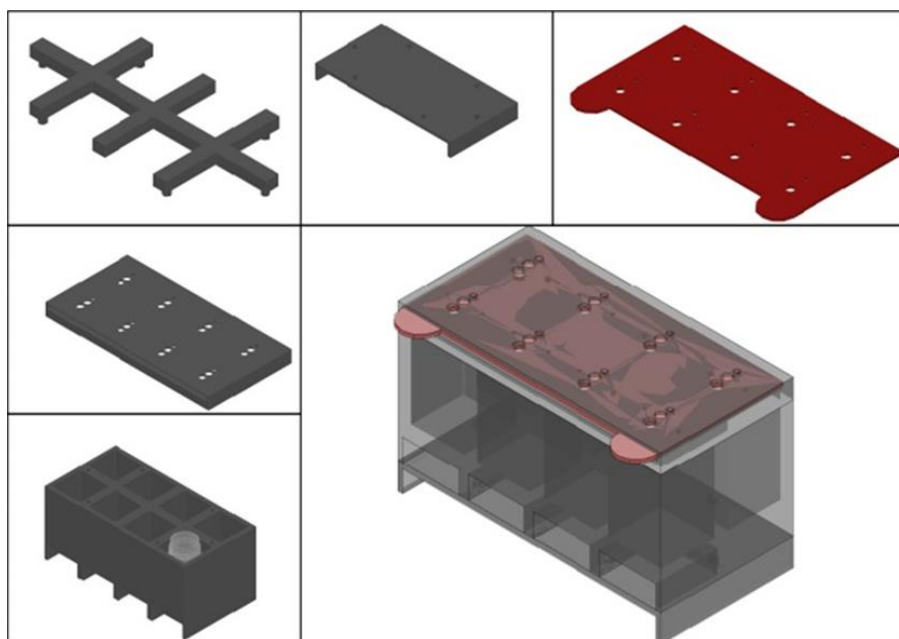
Se preparó una solución de estradiol (E2) en acetonitrilo a una concentración de 50 ppm. Por otro lado, se preparó una solución de 700 ppm del fotocatalizador en acetonitrilo. Se tomaron 5 alícuotas de 5,0 mL de la solución de estradiol, y se les agregó 5,0 mL de solución del catalizador para dar una concentración final de 50,0, 100, 200, 300 y 700 ppm, respectivamente. Se llevaron a 10,0 mL de volumen final utilizando acetonitrilo. Se realizaron 3 blancos; en el primero no se agregó fotocatalizador a la reacción, en el segundo no se burbujeó oxígeno además se mantuvo la reacción bajo atmósfera de argón y en el tercero se impidió la irradiación LED. El blanco del fotocatalizador se preparó utilizando solamente una concentración de 50 ppm de estradiol, sin catalizador; el blanco de oxígeno se preparó utilizando una concentración de 50 ppm estradiol y 30 ppm fotocatalizador. En este blanco no se burbujeó aire. De igual manera, se realizó el blanco de irradiación, este vial fue aislado completamente de la luz LED cubriéndolo con papel aluminio.

#### 4.5.2. Foto – reactor

Se construyó un foto-reactor para el experimento. El cual consistía en una caja impresa en 3D donde se encontraban 8 espacios, uno para cada vial; en la parte superior estaba la tapa con su respectivo arreglo de LEDs que se utilizaron como fuente luminosa para irradiar todas las muestras. Se fabricaron 3 tapas diferentes, una para cada longitud de onda a irradiar 410 nm, 510 nm y 630 nm. La iluminancia se mantuvo constante en 1000 lux ( $\pm 10$ nm). El aire entraba a cada vial mediante una conexión de una bomba de acuario, a una manguera con diámetro 3/16 de pulgada y una aguja sumergida en la solución. En la parte inferior de la caja fueron colocados 8 motores con imanes de neodimio, que realizaban la agitación magnética de cada solución y a la ventilación para evitar el calentamiento de los viales por la irradiación.

**Figura 11**

Planos de autocad del foto-reactor

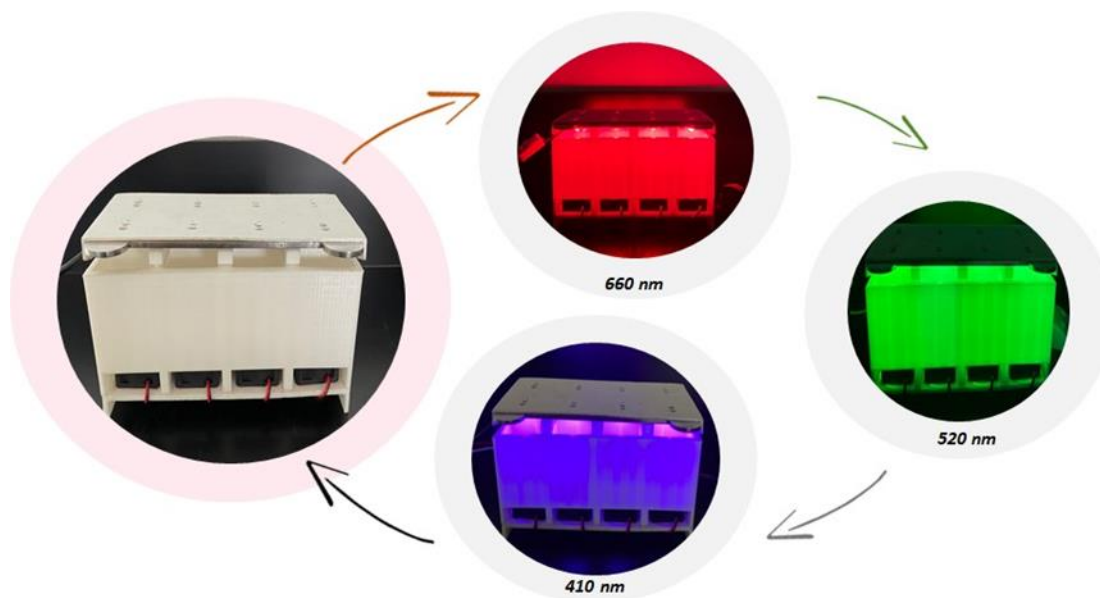


### 4.5.3. Reacción de foto – oxidación

Los viales fueron puestos en el foto-reactor donde se sometieron a los experimentos de foto- oxidación. Estos fueron irradiados a dos longitudes de onda diferentes (410nm y 630nm) con agitación constante y se burbujeó aire a través de cada solución hasta cumplir 4 horas. Las muestras se recolectaron en tiempos de cero ( $t=0$ ),  $t=60$  min,  $t=120$  min,  $t=180$  min y  $t=240$  min. La reacción de fotooxidación se siguió por HPLC donde se analizó el estradiol, el fotocatalizador y los productos de reacción.

### Figura 12

Longitudes de onda irradiadas en el foto-reactor



## 5. Resultados y Discusión

### 5.2. Caracterización de la metilfeoforbida a

En el presente trabajo de grado se realizó la síntesis de derivados de clorofila usando como materia prima las hojas de espinaca, para la posterior foto-oxidación de  $17\beta$ -estradiol en una matriz

de acetonitrilo. La biomasa inicial (hojas de espinaca) se llevó a un equipo de deshidratación durante un periodo de 5 horas a una temperatura de 70°C, posteriormente se realizó la extracción de los derivados de clorofila en botellas de 1 litro utilizando dicloro- metano como solvente (Figura 13), obteniendo 2,136 g de extracto crudo.

### Figura 13

Extracción de los derivados de clorofila con diclorometano



La biomasa final adquirió un color verde claro perdiendo así el color verde oscuro de la espinaca, el cual fue adquirido por el extracto en donde se encuentran la clorofila y diversos derivados de esta (Figura 14). Se realizó cromatografía de gravedad a la muestra final obtenida, eluyendo inicialmente con n-heptano para retirar los carotenoides, en este paso se descartaron fracciones de color amarillo, naranja y rojo. Finalmente, se eluyó con una mezcla de ácido acético en diclorometano (0,1 %) para lograr la degradación de la clorofila, la cual al ser expuesta a condiciones ácidas pierde el ion magnesio del centro del anillo de clorina, los iones hidrógeno

tienen la capacidad de protonar los pares de electrones del nitrógeno de la clorina y así romper el enlace covalente coordinado del metal del anillo. Al final de la cromatografía se obtuvo una fracción verde oscura en la cual se encuentran las feofitinas a y b.

### Figura 14

Biomasa antes y después de las extracciones con diclorometano



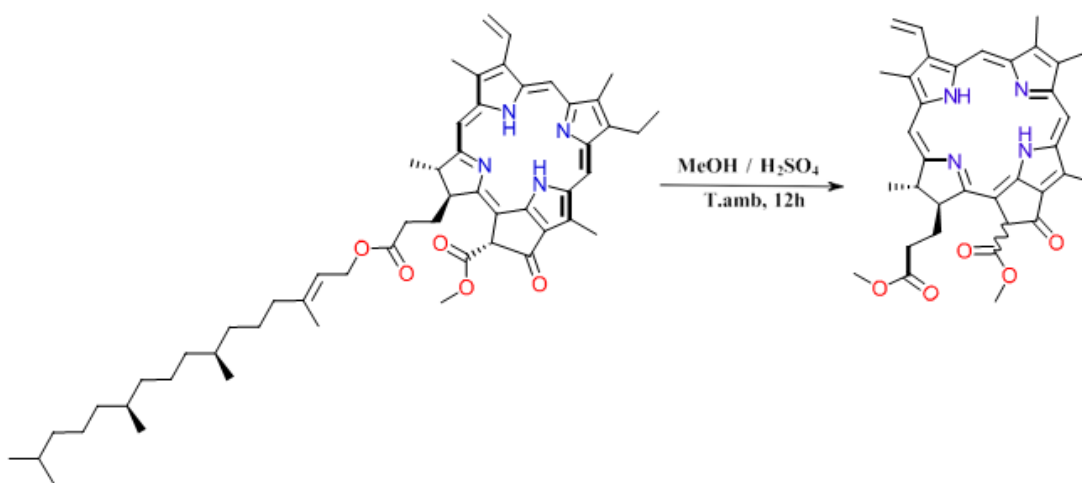
Mediante cromatografía flash se recolectó la fracción color verde oscuro correspondiente a la feofitina a y su correspondiente epímero, a las fracciones recolectadas se le hizo seguimiento mediante cromatografía de capa fina para confirmar la efectiva separación de los compuestos (Figura 15). La feofitina a y su epímero fueron usados como precursores para la preparación de la metilfeoforbida a, para esto se sometió la feofitina a una reacción de transesterificación en metanol catalizada por ácido sulfúrico (Figura 16), esta se realizó bajo atmósfera de argón para evitar la formación de productos no deseados por la interacción con el oxígeno presente en el aire, igualmente, se aislado de la luz y a temperatura ambiente para impedir degradaciones de los productos finales.

**Figura 15**

Capa fina de las fracciones separadas mediante cromatografía flash

**Figura 16**

Reacción de transesterificación de la feofitina a

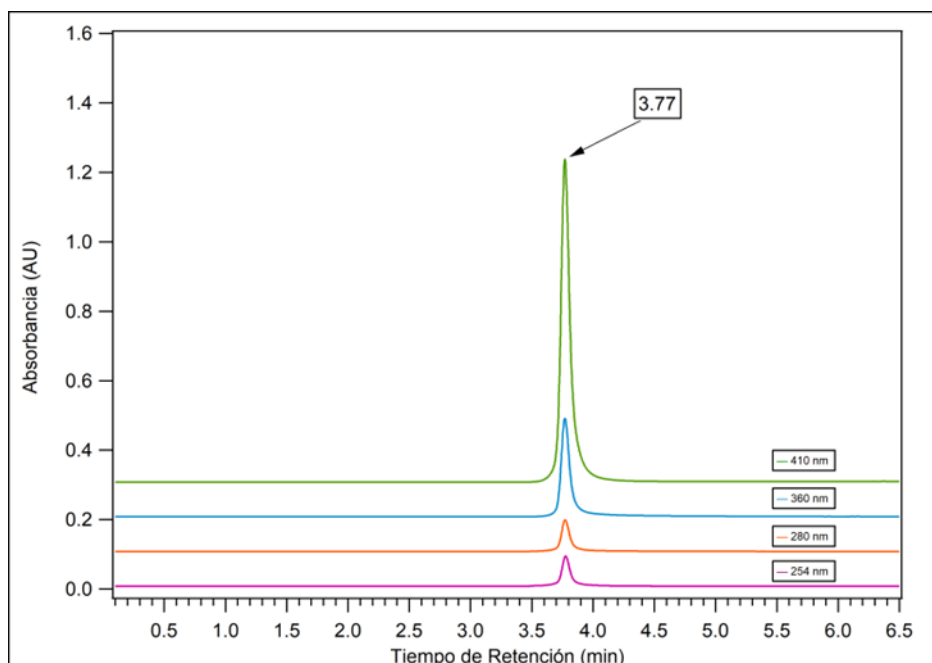


La metilfeoforbida a obtenida en la reacción anterior se obtuvo como una mezcla de epímeros; su caracterización se basó en trabajos de grados anteriores (Rodríguez, 2018) para comprobar que el producto obtenido correspondía efectivamente a la molécula deseada. Se obtuvo el cromatograma HPLC (Figura 17) de la muestra a diferentes longitudes de onda (254, 280, 360 y 410 nm), con el

fin de confirmar la pureza del compuesto en cuestión. Se seleccionaron dichas longitudes de onda para el análisis debido a que en estas presentan absorción los diferentes derivados de clorofilas presentes en las hojas de la espinaca. En el cromatograma se puede evidenciar el pico correspondiente a la metilfeoforbida *a* en un tiempo de retención de 3,77 min en las longitudes de onda medidas usando una columna amino con un método isocrático de acetonitrilo.

### Figura 17

Perfil cromatográfico de alta eficiencia de la metilfeoforbida *a* obtenida

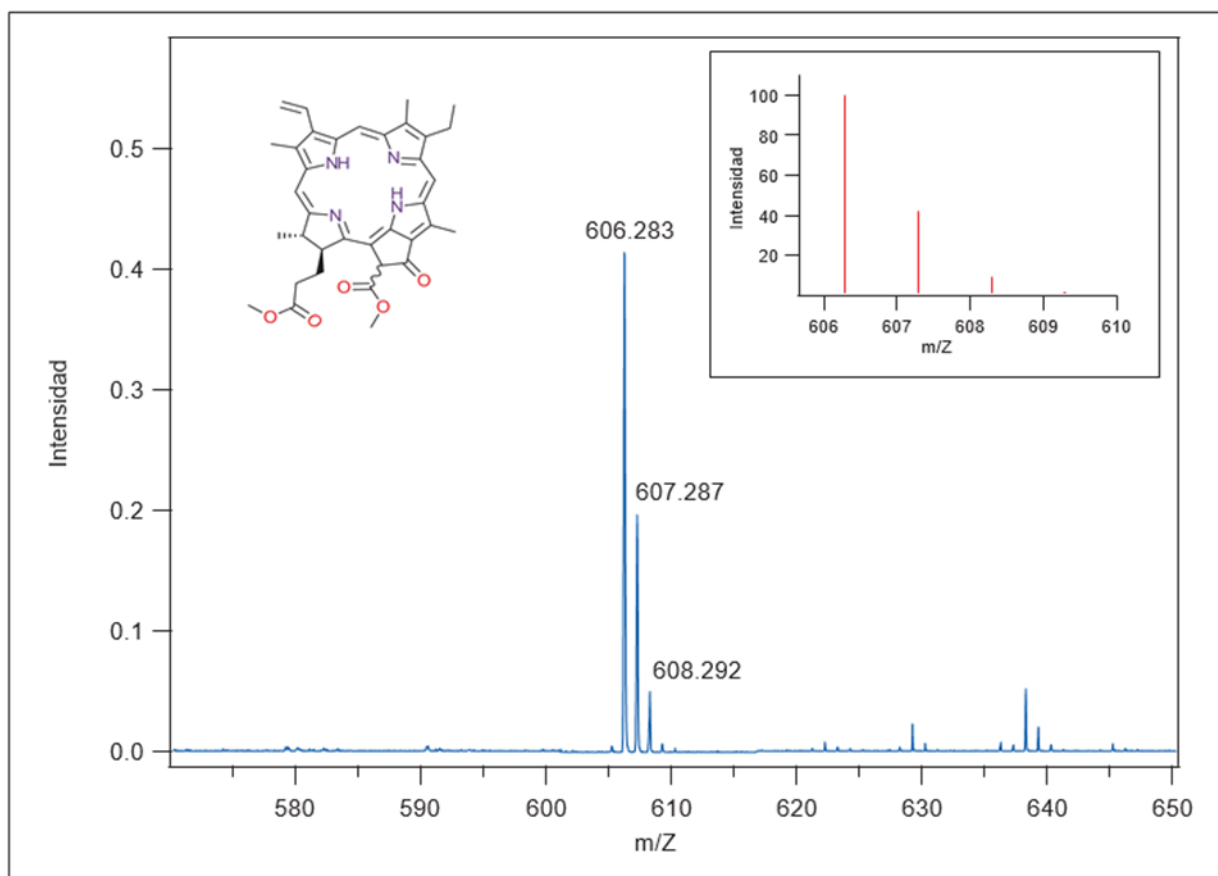


Además, se obtuvo el espectro de masas MALDI donde se puede observar una masa de 606,28 la cual corresponde a la metilfeoforbida *a*, también se evidencia que el patrón isotópico de la muestra obtenida corresponde efectivamente con el reportado en la literatura (Figura 18). En el espectro UV-Vis tomado a la muestra obtenida en el laboratorio (Figura 19), se observa la presencia de dos máximos de absorción a 410 y 660 nm los cuales corresponden a la banda Soret y la banda Q respectivamente, este tipo de absorción es característica de los derivados de clorofila

los cuales tienen la posibilidad de absorber luz en el espectro visible, este comportamiento es el que permitió inferir que la molécula sintetizada permite una reacción de fotooxidación de moléculas como el estradiol.

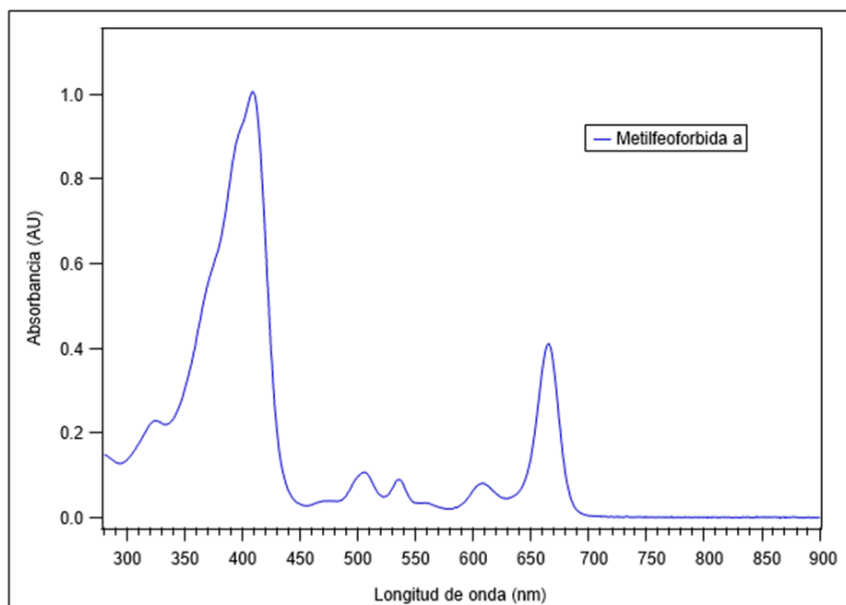
### Figura 18

Espectro de masas MALDI de la metilfeoforbida *a* obtenida



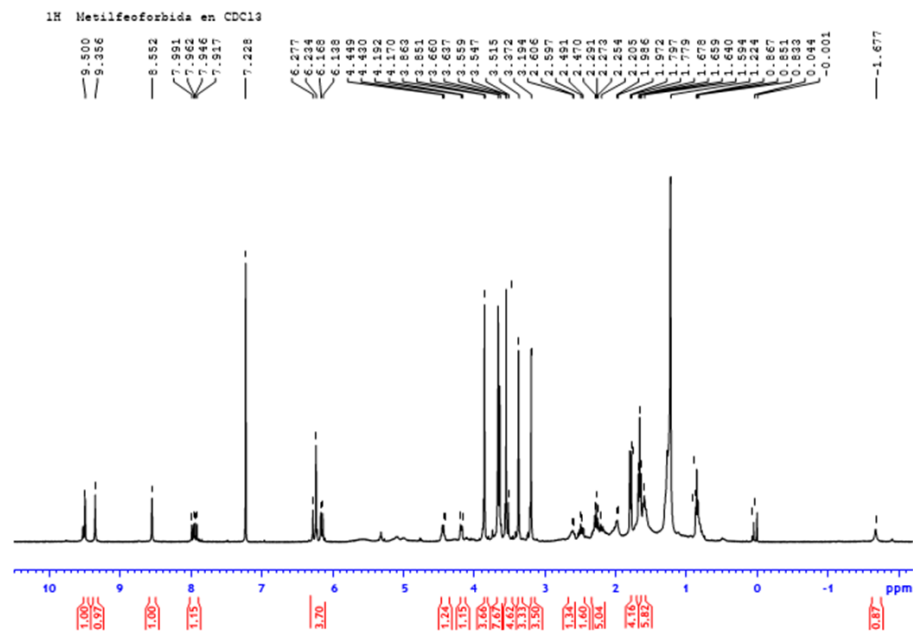
**Figura 19**

Espectro UV-VIS de la metilfeoforbida a obtenida



**Figura 20**

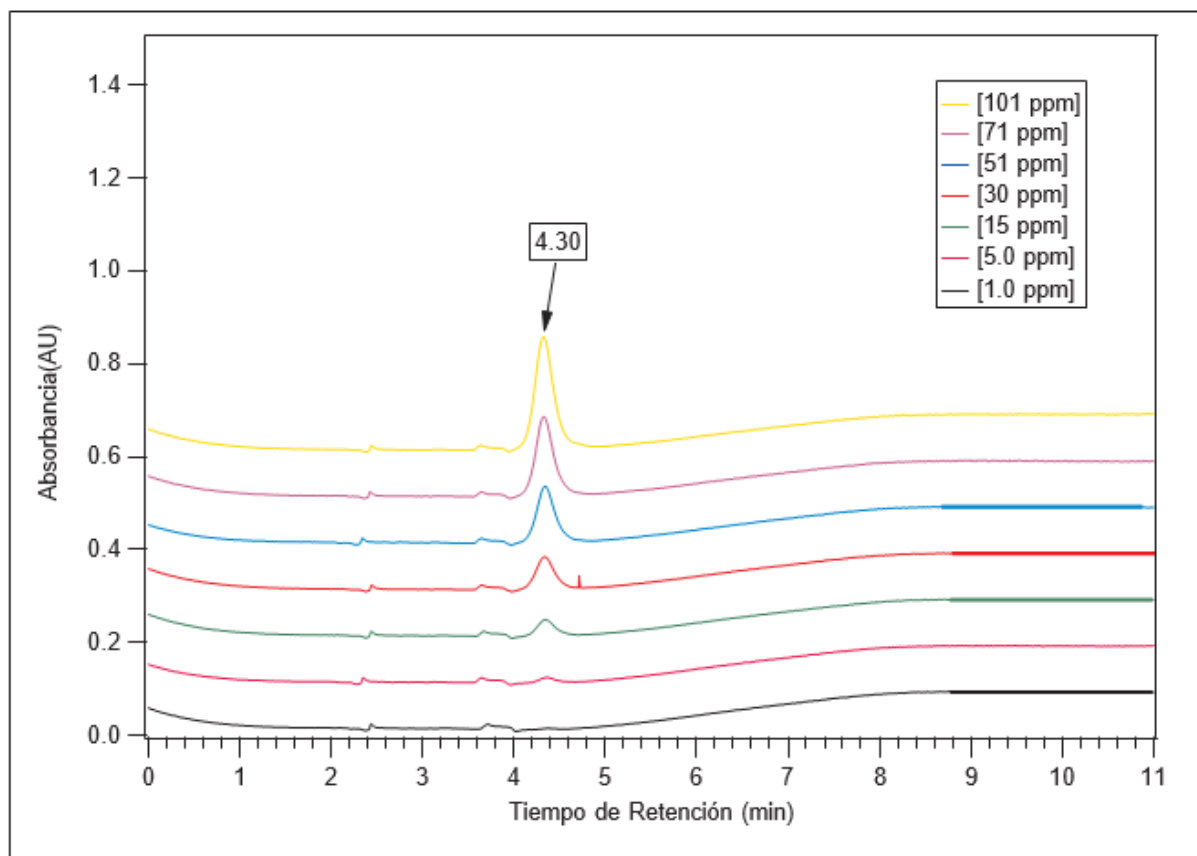
Espectro RMN1H de la metilfeoforbida a



Finalmente, se obtuvo el espectro RMN de protón de la metilfeoforbida *a* (Figura 20) en los cuales se pudo corroborar que la transesterificación realizada fue exitosa, ya que se pueden observar las señales características de esta muestra CDCl<sub>3</sub> con 1,0 % TMS, 400 MHz, 1H RMN= 9,50 (s, 1H, 10-H); 9,35 (s, 1H, 5-H); 8,55 (s, 1H, 20-H); 7,91-7,99 (dd, 1H, 3(1)-H); 6,27 (dd, 1H, 3(2)-H (Trans)); 6,23 (s, 1H, 13(2)-H); 6,16 (dd, 1H, 3(2)-H (Cis)); 4,44 (q, 1H, 18-H); 4,174,19 (m, 1H, 17H); 3,86 (s, 3H, 13(4)-H); 3,85-3,63 (m, 2H, 8(1)-H); 3,66 (s, 3H, 17(4)-H); 3,55 (s, 3H, 12(1)-H); 3,51 (s, 3H, 2(1)-H); 3,37 (s, 3H, 7(1)-H); 2,6-2,2 [(m, 1H, 17(1-a)-H), (m, 1H, 17(2-a)-H), (m, 1H, 17(1-b)-H), (m, 1H, 17(2-b)-H)]; 1,79 (d, 3H, 18(1)-H); 1,67 (t, 3H, 8(2)-H); -1,67 (s, 2H, N-H). Se puede observar la presencia de grasa y residuos de disolvente presentes en la muestra, además las señales correspondientes a la presencia del epímero de la metilfeoforbida.

## 5.2. Curva de calibración del 17 $\beta$ -estradiol

Se realizó una curva de calibración tomando diferentes concentraciones del 17 $\beta$ -estradiol y midiéndolo por HPLC analítico, utilizando una columna Apex CN (Cyano) 5 $\mu$ m 25cm x 4.6mm, con una fase móvil de *n*-heptano:isopropanol. En el cromatograma obtenido (Figura 21) se puede observar los diferentes picos correspondientes a las diferentes concentraciones del 17 $\beta$ -estradiol: 1,0 ppm, 5,0 ppm, 15 ppm, 30 ppm, 51 ppm, 71 ppm y 101 ppm; en un mismo tiempo de retención 4.3 minutos. De esta manera, se confirma la presencia de un único compuesto y se hace uso de este método cromatográfico para realizar los experimentos de foto-oxidación y la detección de los posibles productos de la degradación ya que estos tienden a eluir en un menor tiempo de retención.

**Figura 21**Curva de calibración del 17 $\beta$ -estradiol

### 5.3. Experimentos de foto-oxidación

Las reacciones de foto-oxidación se realizaron a dos longitudes de onda (410 nm y 630nm), se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción ( $t=0$  min,  $t=60$  min,  $t=120$  min,  $t=180$  min y  $t=240$  min) para hacer el seguimiento de la misma. Se utilizaron 5 viales en los cuales se colocó una concentración diferente del foto-catalizador preparado y una concentración constante del 17 $\beta$ -estradiol (Tabla 2), también se midieron 3 blancos de reacción los cuales consistían en un vial en ausencia de luz, otro en ausencia de foto-catalizador y el último en ausencia de oxígeno (Tabla 3).

**Tabla 2**

Condiciones de reacción

Concentraciones	Viales				
	1	2	3	4	5
[Estradiol], ppm	50	50	50	50	50
[Fotocatalizador], ppm	50	100	200	300	700

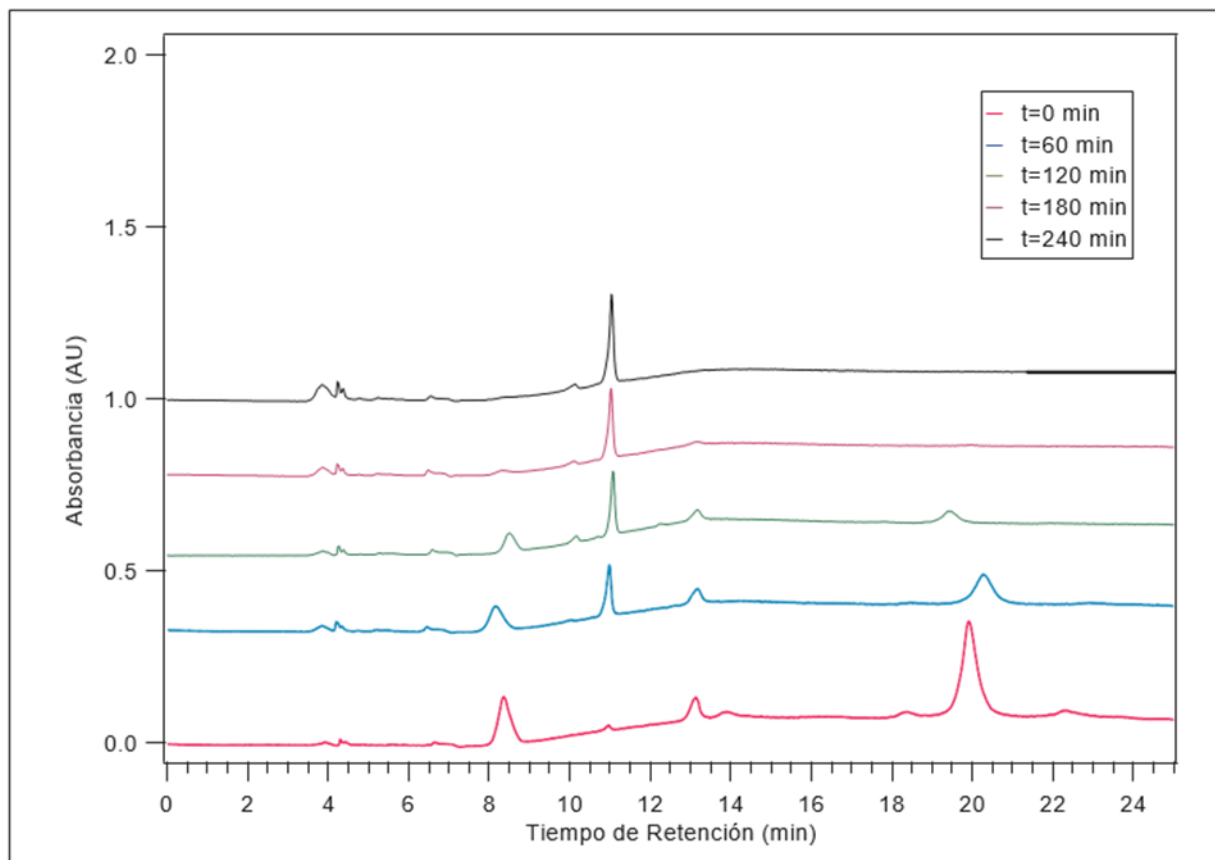
La reacción fue seguida mediante el uso de HPLC, utilizando el siguiente método: fase móvil Heptano:Isopropanol (90:10) 0-3min (Gradiente lineal), (50:50) 3-8 min (Isocrático), (50:50) 8-19 min (Gradiente lineal), (90:10) 19-21 min (Isocrático) y (90:10) 21-25 min (Gradiente lineal) con una columna Apex CN (Ciano) 4,6mm x 25cm, 5 $\mu$ m a un flujo de 0,9 mL/min.

### 5.3.1. Experimento 1

Para el primer experimento se utilizó la tapa fabricada de leds con longitud de onda de 660nm (luz roja), se tomó la primera medición por HPLC en el tiempo 0min usando el método descrito anteriormente y luego se realizaron mediciones cada hora utilizando el mismo procedimiento hasta completar las 4 horas de reacción que fue el tiempo en el cual ya no se observa una concentración detectable del 17 $\beta$ -estradiol, los cromatogramas de dichas mediciones se pueden ver en la Figura 22.

### Figura 22

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660 nm y 300 ppm del foto- catalizador



Como se puede observar en la figura anterior en el cromatograma del tiempo  $t=0$  min se encuentran dos picos representativos en 8,5 min y 20 min los cuales corresponden al  $17\beta$ - estradiol y al fotocatalizador metilfeoforbida *a* respectivamente. Al transcurrir una hora de reacción se puede observar una disminución del pico de estradiol y la aparición de diferentes picos entre los minutos 3,8 y 4,6 correspondientes a los diferentes productos de degradación del  $17\beta$ -estradiol, además, se puede evidenciar la presencia de un nuevo pico en el minuto 11 el cual pertenece a los posibles productos de degradación del fotocatalizador, por lo tanto, no solo se realiza la degradación del estrógeno en la reacción si no a su vez la descomposición de la metilfeoforbida *a*. Completadas las dos horas se puede observar en el cromatograma verde  $t=120$  min (Figura 22) una linealidad en el comportamiento de la reacción disminuyendo el pico del estradiol y aumentando

así los picos de los productos de degradación de este, de igual manera, se puede evidenciar la disminución del pico correspondiente al fotocatalizador y un aumento en el pico del posible producto de descomposición del mismo. Al transcurrir la tercera hora de reacción ( $t=180$  min) la reacción continua con el mismo comportamiento, disminuyendo significativamente las concentraciones del  $17\beta$ -estradiol y de la metilfeoforbida *a* presentes en el medio, a su vez el aumento de los picos de los productos de degradación de estos.

En la cuarta hora de reacción se puede observar la desaparición de los picos correspondientes al estrógeno  $17\beta$ -estradiol y del fotocatalizador metilfeoforbida *a* lo que nos permite concluir que si ocurre una reacción de foto oxidación del estradiol usando un fotocatalizador derivado de clorofila, luz de 660 nm y oxígeno disuelto en la solución, esto se debe a la absorción de luz por parte del fotosensibilizador metilfeoforbida *a* el cual forma un estado excitado que mediante la transferencia de energía desde sus moléculas al oxígeno disuelto en el medio permite la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son las responsables de la degradación que se dio en el  $17\beta$ -estradiol. Al final de la reacción se puede observar un cambio de color de la solución de un verde oscuro a un amarillo intenso. Los picos de los productos de descomposición del estradiol y del fotocatalizador fueron recogidos y posteriormente caracterizados por espectrometría de masas.

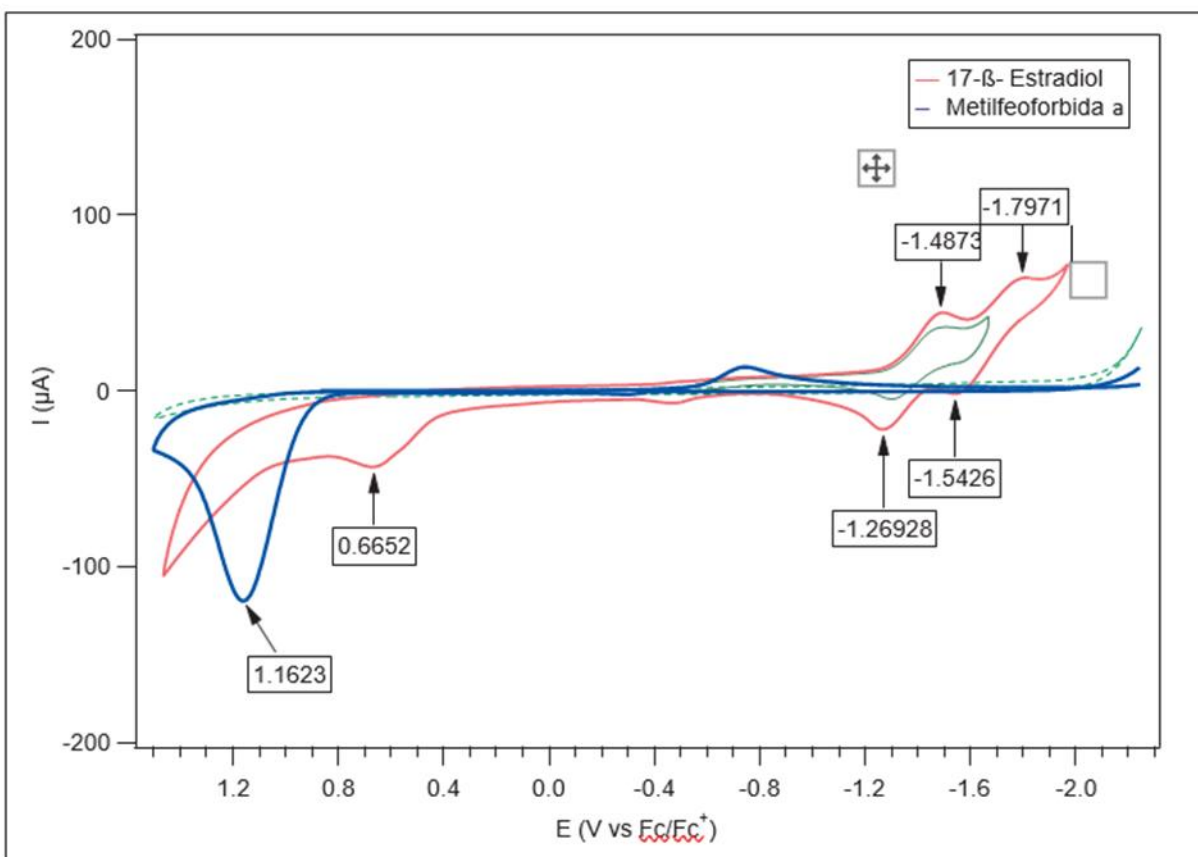
### **5.3.2. Electroquímica**

Se realizaron experimentos de voltámetro cíclica al  $17\beta$ -estradiol y de la metilfeoforbida *a* utilizando una estación electroquímica con electrodos de disco de Pt y carbón vítreo de 2 mm de diámetro; para determinar los procesos de oxidación y reducción de dichos compuestos y así poder obtener los valores de los potenciales de oxidación para poder predecir los mecanismos a través de los cuales se desarrolla la reacción de foto degradación del estradiol. En el experimento se

utilizó acetonitrilo como disolvente y hexafluoruro fosfato de tetrametil amonio ((n-Bu)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>) como electrolito de soporte. Los voltamogramas que se muestran a continuación se referenciaron versus el par ferroceno/ferrocinio<sup>+</sup>.

### Figura 23

Voltamogramas cíclicos del 17β-estradiol y de la metilfeoforbida a



En la Figura 23 se pueden observar los voltamogramas cíclicos del estrógeno y del fotocatalizador, el 17β-estradiol sólo tiene un proceso de oxidación irreversible a 1,16 V vs Fc/Fc<sup>+</sup>. la metilfeoforbida a presenta dos procesos de reducción cuasi reversibles a -1,37 y -1,64V y un proceso de oxidación irreversible a 0,66 V vs Fc/Fc<sup>+</sup>. Al observar estos valores se concluye que es

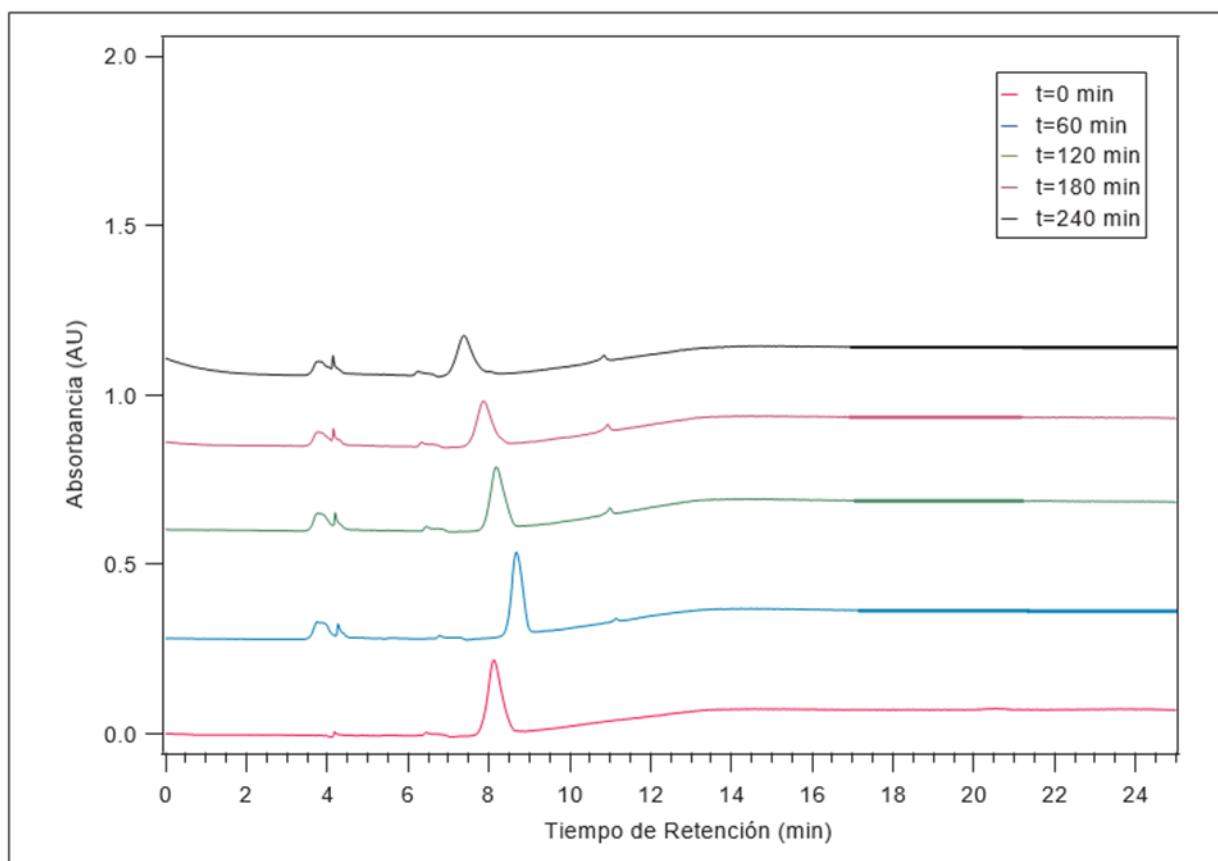
as fácil oxidar al foto catalizador que al estradiol ya que el potencial de oxidación de este es más alto que el de la metilfeoforbida a.

El potencial de reducción del oxígeno singlete reportando en la literatura es de 0,64V vs NHE el cual es un medio acuoso por lo tanto no se puede comparar con los potenciales obtenidos en los voltagramas anteriores. Los potenciales del par  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  en agua no se pueden medir apropiadamente por la insolubilidad del soluto y los potenciales reportados en la literatura oscilan entre 0,35 y 0,65 V por lo cual los potenciales de oxidación encontrados para los compuestos  $17\beta$ -estradiol y metilfeoforbida a serían superiores a 1 V y por lo tanto podríamos inferir que el oxígeno singlete no es la especie oxidante principal en esta reacción cuando se trata de una reacción de oxidación en donde implica transferencia de carga, pero no impide que ocurra una reacción a través de un mecanismo de radicales libres.

### ***5.3.3. Experimento blanco catalizador***

#### **Figura 24**

Cromatogramas experimento 1 blanco sin foto-catalizador



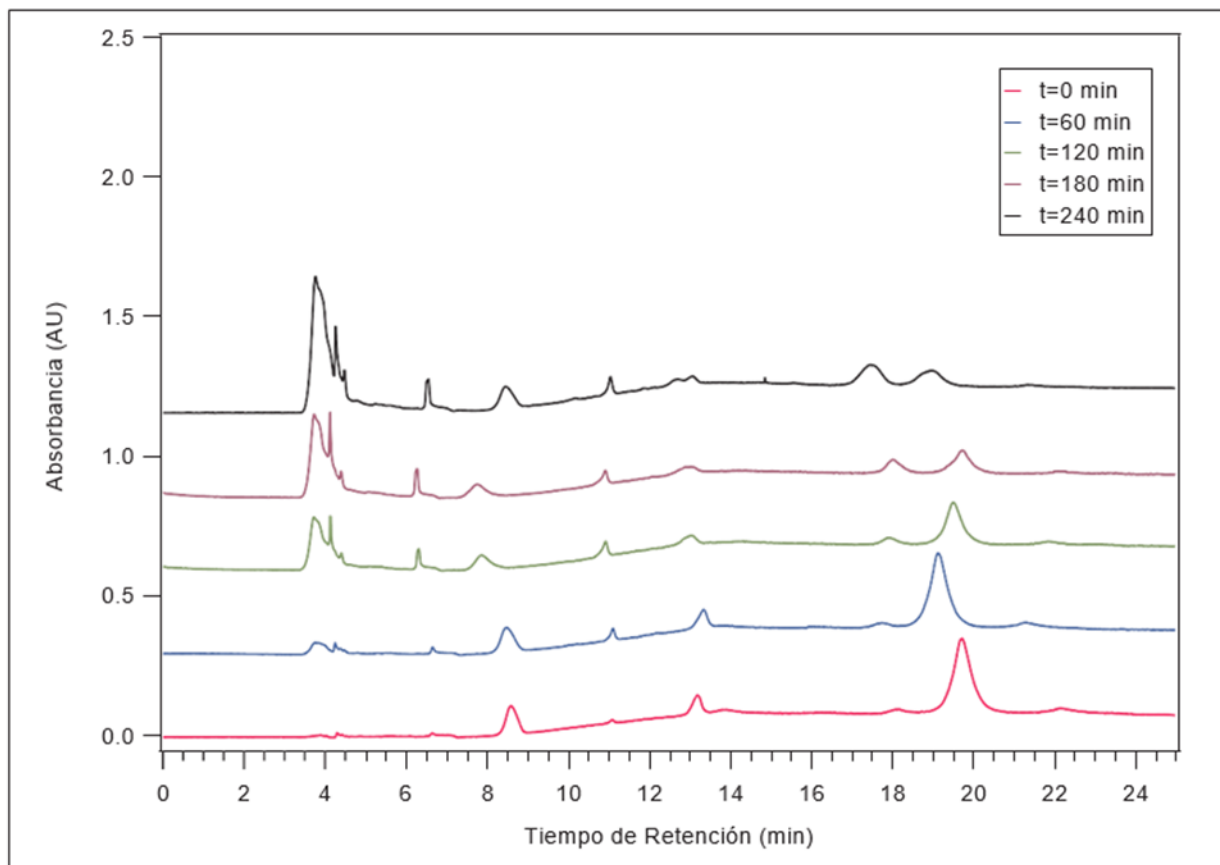
En este experimento se sometió la solución a reacción de foto-oxidación con 50 ppm de  $17\beta$ -estradiol, sin concentración de fotocatalizador bajo irradiación a 410 nm y oxígeno disuelto. La reacción fue seguida de igual manera que los experimentos anteriores durante un periodo de 4 horas. Los cromatogramas de las mediciones por HPLC de esta reacción se muestran en la figura 23. En el tiempo inicial ( $t=0$ ) podemos observar la presencia de un pico a 8 minutos perteneciente al  $17\beta$ -estradiol. Después de 60 minutos de reacción se evidencia una ligera disminución no significativa en el pico del  $17\beta$ -estradiol, de igual manera al transcurrir 120 y 180 minutos. Al completar los 240 minutos de reacción se detecta una menor concentración del compuesto en comparación con la concentración inicial del mismo, lo que nos permite inferir que se presenta una reacción de degradación, pero no en la misma proporción que cuando se emplea el foto-

catalizador. Dado a la ausencia del fotocatalizador se estima que el  $17\beta$ -estradiol fue degradado debido a la fotólisis indirecta causada por la absorción de radiación del oxígeno disuelto para alcanzar un estado excitado y generar posteriormente especies reactivas de oxígeno que hicieron la degradación del compuesto. Sin embargo, la degradación de E2 disminuyó sustancialmente en ausencia del fotocatalizador debido a que este es el promotor esencial de ERO para la foto-oxidación.

#### 5.3.4. Experimento blanco sin luz

**Figura 25**

Cromatogramas experimento 1 blanco sin luz

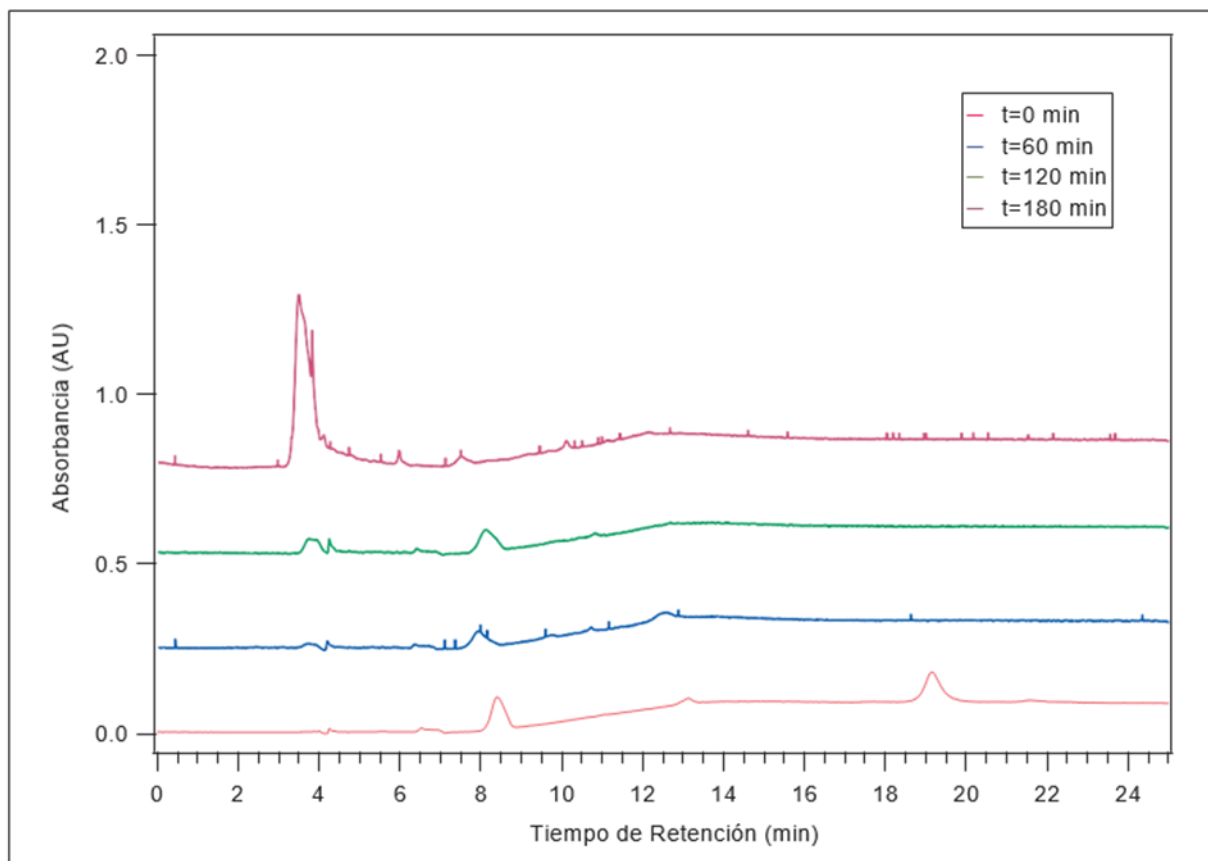


Para realizar este experimento, se procedió a poner en reacción 50ppm de  $17\beta$ -estradiol, 100ppm de metilfeoforbida *a* y oxígeno disuelto. Este vial, se aisló de la radiación durante toda la reacción. Los respectivos cromatogramas tomados a cada hora de reacción se pueden ver en la figura 25. En tiempo cero, se puede observar en 8,8 min el pico perteneciente a la molécula del  $17\beta$ -estradiol y en 19,9 min el pico de la metilfeoforbida *a*. Se puede apreciar en los cromatogramas que a medida que transcurre el tiempo de reacción se evidencia la aparición de nuevos picos pertenecientes a los derivados de la degradación de las dos moléculas de procedencia, por lo que, se puede decir que ambas moléculas son susceptibles a la oxidación directa con oxígeno disuelto. Sin embargo, esta reacción ocurre a una velocidad más lenta. Por lo tanto, a pesar de que no se suministró energía al sistema en forma de luz para excitar a las moléculas como en los anteriores experimentos, las reacciones ocurren ya que son termodinámicamente favorables, pero a velocidades más lentas.

### ***5.3.5. Experimento blanco sin oxígeno***

#### **Figura 26**

Cromatogramas experimento 1 blanco sin oxígeno



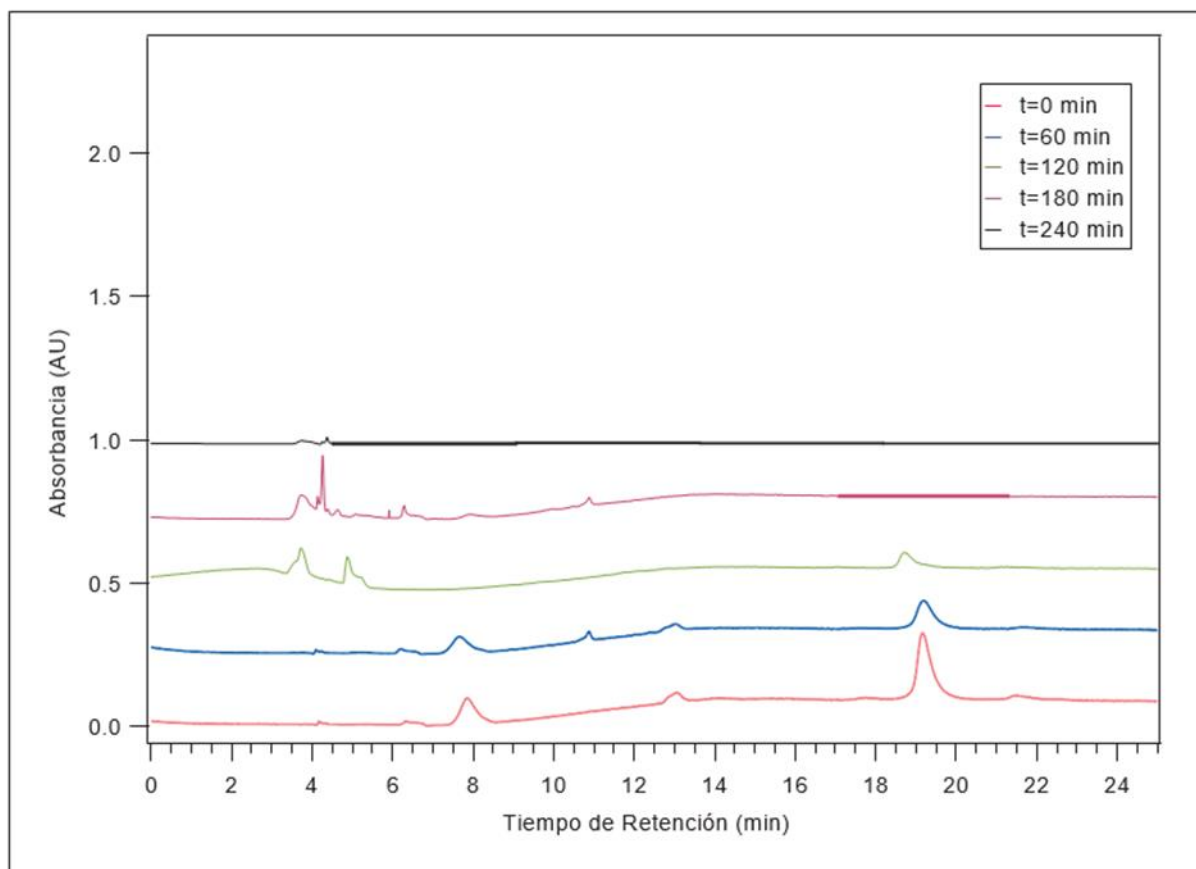
En esta reacción, se colocaron en el vial 50 ppm de estradiol y 100ppm de fotocatalizador a irradiación LED de 660nm, sin embargo, el vial se purgó con argón previamente y se mantuvo la atmósfera de argón durante toda la reacción para garantizar la ausencia de oxígeno en la reacción. Se puede observar en la Figura 26, a tiempo cero los dos picos pertenecientes al  $17\beta$ -estradiol y metilfeoforbida  $\alpha$  a 8,2 min y 19,8 min, respectivamente. Transcurridos una hora de reacción podemos observar la desaparición total del pico perteneciente a la metilfeoforbida  $\alpha$ , esto se le atribuye posiblemente a que el estado excitado de la molécula hace transferencia electrónica a otra molécula en el medio. Una vez el fotocatalizador forma el catión radical puede sufrir reacciones de degradación mediante polimerización catiónica. Probablemente, dicha molécula

aceptora de carga es una molécula de  $17\beta$ -estradiol, por lo que ocasiona también su posterior degradación después de 3 horas de reacción, como se puede observar en el cromatograma.

### 5.3.6. Experimento 2

**Figura 27**

Cromatogramas experimento 2



En el segundo experimento se utilizó la tapa fabricada de leds de 410 nm (luz violeta intenso), 50  $\mu$ m de  $17\beta$ -estradiol y 200 ppm de fotocatalizador con oxígeno disuelto. Se tomaron mediciones cada una hora hasta completar 4 horas de reacción. Los cromatogramas se pueden observar en la figura 27. En el cromatograma del tiempo  $t=0$  min se encuentran dos picos representativos en 8 min y 19,8 min los cuales corresponden al  $17\beta$ -estradiol y al foto-catalizador

metilfeoforbida a respectivamente. Al transcurrir una hora de reacción se puede observar una ligera disminución del pico de estradiol y del fotocatalizador, por ende, no solo ocurre la degradación del estrógeno en la reacción, también la descomposición de la metilfeoforbida a.

A las dos horas de reacción se evidencia la degradación total del  $17\beta$ -estradiol por lo que no se detecta dicho compuesto en el cromatograma y la aparición de dos nuevos picos en 3,9 min y 4,5 min, que se le atribuyen a los productos de degradación del  $17\beta$ -estradiol. A tiempo  $t=3h$  se observa la desaparición del pico correspondiente a la metilfeoforbida *a* y el aumento en los picos de los compuestos de degradación posiblemente también del fotocatalizador. Finalmente, transcurridas las 4h de reacción no se detecta ningún compuesto por lo que se concluye que fue exitoso la fotooxidación del  $17\beta$ -estradiol y la posterior degradación de sus productos. La degradación se les atribuye a las especies reactivas de oxígeno producidas por el oxígeno mediante la transferencia de carga del catalizador por su previa excitación. Cabe recalcar que la metilfeoforbida *a* tiene su máximo de absorción en 410nm, por lo tanto, al ser irradiada a esta longitud de onda, ocurre una mayor absorción de energía por parte la molécula, lo que favorece a la formación de especies reactivas de oxígeno, por ende, una degradación del E2 más eficiente como se puede observar en los cromatogramas anteriores.

### ***5.3.7. Cinética de la foto-reacción***

Los experimentos se llevaron a cabo con una concentración inicial de E2 de 50 ppm, 100 ppm de fotocatalizador y radiación a 660nm con condiciones normales de aire disuelto. Los resultados muestran que la concentración de E2 decayó paulatinamente respecto al tiempo. Todos los experimentos produjeron graficas lineales de  $\ln(CE2/CoE2)$  respecto al tiempo como se muestra en la Figura 28, lo que indica que la reacción de fotodegradación de E2 en la solución posiblemente siguió una cinética de primer orden. Se realizó el mismo procedimiento para hallar la cinética del

experimento 2 bajo diferentes condiciones; 50 ppm de E2, 300 ppm de fotocatalizador e irradiación a 410 nm. Se puede observar los resultados en la Figura 29. Las concentraciones que se utilizaron para llevar a cabo las gráficas fueron las áreas bajo la curva de los respectivos picos en los cromatogramas explicados anteriormente. La constante de degradación de primer orden y la vida media de E2 se pueden calcular según las ecuaciones (1) (2) donde  $CE2$  y  $CoE2$  son las concentraciones de E2 en el tiempo cero y el tiempo de reacción,  $k$  es la constante de degradación de primer orden  $t_{1/2}$  es la vida media.

$$\ln \frac{CE2}{C_0E2} = -kt \quad (1)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

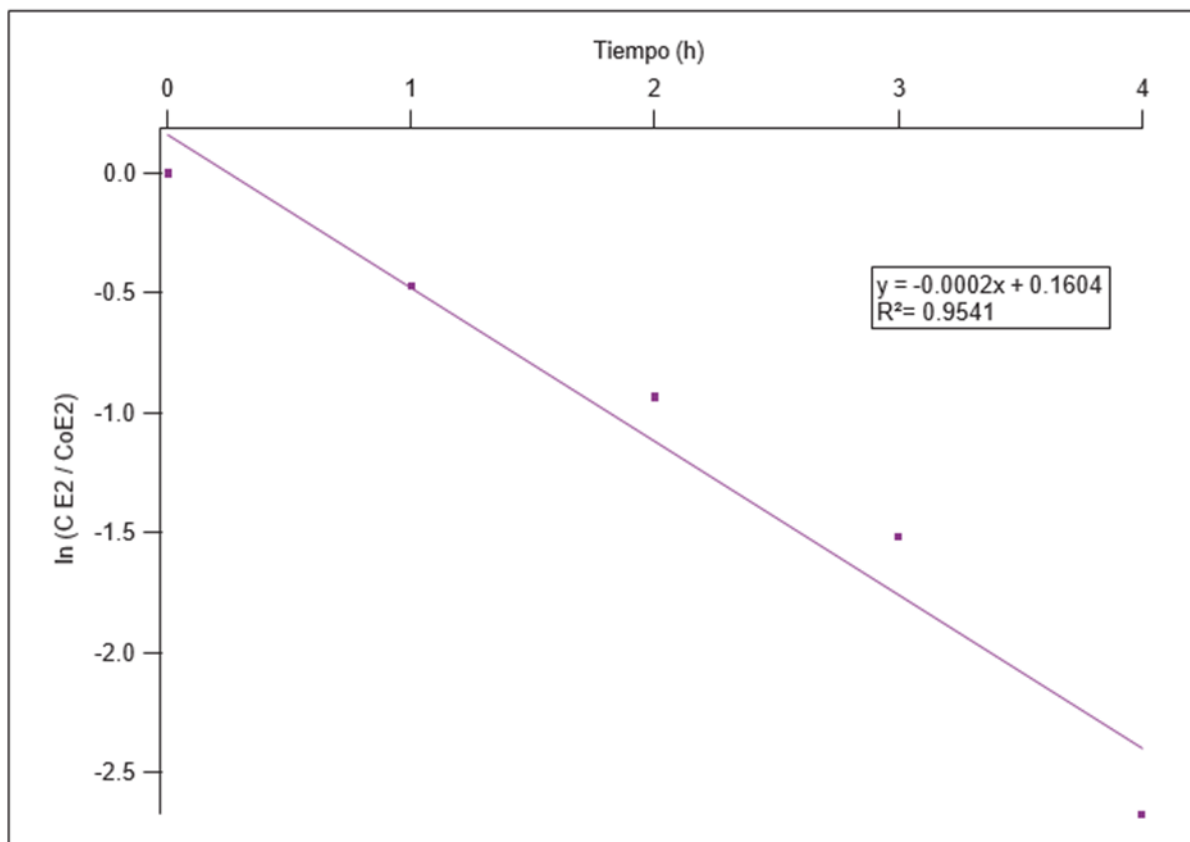
**Tabla 3**

Puntos de intercepto de la Figura 27

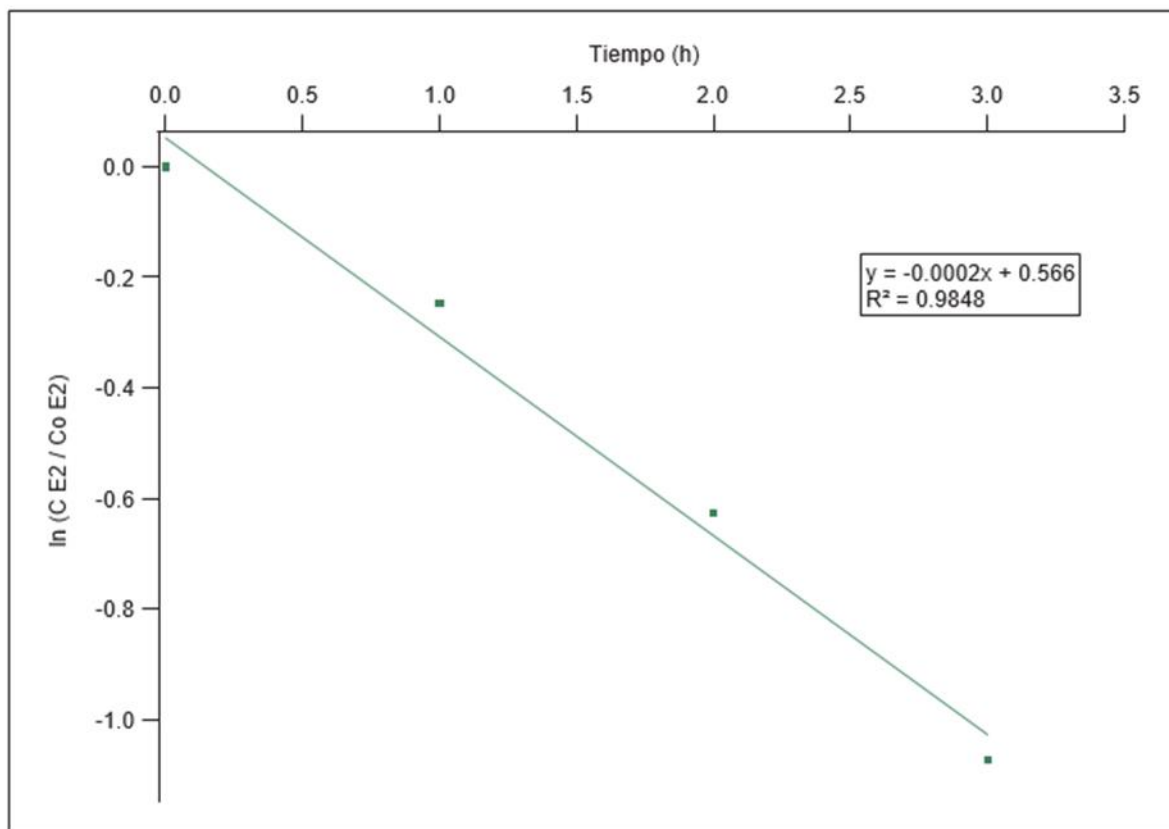
<b>X</b>	0	1	2	3	4
<b>Y</b>	0	-0,047	-0,932	-1,514	-2,674

**Figura 28**

Cinética experimento 1

**Figura 29**

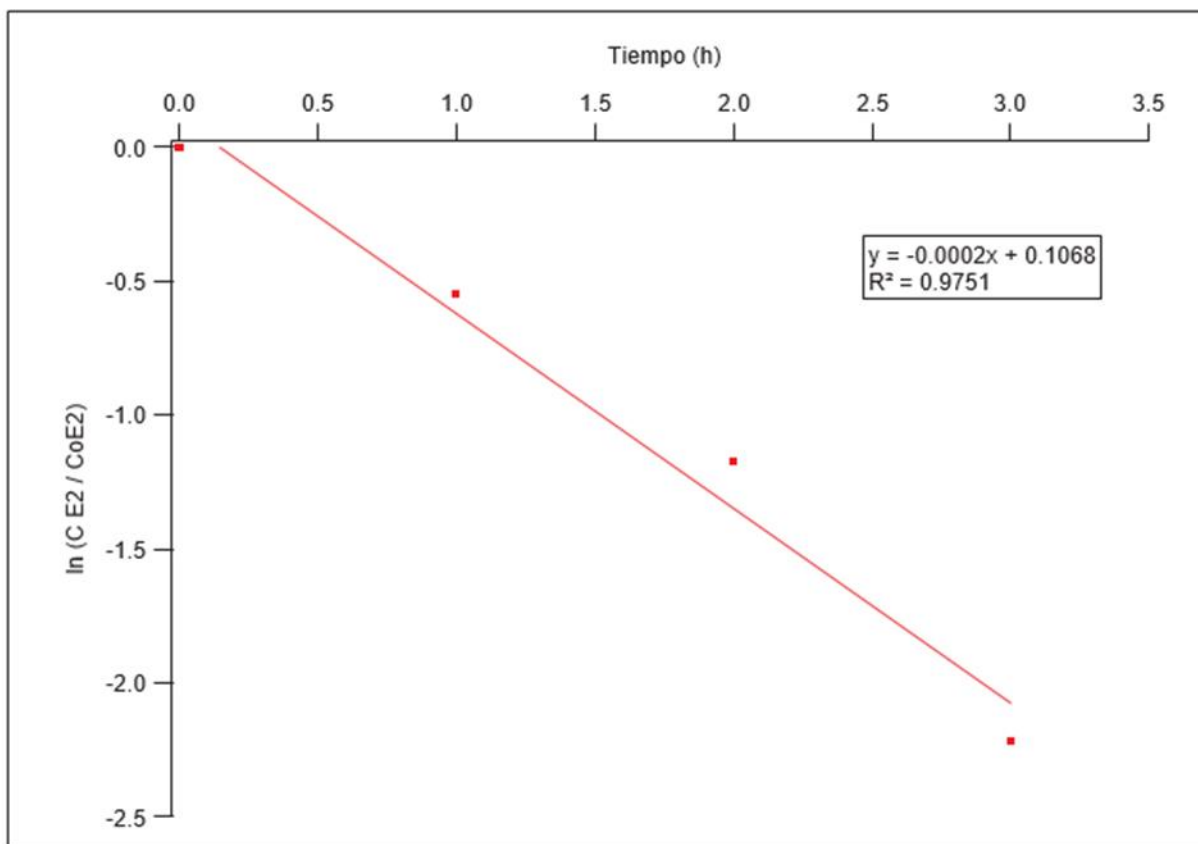
Cinética experimento 2



También se analizó la cinética de la reacción de la metilfeoforbida a en donde se evidenció que al igual que la degradación del 17 $\beta$ -estradiol, siguió una cinética de primer orden, la gráfica se presenta en la Figura 30.

### Figura 30

Cinética experimento 2



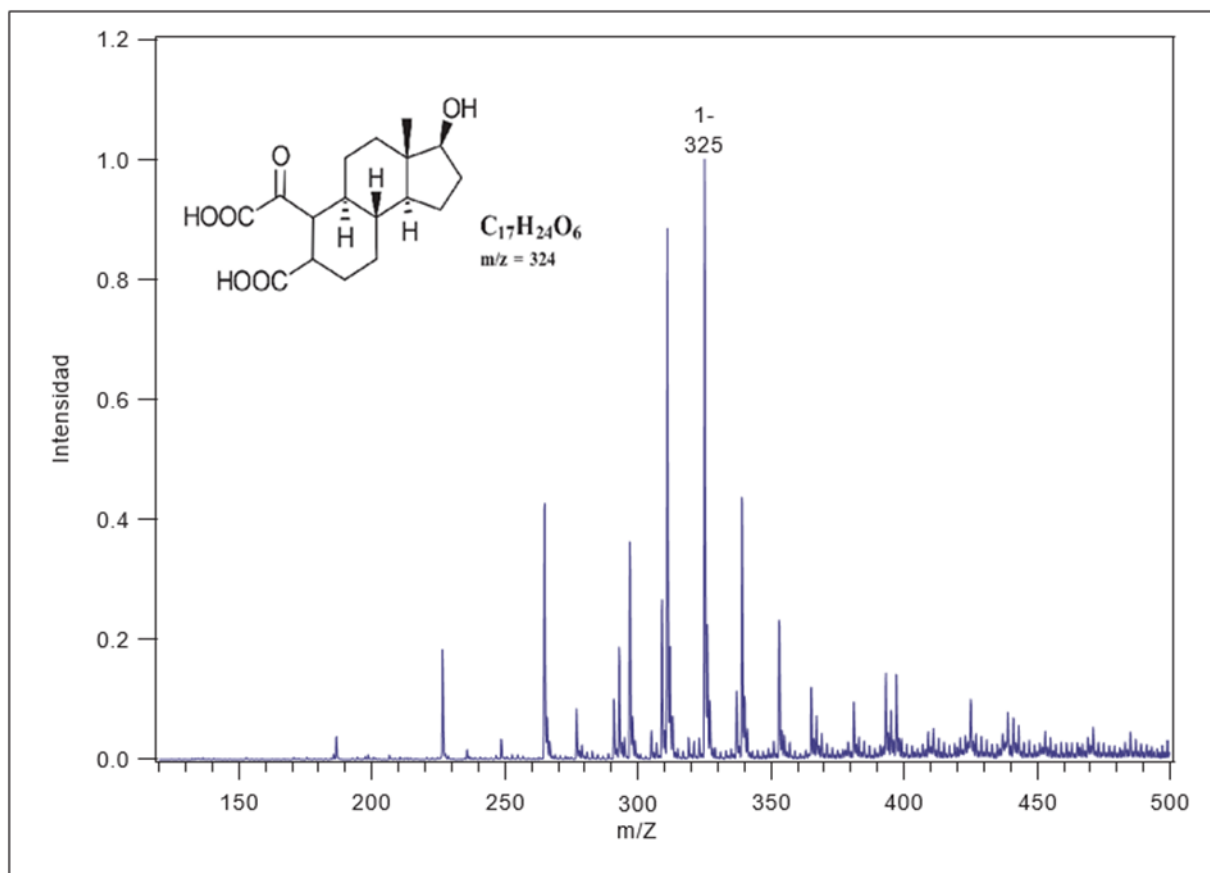
### 5.3.8. Productos de la degradación

Cuando se cumplieron las cuatro horas de la fotorreacción, se recogieron los picos de HPLC correspondientes a los derivados del  $17\beta$ -estradiol y se llevaron a análisis por masas ESI, el espectro de masas obtenido se muestra en la Figura 31. En la fotodegradación del estradiol se pudo identificar un subproducto de 324 m/z, lo cual permite inferir una posible ruta de degradación la cual ha sido reportada anteriormente en otros estudios. El estradiol presenta actividad estrogénica debido a su grupo fenólico, por lo tanto, romper este grupo puede reducir la actividad estrogénica del E2. Esta posible ruta de degradación del  $17\beta$ -estradiol se puede observar en Figura 32, este mecanismo sugiere la formación de subproductos alifáticos e hidroxilados. El mecanismo de degradación oxidativa del estradiol implica un ataque de radicales hidroxilo (OH) (Perondi

et al., 2020). Estudios recientes han analizado los intermedios de E2 y las vías de degradación por tratamientos con AOP, en donde, muestran la formación de subproductos hidroxilados mediante la adición de hidroxilo en los grupos fenólicos de E2.

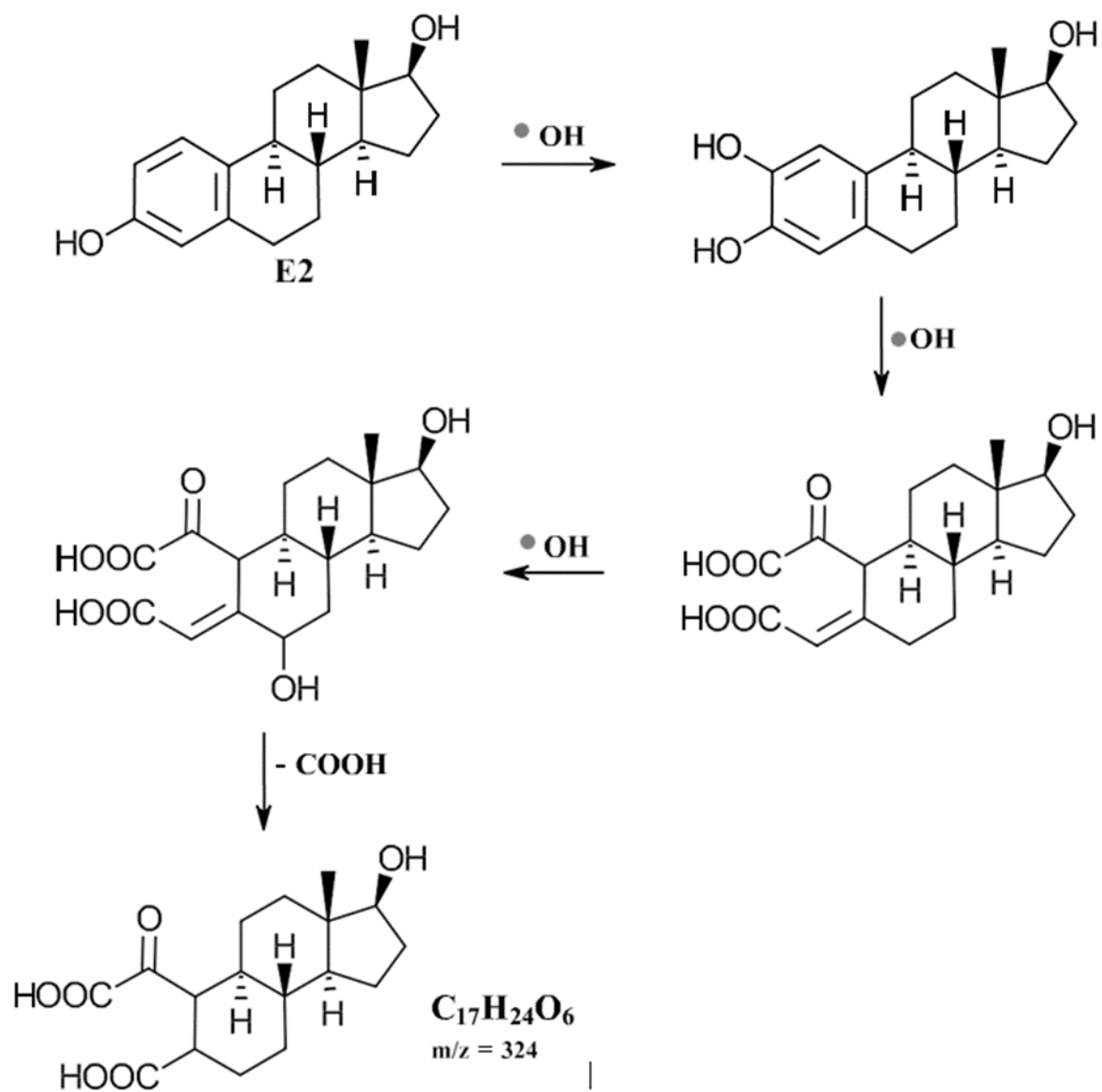
### Figura 31

Espectro de masas ESI obtenido después de la degradación del 17 $\beta$ - estradiol



### Figura 32

Posible mecanismo de degradación del 17 $\beta$ -estradiol



## 6. Conclusiones

Se preparó la metilfeoforbida a utilizando como material de partida extracto de clorofila a través de síntesis orgánica basada en reacciones clásicas como la transesterificación y la sustitución nucleofílica.

Se logró caracterizar exitosamente la metilfeoforbida a sintetizada mediante las técnicas espectroscópicas planteadas (HPLC, MALDI, RMN, UV-Vis). Por medio de espectroscopia de absorción UV-vis se observó la presencia de dos máximos de absorción a 410 y 660 nm los cuales corresponden a la banda Soret y la banda Q respectivamente, este tipo de absorción es característica de los derivados de clorofila los cuales tienen la posibilidad de absorber luz en el espectro visible.

Se realizaron los experimentos de fotooxidación a dos longitudes de onda (410nm y 660nm). en los dos experimentos se observó la ausencia total del pico de  $17\beta$ -estradiol transcurridas las 4 h de reacción, por lo tanto, se concluye que ocurre una reacción de foto oxidación del estradiol usando un fotocatalizador derivado de clorofila y oxígeno disuelto en la solución, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales son las responsables de la degradación que se dio en el  $17\beta$ -estradiol. Se observó que la metilfeoforbida a también es susceptible a la degradación en la reacción por lo que también se muestra la ausencia del pico perteneciente a dicha molécula.

Con los valores de potencial de oxidación obtenidos al realizar el experimento de electroquímica a los compuestos  $17\beta$ -estradiol y metilfeoforbida a se concluye que es más fácil oxidar al foto catalizador que al estradiol ya que el potencial de oxidación de este es más alto que el de la metilfeoforbida a. También podríamos inferir que el oxígeno singlete no es la especie oxidante principal en esta reacción ya que los valores de los potenciales de oxidación del estradiol

y del fotosensibilizador serian superiores a 1V, los cuales son potenciales más altos que el potencial de oxidación del oxígeno singlete reportando en la literatura de 0,64V vs NHE.

Todos los experimentos produjeron gráficas lineales de  $\ln(C_{E2}/C_0E2)$  respecto al tiempo como se muestra en la Figura 28, lo que indica que la reacción de fotodegradación de E2 en la solución posiblemente siguió una cinética de primer orden.

### Referencias Bibliográficas

- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.12.010>
- Aly, S. M., Carraher JR., C. E., & Harvey, P. D. (2010). Introduction to Photophysics and Photochemistry. En *Macromolecules Containing Metal and Metal-Like Elements* (pp. 1–43). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470604090.ch1>
- Antonopoulou, M., Evgenidou, E., Lambropoulou, D., & Konstantinou, I. (2014). A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. *Water Research*, 53, 215–234. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.028>
- Baltazar, E.-A. E., Petia, M.-N., Gabriela, M.-C., Gabriela, M.-M., Norma, R.-S., & Manuel, S.-Z. (2013). Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endócrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 14(2), 275–284. [https://doi.org/10.1016/S1405-7743\(13\)72242-X](https://doi.org/10.1016/S1405-7743(13)72242-X)
- Baycan, N., & Li-Puma, G. (2018). *Nanostructured catalysts for photo-oxidation of endocrine disrupting chemicals*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.05.010>
- Campanholi, K. da S. S., Jaski, J. M., Junior, R. C. da S., Zanqui, A. B., Lazarin-Bidóia, D., Silva, C. M. da, Silva, E. A. da, Hioka, N., Nakamura, C. V., Cardozo-Filho, L., & Caetano, W. (2020). Photodamage on *Staphylococcus aureus* by natural extract from *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze: Clean method of extraction, characterization and

- photophysical studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111763. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111763>
- Carbajal-Morán, H., Zárate-Quiñones, R. H., & Márquez-Camarena, J. F. (2021). Gray Water Recovery System Model by Solar Photocatalysis with TiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Crop Irrigation. *Journal of Ecological Engineering*, 22(4), 78–87.
- Cunha, D. L., Muylaert, S., Nascimento, M. T. L., Felix, L. C., Gomes, G., Bila, D. M., Fonseca, E. M., Cunha, D. L., Muylaert, S., Nascimento, M. T. L., Felix, L. C., Gomes, G., Bila, D. M., & Fonseca, E. M. (2020). Occurrence of emerging contaminants and analysis of oestrogenic activity in the water and sediments from two coastal lagoons in south-eastern Brazil. *Marine and Freshwater Research*, 72(2), 213–227. <https://doi.org/10.1071/MF19391>
- Ebina, K., Shi, K., Hirao, M., Hashimoto, J., Kawato, Y., Kaneshiro, S., Morimoto, T., Koizumi, K., & Yoshikawa, H. (2013). Oxygen and Air Nanobubble Water Solution Promote the Growth of Plants, Fishes, and Mice. *PLoS ONE*, 8(6), e65339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065339>
- Empas S.A ESP, E. S. A. E. (2009). *PSMV – Plan de Saneamiento y Manejo de Vertimientos*. <https://www.empas.gov.co/planeacion/psmv-plan-de-saneamiento-y-manejo-de-vertimientos/>
- Kanakaraju, D., Glass, B. D., & Oelgemöller, M. (2018). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.103>

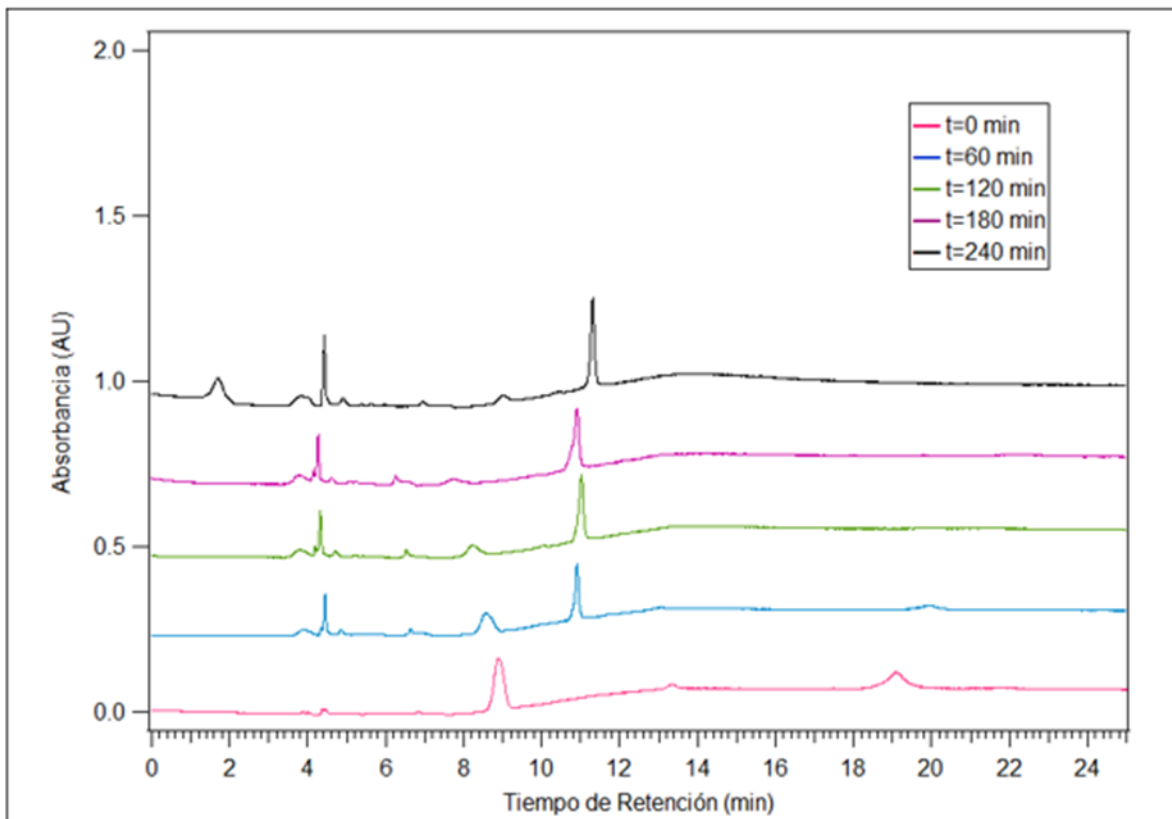
- Kuznetsov, V. N., & Serpone, N. (2006). Visible Light Absorption by Various Titanium Dioxide Specimens. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(50), 25203–25209. <https://doi.org/10.1021/jp064253b>
- Mol, H. G., Sunarto, S., & Steijger, O. M. (2000). Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography. A*, 879(1), 97–112. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00124-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00124-2)
- Pérez-Larios, A., & Gómez, R. (2013). Hydrogen production using mixed oxides: TiO<sub>2</sub>-M (CoO and WO<sub>3</sub>). *Avances Investigación En Ingeniería*, 10(2), 27–34. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/avances/article/view/2746>
- Perondi, T., Michelon, W., Basso, A., Bohrer, J. K., Viancelli, A., Fonseca, T. G., Treichel, H., Moreira, R. F. P. M., Peralta, R. A., Düsman, E., & Pokrywiecki, T. S. (2020). Degradation of estriol (E3) and transformation pathways after applying photochemical removal processes in natural surface water. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 82(7), 1445–1453. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.411>
- Rodríguez, P. (2018). *SINTESIS DE COMPUESTOS FOTOSENSIBILIZADORES DERIVADOS DE CLOROFILACON POTENCIAL ACTIVIDAD BIOLÓGICA* [Tesis de doctorado]. Universidad Industrial de Santander.
- Temesgen, T., Bui, T. T., Han, M., Kim, T.-I., & Park, H. (2017). Micro and nanobubble technologies as a new horizon for water-treatment techniques: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.011>

- Vantarakis, A., Paparrodopoulos, S., Kokkinos, P., Vantarakis, G., Fragou, K., & Detorakis, I. (2016). Impact on the Quality of Life When Living Close to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Journal of Environmental and Public Health*, 2016, 8467023. <https://doi.org/10.1155/2016/8467023>
- Zagalo, P. M., Ribeiro, P. A., & Raposo, M. (2020). Detecting Traces of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in Complex Water Matrices. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(24), 7324. <https://doi.org/10.3390/s20247324>

## Apéndices

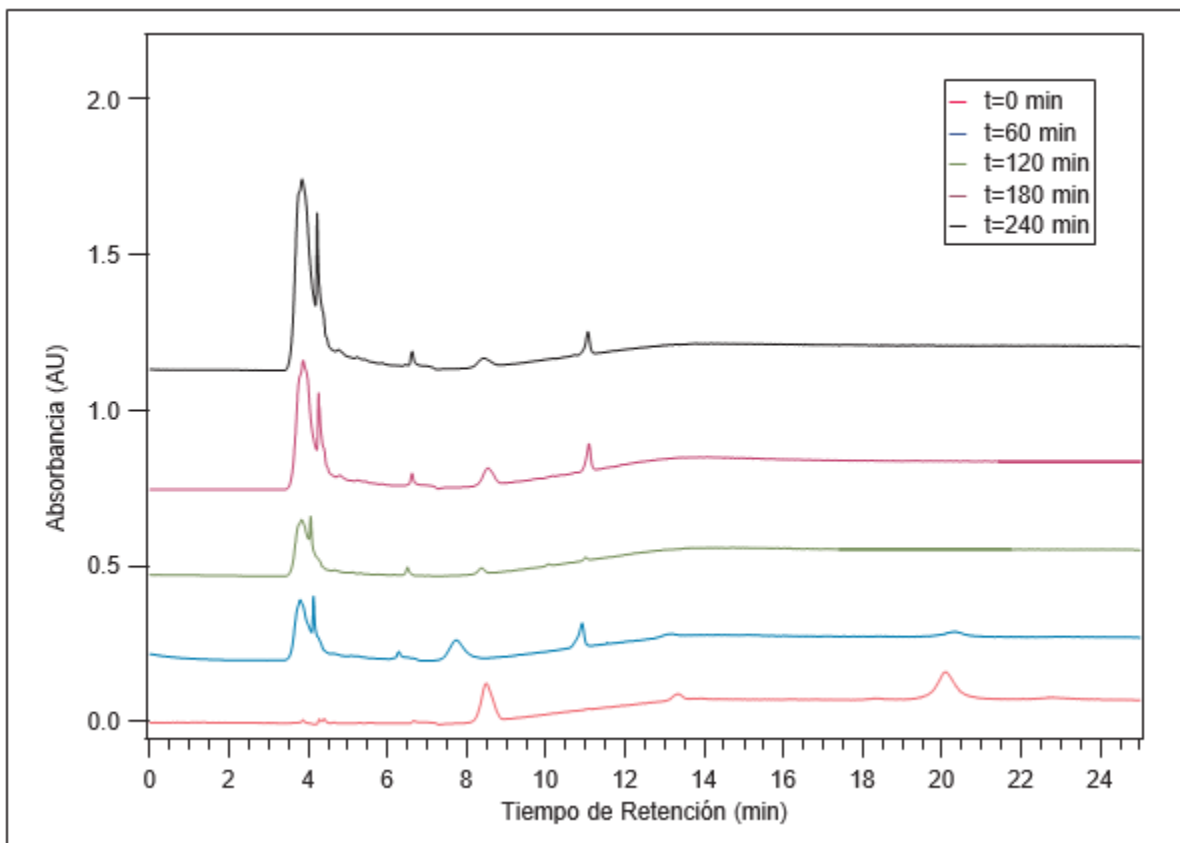
## Apéndice A

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 50ppm del foto- catalizador



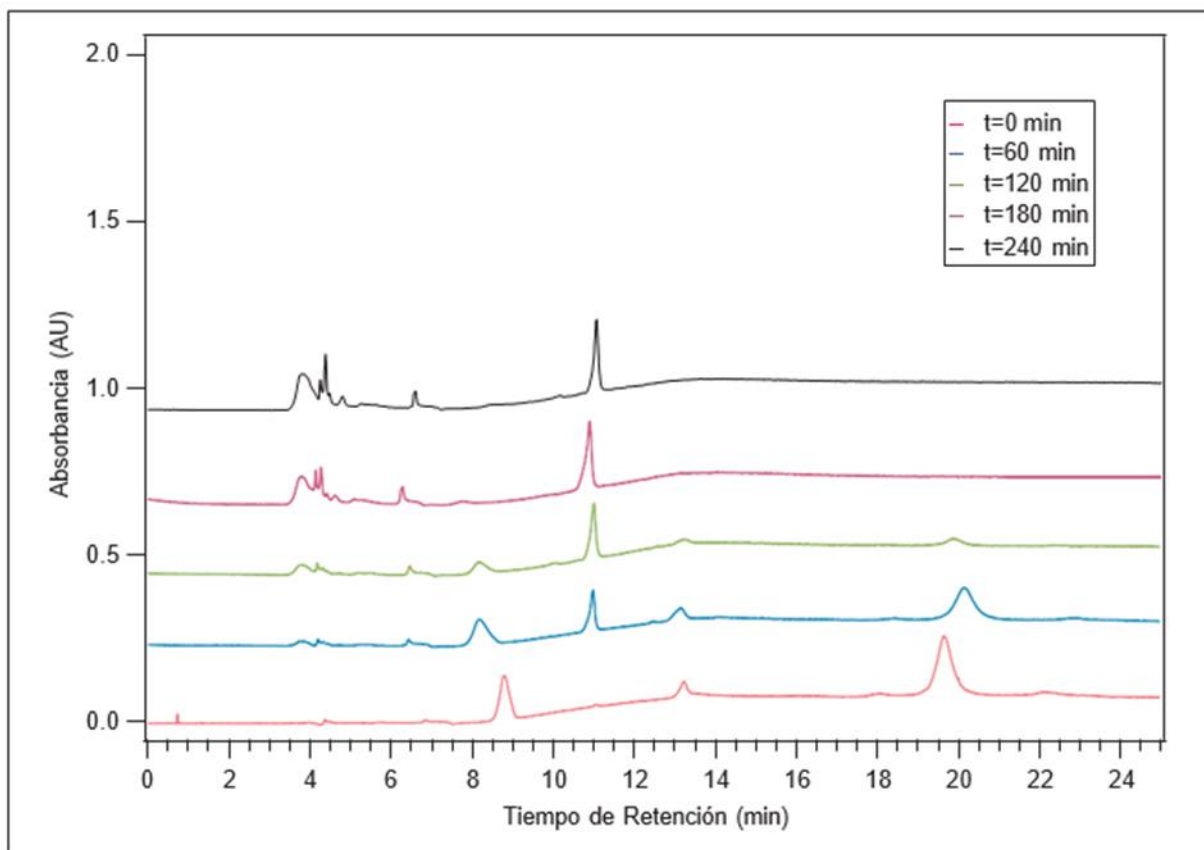
**Apéndice B**

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 100ppm del foto- catalizador



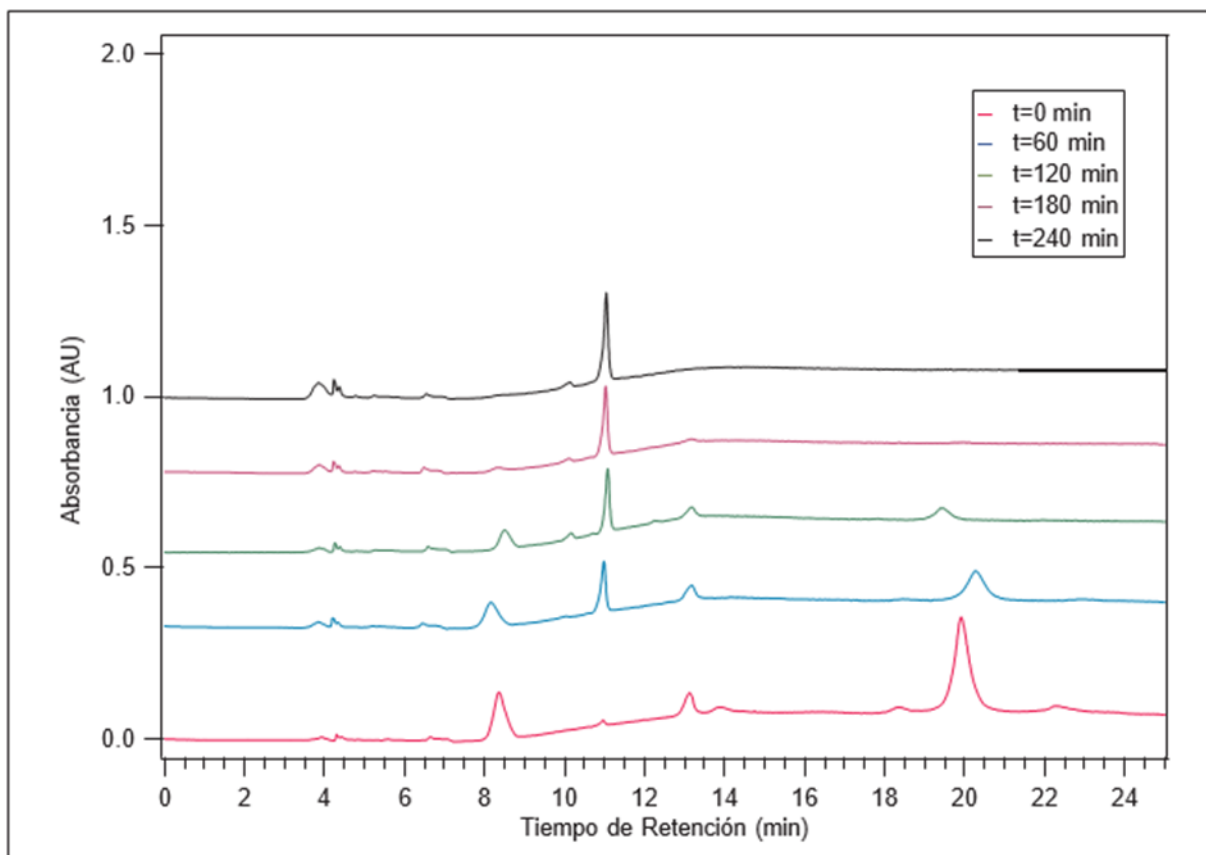
**Apéndice C**

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 200ppm del foto- catalizador



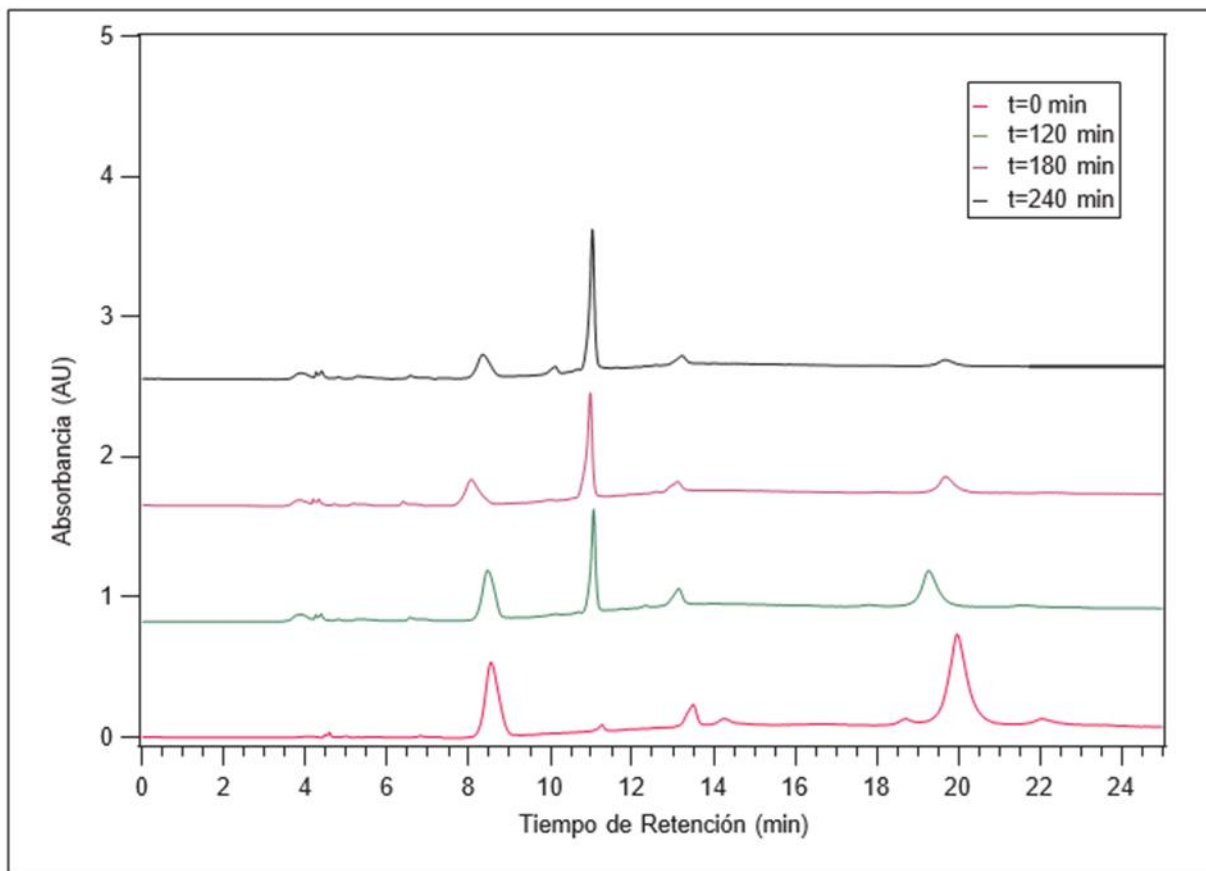
**Apéndice D**

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 300ppm del foto- catalizador



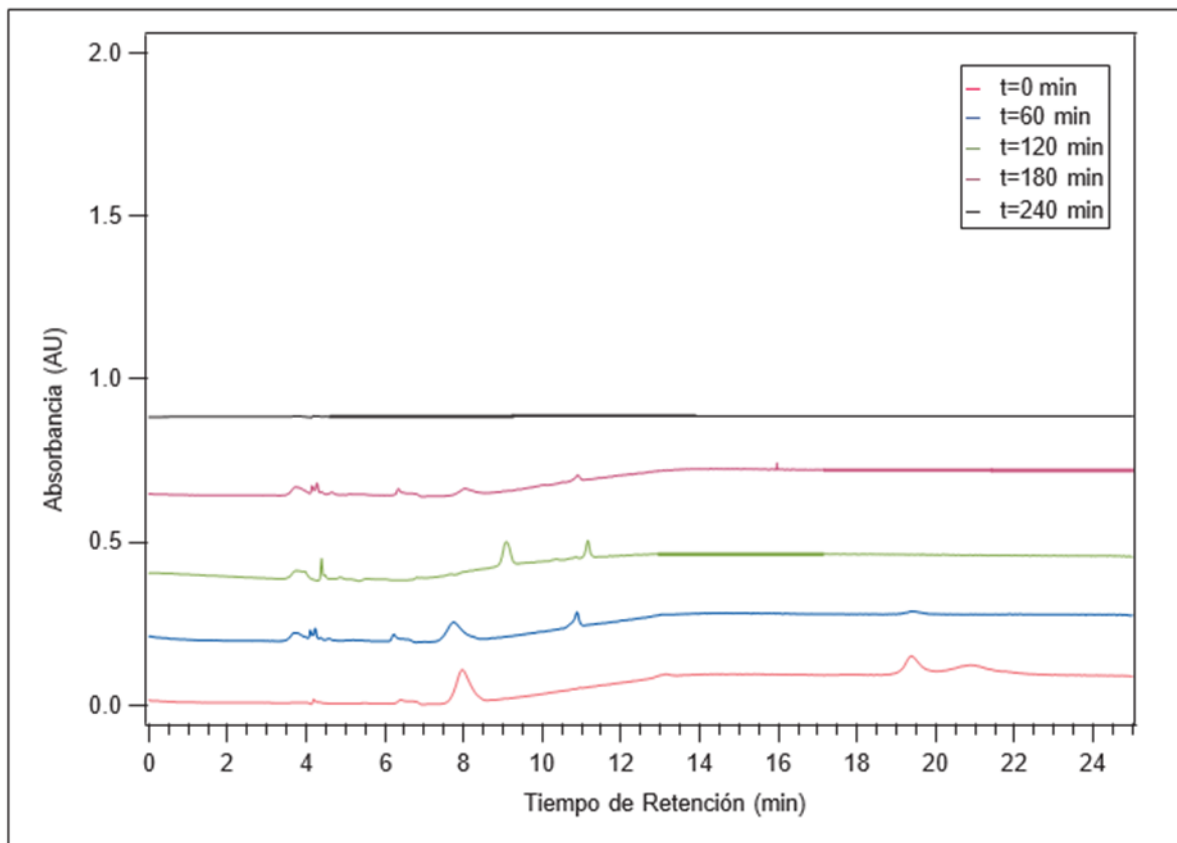
**Apéndice E**

Cromatogramas experimento 1 longitud de onda 660nm y 700ppm del foto- catalizador



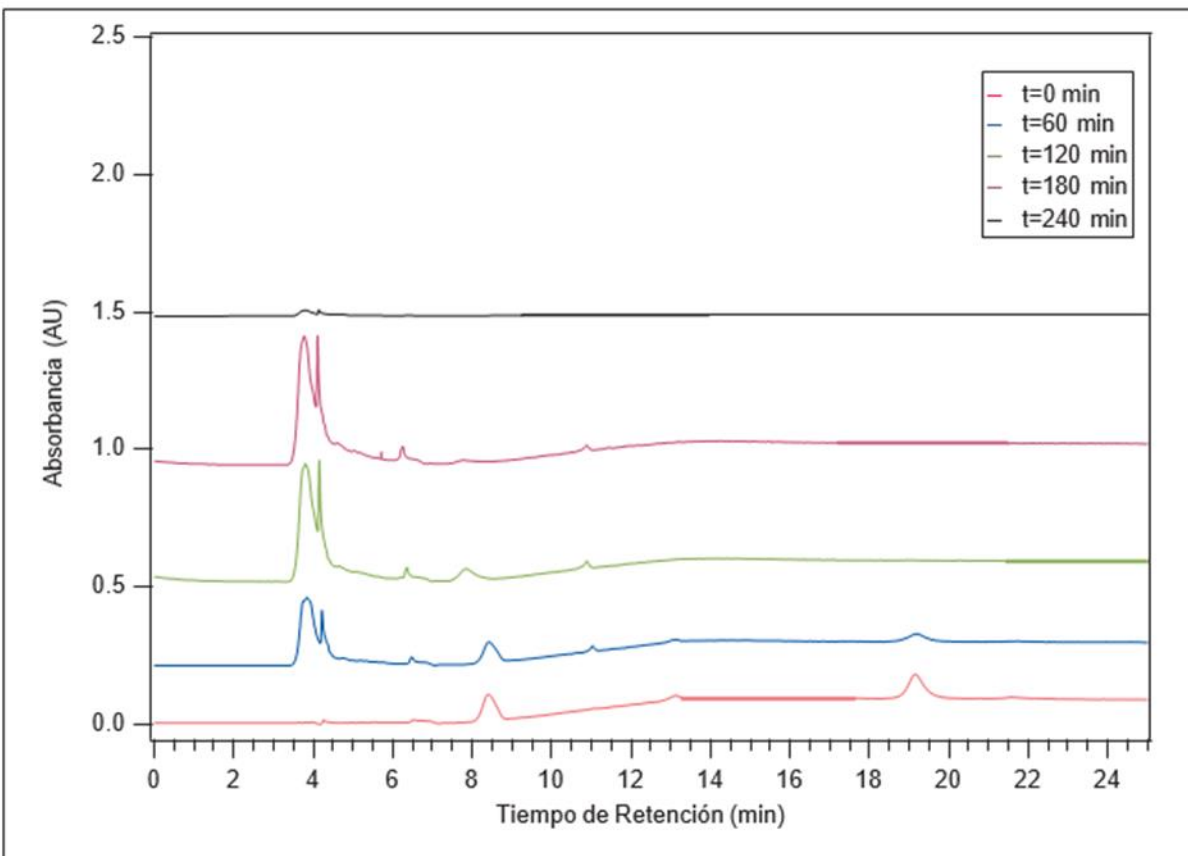
**Apéndice F**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 50ppm del foto- catalizador



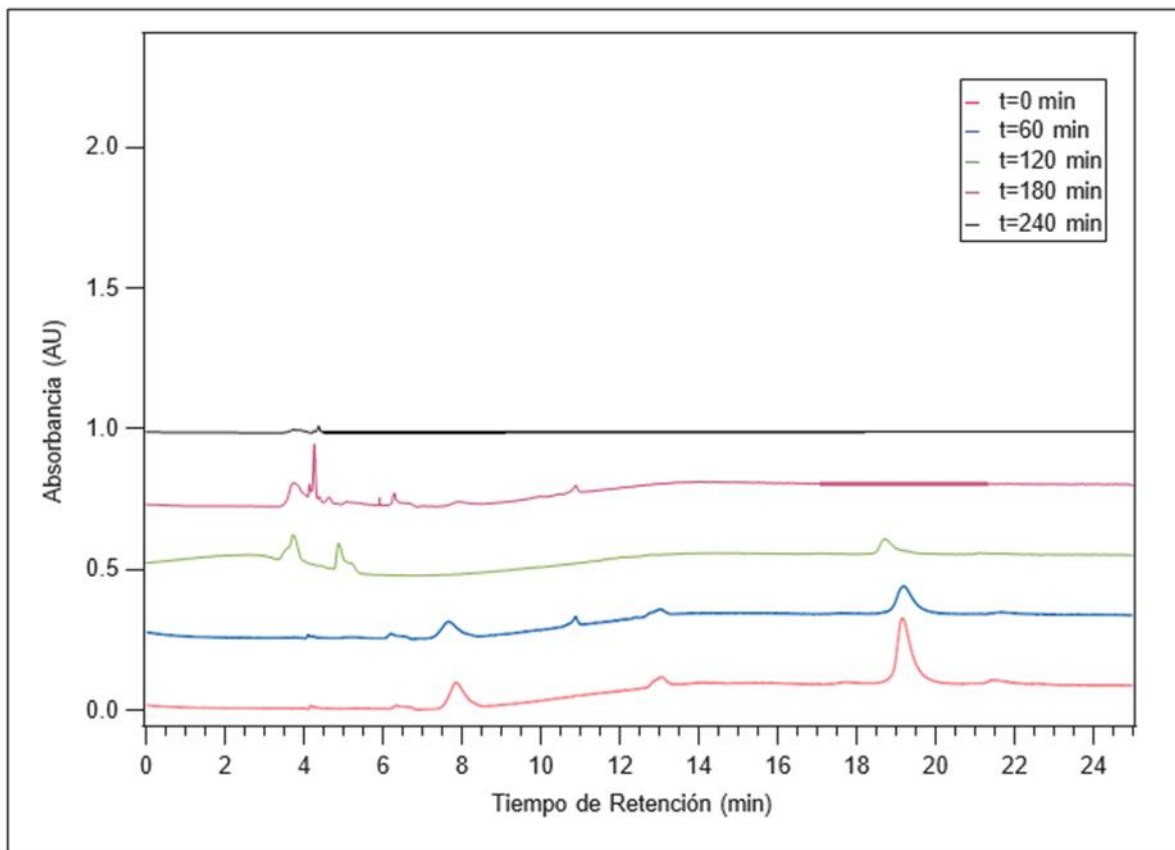
**Apéndice G**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 100ppm del foto- catalizador



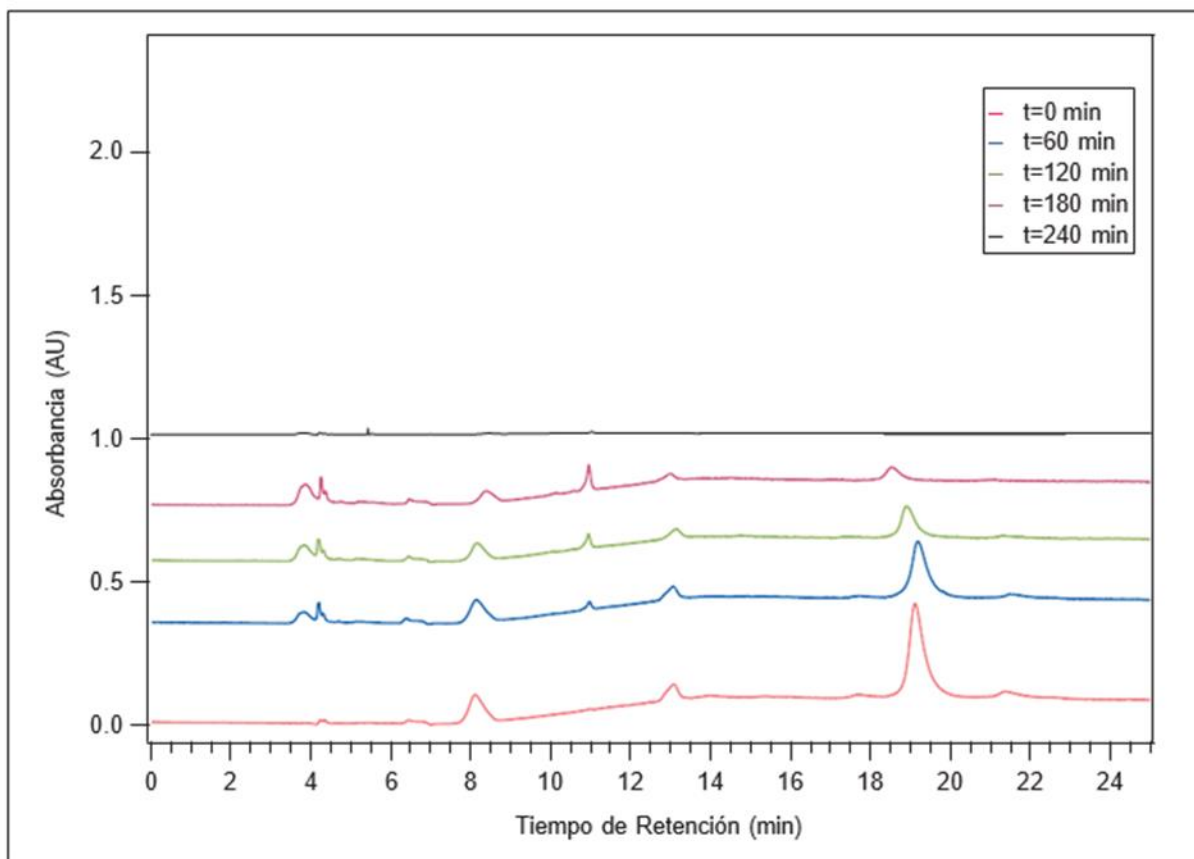
**Apéndice H**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 200ppm del foto- catalizador



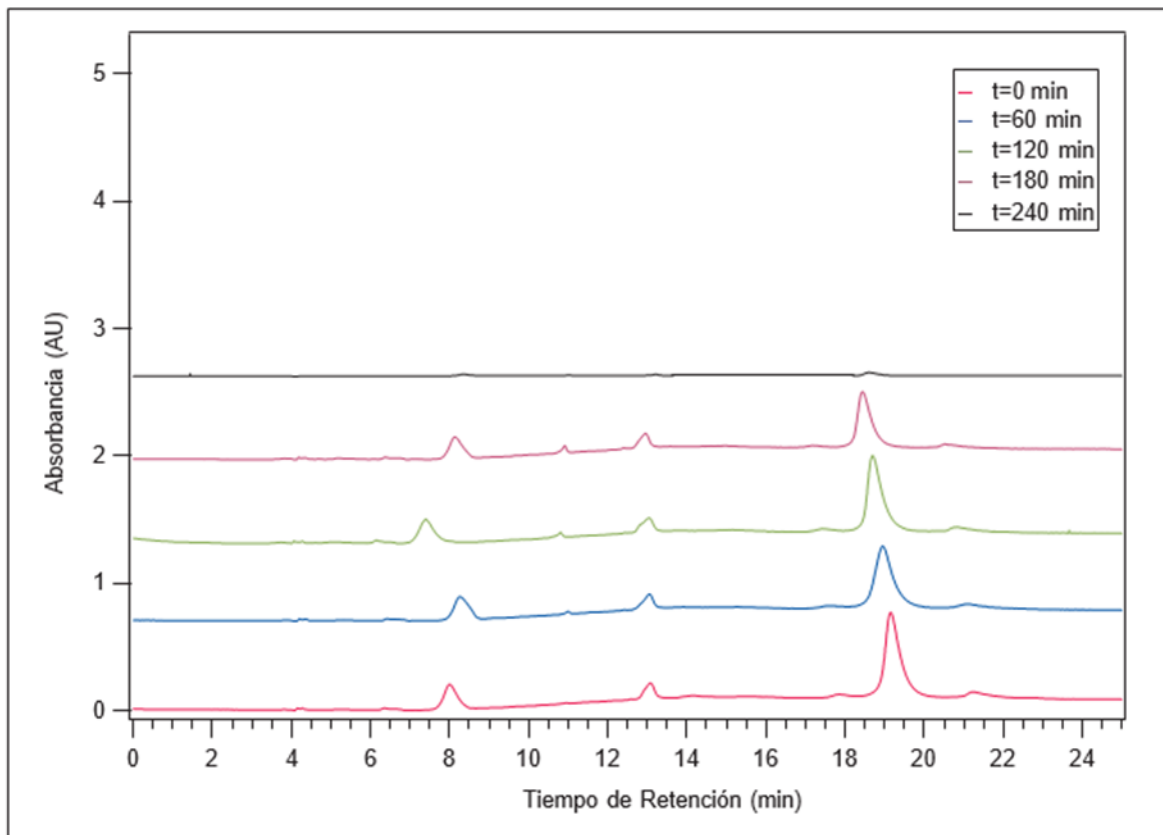
**Apéndice I**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 300ppm del foto- catalizador



**Apéndice J**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm y 700ppm del foto- catalizador



**Apéndice K**

Cromatogramas experimento 2 longitud de onda 410nm blanco sin foto- catalizador

