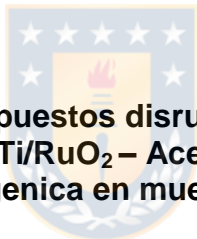


[Escriba texto]



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia
Programa de Doctorado en Ciencias y tecnología analítica.



Fotoelectrooxidación de compuestos disruptores endocrinos de origen esterooidal con electrodos de Ti/RuO₂ – Acero inoxidable y evaluación de actividad estrógenica en muestras sintéticas.

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

NAYSA AGNELI DIAZ SOLIS
CONCEPCIÓN-CHILE
2019

Profesor Guía: Carlos Peña Farfal
Dpto. de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

[Escriba texto]

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quiero expresar mi gratitud principalmente, a mi familia; padres y hermanos, ya que a través de su ejemplo me han enseñado que no hay imposibles para salir adelante, que el sufrimiento es parte del crecimiento y que a pesar de las dificultades siempre existe una luz de esperanza para no rendirse y salir adelante. A veces esa luz la encontramos en cosas simples de la vida, “yo” la encontré en mi pequeño Maximiliano, mi mayor motor de superación, así que agradezco a la vida y a Dios por concederme el privilegio de ser madre.

También agradezco a mis amigos del programa de doctorado que siempre estuvieron pendientes de mí y de mi avance, que como pudieron fueron capaces de prestar su ayuda, de verdad estoy realmente agradecida de ellos y también de las nuevas amistades que he hecho durante estos dos últimos años, gracias por sus consejos, por el ánimo, y por su tiempo.

Agradezco muy especialmente a mi profesor guía y evaluador externo “Carlos Peña y Javier Fernández” por el apoyo académico de tantos años, por ser fuentes de conocimiento, motivación y positivismo.

También doy gracias al departamento de análisis instrumental y a todos los académicos que contribuyeron con sus conocimientos a mi desarrollo como profesional y también al personal técnico que siempre me ofreció ayuda cuando la necesité.

Agradezco a CONICYT por el financiamiento de mis estudios de doctorado, “beca doctorado 2011” y por los fondos PAI otorgados por dos años, para el desarrollo de mi tesis con apoyo de la industria y también a la dirección de postgrado por los aportes financieros para asistencia a distintos eventos científicos.

[Escriba texto]

INDICE GENERAL

INDICE.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vi
ABSTRACT	x



INDICE

Contenido

CAPITULO 1	1
INTRODUCCION.....	1
1.1.- Introducción General.....	1
1.2.- Contaminantes emergentes.....	4
1.2.1.- Clasificación.....	5
1.3.- Introducción en el medio ambiente:.....	6
1.4.- Efectos.....	6
1.4.1.- Alteradores Endocrinos.....	7
1.4.2.- Incidencia en el medio.....	11
1.5.- Procesos de oxidación avanzada.....	11
1.6.- Foelectrocatalisis.....	14
1.6.1.- Fotocorriente y velocidad de reacción.....	15
1.7.- Electrólisis.....	16
1.7.1.- Fenómenos que tienen lugar en el electrolito.....	16
1.8.- Reactores fotoelectroquímicos.....	18
1.8.1.- Potencial aplicado y control de potencia.....	19
1.8.2.- Electrodo de trabajo o (ET).....	19
1.8.3.- Contraelectrodo (CE).....	20
1.8.4.- Compartimentos y separadores.....	20
1.8.5.- Iluminación.....	20
1.8.6.- Aplicaciones.....	21
1.9.- Referencias.....	22
CAPITULO 2	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
2.1.- Hipótesis general.....	28
2.2.- Objetivo general.....	28
2.2.1.- Objetivos específicos.....	28
CAPITULO 3	29
METODOLOGIA.....	29
3.1.- Reactor.....	29
3.2.- Puente salino.....	30
3.3.- Reacciones de electrooxidación y fotoelectrooxidación.....	30
3.3.1.- Medidas potencioestáticas.....	30
3.3.2.- Voltamperometría de barrido lineal.....	30
3.4.- HPLC – DAD.....	31
3.5.- Consideraciones generales del muestreo de aguas.....	32
3.5.1.- Consideraciones de almacenamiento y conservación de muestras.....	32

3.5.2.- Pretratamiento de muestras	33
3.6.- Carbono orgánico total (COT)	34
3.7.- Análisis en líneas celulares	34
3.8.- Validación y análisis estadístico	34
3.8.1.- Parámetros de validación	35
3.8.2.- Análisis multivariado	35
3.9.- Bibliografía	36
CAPITULO 4	38
EFFECT OF CHEMICAL AND PHYSICAL VARIABLES IN THE PHOTO-ELECTROCHEMICAL REMOVAL OF ESTRIOL (E3) AND 17 α -ETHINYLESTRADIOL (EE2) IN AQUEOUS SOLUTION.....	38
4.1.- Abstract	38
4.2.- Introduction	39
4.3.- Materials and methods	40
4.3.1.-Electrochemical measurements and photooxidations	41
4.3.2.- Analysis of Estriol and 17 α Ethynilestradiol by high resolution chromatography (HPLC).....	42
4.4.- Results and discussion.....	43
4.4.1.- Pulse and cyclic voltammetry	43
4.4.2.- Effect of light source	43
4.4.3.- Saline bridge configuration effect and solution volume	45
4.4.4.- Effect of the supporting electrolyte concentration	46
4.4.5.- Efecto de la variación de pH	47
4.4.6.- Efecto de la variación del potencial.	48
4.4.7. Effect of substrate variation concentration	49
4.5.- Conclusions	51
4.6.-Aknowledgmens.....	51
4.7.- References	52
CAPITULO 5	54
ELECTROXIDACIÓN, FOTOELECTROXIDACIÓN Y FOTOFENTON REACCION EN LA DEGRADACION DE ESTRIOL Y ETINILESTRADIOL CON ELECTRODOS DE Ti/RuO ₂ – ACERO INOXIDABLE Y EVALUACION DE ACTIVIDAD ESTROGENICA MEDIANTE ENSAYOS E-SCREEN.....	54
5.1.- Resumen.....	54
5.2.- Introducción	56
5.3.- Materiales y métodos	59
5.3.1.- Degradación de Estriol y Etinilestradiol	59
5.3.2.- Análisis multivariado	60
5.3.3.- Variables y rangos del diseño de experimentos	60
5.3.4.- Cultivo celular y ensayo de proliferación de la línea celular	61
5.4.- Resultados y discusión	62

5.4.1.- Polinomios de respuesta	64
5.4.2.- Polinomios de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación	64
5.4.3.- Polinomios de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Fotoelectrooxidación	65
5.4.4.- Polinomio de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Foto Fentón.....	66
5.4.5.- Validación estadística del método a través del análisis de varianza de Fisher .	68
5.4.6.- Óptimos de degradación.....	72
5.4.7.- Control del proceso.	73
5.4.7.1.- Determinación de carbono orgánico total	73
5.4.7.2.- Ensayos MCF7	74
5.5.- Conclusión.....	76
5.6.- Referencias	77
CAPITULO 6	79
EXTRACCIÓN DE ESTRIOL Y ETINILESTRADIOL CON RDSE Y DETERMINACIÓN EN AGUAS SERVIDAS.	79
6.1.- Resumen.....	79
6.2.- Introducción	800
6.3.- Experimental	82
6.3.1.- Microextracción en disco rotatorio (RDSE)	83
6.3.3.- Recolección y tratamiento de muestras de aguas servidas.....	83
6.3.4.- Validación del método	83
6.4.- Resultados y discusión	84
6.4.1.- Parámetros de validación.	85
6.4.2.- Estudio de las mejores condiciones para la extracción de Estriol y Etinilestradiol por RDSE.....	86
6.4.3.- Extracción de 17- α etinilestradiol y estriol en aguas residuales	87
6.4.4.- Determinación de la concentración de analitos en aguas residuales.	87
6.5.- Conclusión.....	89
6.6.- Referencias	90
CONCLUSION GENERAL.....	92

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Disruptores endocrinos.....	9
Tabla 2 Hormonas esteroides	10
Tabla 3 Clasificación de los diferentes POAs utilizados para la eliminación de contaminantes (Tomado de: Díaz 2008).....	12
Tabla 3.4: Parámetros a considerar para cada tipo de ensayo	35
Tabla 5.1 Rangos de trabajo procesos de Electrooxidación y Fotoelectrooxidación	60
Tabla 5.2 Rangos de trabajo proceso Foto Fenton	61
Tabla 5.3: Diseño factorial de la degradación de Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación y Fotoelectrooxidación, los valores codificados para cada variable son mostrados en paréntesis. El factor de respuesta Y es definido como el porcentaje de degradación de E3y EE2 a los 60 minutos de reacción bajo condiciones de electrooxidación (Y_E) y Fotoelectrooxidación (Y_{EF}).	63
Tabla 5.4 Diseño factorial de la degradación de Estriol y Etinilestradiol por Foto Fenton, los valores codificados para cada variable son mostrados en paréntesis. El factor de respuesta Y es definido como el porcentaje de degradación de E3y EE2 a los 60 minutos de reacción bajo condiciones Foto Fenton (Y_{PF}).....	63
Tabla 4.5 Anova para Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación.....	69
Tabla 4.6 Anova para Estriol y Etinilestradiol por Fotoelectrooxidación	69
Tabla 4. 9 Anova para Estriol y Etinilestradiol por Foto Fentón	70
Tabla 6.1 Parámetros cromatograficos para la separación de compuestos disruptores endocrinos en columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, 5 μ m).....	84
Tabla 6.2 Parámetros de validación para CDE por HPLC-UV	85
Tabla 6.3 Porcentajes de recuperación (%) de analitos en diferentes fases sorbentes, determinados por HPLC-UV-DAD.	86
Tabla 6.4 Porcentaje de recuperación de 17- α etinilestradiol en aguas residuales después del tratamiento secundario, con las técnicas de extracción RDSE y SPE	87
Tabla 6 6 Concentración de analitos en aguas residuales.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema proceso general de degradación de compuestos aromáticos.	18
Figura 3.1: Esquema sistema reactor en presencia de luz UV de 125 W	30
Figura 4.1: Chemical structure of 17 α -Ethinylestradiol (A) and Estriol (B).....	42
Figura 4.2 Cyclic (A) and pulse (B) voltamperogram of 200 mg L ⁻¹ E3, 0.1 M Na ₂ SO ₄	43
Figura 4.3 Effect of Light, on the degradation of 500 μ g L ⁻¹ de E3 (A) and EE2 (B), with UV lamp 20 W. (■), mixed lamp. 260 W (●), mercury lamp 125 W (▲), UV lamp 125 W (▼), electrolysis (◄) at 0.1 M Na ₂ SO ₄ , pH 6, 0.8 V.....	45
Figura 4.4 Effect of saline bridge length on the removal of 500 μ g L ⁻¹ of E3 (A) and EE2 (B) with S.B.1 (■) and S.B.2 (●) at 0.8 V, 0.1 M of Na ₂ SO ₄ , pH 6.	46
Figura 4.5 Effect of the volume of the solution to be treated in the removal of 500 μ g L ⁻¹ de E3 (A) and EE2 (B) with 90 mL (■), 250 mL (●) solution, at 0,8 V, 0,1 M of Na ₂ SO ₄ , pH 6.	46
Figura 4.6 Effect of the variation of concentration of the supporting electrolyte (Na ₂ SO ₄) in the removal of 500 μ g L ⁻¹ of E3 (A) and EE2 (B) with 0,1 M (■), 0,25 M (●), 0,5 M (▲) Na ₂ SO ₄ at 0.8 V, pH 6.	47
Figura 4.7 Effect of pH variation on the removal of 500 μ g L ⁻¹ of E3 (A) and EE2 (B) at pH 3 (■), pH 10(●), pH 6(▲), with 0.8 V and 0.1 M Na ₂ SO ₄	48
Figura 4.8 Effect of variation of potential on the removal of 500 ug L ⁻¹ de E3 (A) at 0,8 V (■), 3 V (●) and 10 V (▼) and EE2 (B) at 0,8 V (■), 3V (●), 6 V (▲) and 10 V (▼) at 0,1 M Na ₂ SO ₄ , pH 6.	49
Figura 4.9. Effect of the concentration variation of E3 (A) and EE2 (B) at 500 ug L ⁻¹ (■), 750 ug L ⁻¹ (●), 1000 ug L ⁻¹ (▲) with 0.8 V, 0.1 M Na ₂ SO ₄ , at pH 6.....	50
Figura 5.1 Coeficientes para la degradación de Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Electrooxidación.....	64
Figura 5.2 Coeficientes para la degradación de Estriol por Fotoelectrooxidación.....	65
Figura 5.3 Coeficientes para la remoción de Etinilestradiol por Fotoelectrooxidación.....	66
Figura 5.4 Coeficientes para la remoción de Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Foto Fenton.....	67
Figura 5.5 Superficie de respuesta para Estriol(A) y Etinilestradiol(B) por Electrooxidación a los 60 minutos de reacción.	71
Figura 5.6 Superficie de respuesta para Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Fotoelectrooxidación a los 60 minutos de reacción.....	71
Figura 5.7 Superficie de respuesta para Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Foto Fenton a los 60 minutos de reacción.	72
Figura 5.8 Cinéticas de degradación de 500 ug L ⁻¹ de E3 (A) y EE2 (B) por Electrooxidación (■), Fotoelectrooxidación (●) y Foto Fenton (▲), durante 90 minutos de reacción.....	73
Figura 5.9 Cinética de degradación de COT para Estriol y Etinilestradiol, por proceso de Electrooxidación (■), Fotoelectrooxidación (●) y Foto Fenton Foto Fenton (▲).	74
Figura 6.0 Registro visual de ensayo MCF7, para el tratamiento de Estriol y Etinilestradiol por Fotoelectrooxidación.....	75
Figura 6.1 Efecto proliferativo a distintos tiempos de tratamiento de Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación y Fotoelectrooxidación (500 ug L ⁻¹).	75

RESUMEN

Para lograr la mejor degradación foto y electroquímica de Estriol (E3) y Etinilestradiol (EE2) utilizando electrodo Ti/RuO₂-Acero inoxidable, fue necesario realizar estudios preliminares, donde se evaluaron de forma univariada el efecto del pH; concentración de sustrato y electrolito soporte, potencial, configuración de puente salino, volumen de reactor, fuente de Luz, logrando buenos resultados a concentraciones de 500 µg L⁻¹ de sustrato, volúmenes de 90 mL de solución, puente salino de 30 cm de longitud, voltajes entre 0,8 -3 A, concentración de Na₂SO₄ de 0,1 M, pH entre 6 -10, lámpara UV 125 W. Seguido a los estudios preliminares, se seleccionaron las variables; concentración de Na₂SO₄ (0,05-2,5 M), Voltaje (0,6-3) y pH (4-10), para realizar optimizaciones mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Las condiciones óptimas encontradas para la degradación de 500 µg L⁻¹ de solución de E3 y EE2, fueron: pH 10, concentración Na₂SO₄ 0,05 M/0,1353 M, voltaje 1,6/1,5 A, obteniendo degradaciones de 47-64 % (E3/EE2) por Electrooxidación, 85-95% (E3/EE2) por Fotoelectrooxidación, con mineralizaciones de un 29 % (Electrooxidación) y 84% (Fotoelectrooxidación).

Además, se realizaron pruebas post tratamiento que dieron cuenta de la efectividad del tratamiento aplicado (E-Screen), los cuales mostraron casi nula estrogenicidad a los 180 minutos de reacción por Fotoelectrooxidación a diferencia de Electrooxidación donde la actividad estrogenica es predominante hasta finales de la reacción.

Los resultados obtenidos por los procesos electroquímicos fueron comparados con el tratamiento Foto Fenton, el cual al igual que los anteriores fue optimizado para la degradación de E3 y EE2, logrando las mejores condiciones de degradación a una concentración de 4-5 mg L⁻¹ de H₂O₂ y Fe (II), con degradaciones de 82-90 % (E3/EE2) y mineralizaciones de un 31%.

Por último, se evaluó la extracción de los analitos por Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE), desde aguas servidas, logrando los mejores resultados bajo las siguientes condiciones: 100 mg de fase HLB, un volumen de 100 mL de muestra, velocidad

[Escriba texto]

de rotación para el disco de 3000 rpm, tiempo de extracción y desorción superiores a una hora. Bajo estas condiciones se obtuvieron recuperaciones superiores al 87 %, con coeficientes de variación inferiores al 10%. Los límites de detección de estas hormonas en HPLC-DAD fueron de $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$ para Estriol y de $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para Etinilestradiol. La determinación y cuantificación de hormonas en aguas servidas arrojo como resultado la presencia de Estriol y 17α - Etinilestradiol a concentraciones de $103\text{-}75 \mu\text{g L}^{-1}$ en afluente, y concentraciones de $0,56\text{-}0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas provenientes del tratamiento secundario, por lo que se justifica el presente estudio.



ABSTRACT

To achieve the best photo and electrochemical degradation of Estriol (E3) and Ethinylestradiol (EE2) using Ti / RuO₂-Stainless steel electrode, it was necessary to carry out preliminary studies, where was evaluated in an univariate way the effect of pH; substrate concentration and electrolyte support, potential, configuration of saline bridge, volume of reactor, light source, achieving good results to concentrations of 500 µg L⁻¹ of substrate, 90 mL volumes of solution, saline bridge of 30 cm long , voltages between 0.8 -3 A, Na₂SO₄ concentration of 0.1 M, pH between 6 -10, UV lamp 125 W. Following to the preliminary studies, the variables were selected; concentration of Na₂SO₄ (0.05-2.5 M), Voltage (0.6-3) and pH (4-10), to perform optimizations through response of the surface methodology (MSR). The optimal conditions found to the degradation of 500 µg L⁻¹ of solution of E3 and EE2, were: pH 10, concentration Na₂SO₄ 0.05 M / 0.1353 M, voltage 1.6 / 1.5 A, obtaining degradations of 47- 64% (E3 / EE2) by Electrooxidation, 85-95% (E3 / EE2) by Photoelectrooxidation, with mineralization of 29% (Electrooxidation) and 84% (Photoelectrooxidation).

In addition, post-treatment tests were performed that showed the effectiveness of the applied treatment (E-Screen), which showed almost no oestrogenicity at 180 minutes of reaction by photoelectrooxidation, unlike electro-oxidation where estrogen activity is predominant until the end of the reaction.

The results obtained by the electrochemical processes were compared with the Photo Fenton treatment, which like the previous ones was optimized to the degradation of E3 and EE2, achieving the best conditions of degradation at a concentration of 4-5 mg L⁻¹ of H₂O₂ and Fe (II), with degradations of 82-90% (E3 / EE2) and mineralizations of 31%.

Finally, the extraction of the analytes was evaluated by microextraction by rotary disc sorption (RDSE), from sewage, achieving the best results under the following conditions: 100 mg of HLB phase, a volume of 100 mL of sample, rotation speed to the disc 3000 rpm, extraction and desorption time exceeding one hour. Under these conditions recoveries higher than 87% were obtained, with coefficients of variation less than 10%. The limits of

[Escriba texto]

detection to these hormones in HPLC-UV DAD were $1.6 \mu\text{g L}^{-1}$ to Estriol and $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ for Ethinylestradiol. The determination and quantification of hormones in sewage reveal the result of Estroil presence and 17α -Ethinylestradiol at concentrations of $103\text{-}75 \mu\text{g L}^{-1}$ in influent, and concentrations of $0.56\text{-}0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in waters from secondary treatment, so the present study is justified.



CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1.- Introducción General

Actualmente más de siete mil millones de personas existentes en el mundo están explotando colectivamente los recursos naturales, de tal forma que la capacidad de los sistemas para absorber residuos y neutralizar los efectos adversos sobre el medio ambiente se ve sobrepasada. Residuos provenientes de las actividades humanas, han llegado, literalmente hasta el último rincón de la tierra y se estima que para el año 2025, las ciudades del mundo producirán 2200 millones de toneladas de residuos al año, más de tres veces la cantidad producida en el 2009 (UN Environment). La introducción de estos compuestos, cómo es de esperar genera impactos en las distintas matrices ambientales, afectando la calidad de vida del hombre y de los organismos (acuáticos, terrestres y aéreos), poniendo en peligro el presente y el futuro de las nuevas generaciones., es así como las preocupaciones ambientales se han globalizado lo que ha llevado a trabajar en conjunto científicos y gobiernos para enfrentar el reto de una manera sostenible y colaborativa, sobre todo en función, del uso del agua “recurso vital para la vida”, para el desarrollo de actividades industriales, recreativas y de consumo, siendo un reto a nivel mundial, contar con aguas no contaminadas, aprovechables para diversos usos. (Doménech *et al.*, 2001), por lo tanto, es necesario contar con planes más exhaustivos que permitan la monitorización global química, física y biológica del agua, la monitorización de la distribución, transporte y transformación de contaminantes, despertar el interés por la mejora y creación de nuevos tratamientos que garanticen la calidad necesaria según el uso futuro.

El último informe de perspectivas del medio ambiente mundial 5 (GEO 5): Medio ambiente para el futuro que queremos, publicado por el programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) en el 2012, señala que se han alcanzado logros considerables en la reducción de algunos contaminantes desde el año 1992, considerando indicadores relacionados con la calidad del agua; como la disminución de la concentración de metales, nutrientes, coliformes fecales, niveles de desechos en las franjas marinas, fondos y en

corrientes, concentraciones de compuestos organoclorados. En general se avanza en cuanto a información, seguimiento y control de estos indicadores, asimismo en el tratamiento de las aguas municipales e industriales, pero aún se requiere una mejor vigilancia regulatoria, inversión en infraestructura y creación de capacidades, especialmente en los países en vías de desarrollo.

El agua dulce es un tema prioritario según todas las consultas hechas por GEO5-PNUMA, y las regiones participantes reconocen que el párrafo 26c del plan de aplicación de Johannesburgo constituye el objetivo más importante en torno al agua dulce, éste indica fomentar una utilización más eficiente de los recursos hídricos y promover su distribución entre sus diversos usos de modo que se dé prioridad a la satisfacción de las necesidades humanas básicas y se encuentre un equilibrio entre la necesidad de preservar o restaurar los ecosistemas y sus funciones, en particular en los entornos frágiles y las necesidades domésticas, industriales y agrícolas de las poblaciones incluso la de preservar la calidad del agua potable.

Chile no es ajeno a la problemática del agua, desde hace más de 7 años en la zona norte y centro del país existe escases de agua, evidenciando el claro efecto del cambio climático, de la sobreexplotación de aguas superficiales y subterráneas, falta de eficiencia en su uso y aumento de la contaminación. En respuesta a la condición antes mencionada, el país registra avances en relación con la protección y conservación del medio ambiente, comenzando a manejar los recursos hídricos de forma más integral y esto se ve reflejado en el aumento de cobertura en la normativa asociada a la calidad de agua y mejora del monitoreo de los recursos hídricos, esto se trabaja bajo las recomendaciones de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe, CEPAL (<https://www.cepal.org/es>) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, OCDE (<http://www.oecd.org/>), ambas dependientes de las Naciones Unidas (ONU), estas instituciones engloban la realización de varios proyectos con el fin de constituir una política medioambiental en Latino América y el Caribe, la cual permita la competencia con otros mercados internacionales y un desarrollo sostenible. <http://sinia.mma.gob.cl/temas-ambientales/agua/>.

Uno de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible, ODS, para el año 2030 es “Agua limpia y saneamiento”, mediante el cual se busca “Garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos”. En cuanto a la contaminación y explotación, la Política Nacional para los Recursos Hídricos Chilenos (Ministerio del Interior y Seguridad Pública, 2015) plantea el uso racional y sustentable, privilegiando en primer lugar el consumo humano, para lo cual define el diseño e implementación de acciones orientadas a prevenir los problemas asociados a la sequía. Asimismo, propone realizar modificaciones al ordenamiento jurídico, a fin de lograr una mejor gestión en los recursos hídricos. En el marco de las acciones en materia de cambio climático, además se está desarrollando el Plan de Adaptación para los Recursos Hídricos, orientado a alcanzar una gestión sustentable, mejorar la institucionalidad en este tema, así como a desarrollar una educación que promueva la conservación del agua, entre otros aspectos. Asimismo, se continúan realizando los Programas de Medición y Control de la Calidad Ambiental, destinados a caracterizar y controlar el cumplimiento de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental y el estado ecológico de los recursos hídricos.

Para abordar integralmente el tema hídrico, con un enfoque preventivo, se requiere contar con datos sistemáticos del estado de los recursos hídricos. Si bien se sigue trabajando en fortalecer sistemas y herramientas para alcanzar este objetivo, se requiere seguir potenciando esta línea de gestión (Ver reporte estado del medio ambiente 2016).

Con todos los avances en gestión de los recursos hídricos, monitoreo y tratamientos de aguas en América, aún es carente el conocimiento, control y tratamiento de contaminantes “nuevos” los denominados contaminantes emergentes, que se mencionaran en el siguiente ítem detalladamente, con el fin de abordar una problemática poco controlada, que es tema actualmente de investigación y debate científico.

1.2.- Contaminantes emergentes

Entre los contaminantes emergentes se encuentran los fármacos y compuestos de higiene personal (PPCPs) (Loos R., 2003, Petrović M., 2003), estos compuestos aún no han sido regulados, pero son futuros candidatos para su posterior regulación, dependiendo de sus efectos potenciales sobre la salud y el medio ambiente y de la monitorización de datos concerniente a su incidencia. Esto último es de especial importancia ya que su presencia continuada en campañas de análisis medioambiental es indicadora de la necesidad de regular su vertido y/o su utilización, ya que no precisan ser persistentes en el medio ambiente para ejercer efectos negativos, debido a que su continua descarga, compensa la eliminación y transformación de los mismos (Barceló D *et al.*, 2003).

Estudios han demostrado en la mayoría de los casos, que la toxicidad de estos compuestos es baja, sin embargo, pueden ser precursores de otras especies, considerados contaminantes prioritarios, como por ejemplo las dibenzo-p-dioxinas policloradas o sustancias cloradas aromáticas (Hell K., 2000, Tixier C., 2002). Además, su presencia constante en el medio ambiente ha provocado el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a dichos agentes, afectando el tratamiento secundario del agua y retornando a las redes de agua potable al solo ser eliminados parcialmente por estas (Quinn *et al.*, 2007; Reemtsma *et al.*, 2006; Hernando *et al.*, 2006; Joss *et al.*, 2005).

Con todos los esfuerzos, aún es carente el conocimiento de los efectos ambientales de la mayoría de los microcontaminantes del grupo de los contaminantes emergentes y en la mayoría de los casos no se tiene claro la concentración mínima a la cual estos contaminantes pueden producir efectos adversos en la biota acuática y terrestre o bien si la toxicidad de una mezcla compleja puede ser totalmente diferente a la de un compuesto individual, observándose efectos sinérgicos que potencian el efecto tóxico (Ternes *et al.*, 2004, Altenburger *et al.*, 2004).

La situación en Europa es similar a la que se presenta en los Estados Unidos. Hace algunas décadas se han monitoreado compuestos orgánicos en aguas, incluyendo fármacos, antioxidantes, fitoesteroides, biocidas, retardantes de llama, hormonas, entre otros

compuestos y se han detectado la presencia de varios de los compuestos monitorizados (Kolpin *et al.*, 2002). Metcalfe y colaboradores en su publicación remarcan la presencia y procedencia de contaminantes orgánicos como los fármacos y productos para el cuidado personal (PPCPs). Se ha concluido que varios de los compuestos monitorizado se han integrado en el ciclo del agua, específicamente en el agua potable para consumo humano (Metcalfe *et al.*, 2003).

1.2.1.- Clasificación.

Los contaminantes emergentes se pueden clasificar atendiendo a distintos parámetros, si bien la clasificación más aceptada es la que se realiza en función de sus usos y que se detalla a continuación (Barceló., 2003).

I Fármacos:

- 1.- Antibióticos para uso médico y veterinario: Ej. Eritromicina, lincomicina, sulfonamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol.
- 2.- Analgésicos y anti-inflamatorios: Ej. Paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno.
- 3.- Fármacos psiquiátricos: Los más frecuentes son las Benzodiazepinas (diazepam)
- 4.- Antiepilépticos: El más común es la carbamazepina.
- 5.- Reguladores de grasas: Fibratos (derivados del ácido fíbrico) y estatinas, ej. bezafibrato.
- 6.- Antineoplásicos: Ej. bisulfan, ciclofosfamidias.
- 7.- Betabloqueantes: Los más utilizados son el atenolol, propanolol, metoprolol.
- 8.- Antiulcerosos y antihistamínicos. Se emplean contra la acidez de estómago, úlceras y alergias.

II Esteroides y hormonas: Ej. Estradiol, estrona, estriol. 17-B etileneestradiol.

III Productos de cuidado personal:

Perfumes, cremas, por ej. Benzofenona, parabenos.

Repelentes de insectos: Ej. N, N- dietiltoluamida.

Antisépticos: Ej. Triclosan, clorofenol.

IV Surfactantes y metabolitos de surfactantes: Ej. Alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), alquilfenoles carboxilados.

V Compuestos ignífugos: Ej. Bisfenol A, tris 2- cloroetilfosfato.

VI Agentes y aditivos industriales: Ej. EDTA, sulfonatos aromáticos.

VII Aditivos de gasolinas: Dialquil éteres, metil-terc-butil-éter (MTBE).

VIII. Agentes desinfectantes: Bromoácidos, bromoaldehídos, bromoacetnitrilos.

1.3.- Introducción en el medio ambiente:

La presencia de contaminantes emergentes en el ambiente depende en gran parte de los volúmenes de producción y de los hábitos de consumo. Las fuentes principales de liberación al medio proceden de las aplicaciones humanas, veterinarias e industriales.

- Descargas de aguas residuales (tratadas y no tratadas) en ríos y mares.
- Fármacos excretados sin metabolizar.
- Jabones, desinfectantes, perfumes que se vierten directamente a los ríos y mares.
- Empleo de aerosoles y otros preparados en actividades cotidianas de aseo y limpieza del hogar.

Se ha demostrado que al hacer un balance de los fármacos que entran y salen de las plantas de tratamiento de aguas residuales, se revela que muchos no son eliminados durante el tratamiento (Andreozzi *et al.*, 2003, Ferrer *et al.*, 2003 y Ternes *et al.*, 2002).

1.4.- Efectos

Diversos estudios han demostrado que algunos compuestos son capaces de producir malformaciones (Darbre *et al.*, 2004) de los órganos sexuales en animales, cambio de sexo en los peces (Lange *et al.*, 2001) y han puesto ya de manifiesto la relación del descenso de fertilidad humana y ciertos tipos de cáncer. A continuación, se detallan los compuestos que actúan como alteradores endocrinos.

1.4.1.- Disruptores Endocrinos.

En el cuerpo hay dos tipos de glándulas: exocrinas y endocrinas. Las glándulas endocrinas producen hormonas y las vierten en la sangre. La sangre las transporta hasta su órgano objetivo, donde ejercen su influencia.

Un alterador endocrino se define como una sustancia o una mezcla exógena que altera la(s) función(es) del sistema endocrino y que por consiguiente perjudica la forma de vida de un individuo, de su descendencia o de poblaciones enteras (Summerfield y Cooper., 2001, Zha *et al.*, 2008). Además de esto, los alteradores endocrinos también son contaminantes ambientales y pueden actuar sobre el equilibrio hormonal de los seres vivos a distintos niveles (Damstra y col., 2003):

- Mimetizar la acción de las hormonas (dentro del organismo actúan como si fueran una hormona real).
- Antagonizar la acción de las hormonas (modificando la acción de la hormona).
- Alterar el patrón de síntesis y metabolismo hormonal.
- Modular los niveles de los receptores correspondientes.

Entre los compuestos que pueden producir efectos endocrinos, se incluyen pesticidas, productos químicos industriales, productos farmacéuticos, estrógenos (estradiol) y fitoquímicos. Estos productos químicos se distribuyen extensamente en el ambiente y pueden presentar efectos miméticos o antagónicos en las funciones biológicas de las hormonas naturales. Las interacciones de compuestos con la respectiva hormona receptora, han servido para explicar la mayoría de las acciones de disrupción endocrina. Además, estos productos pueden alterar el desarrollo reproductivo en mamíferos. (Kitamura *et al.*, 2005, Summerfield y Cooper., 2001; Zha *et al.*, 2008).

Estos compuestos provocan efectos como la disminución de la cuenta y calidad de espermatozoides en el hombre, el aumento del cáncer de mama en las mujeres, cáncer testicular y de próstata (Larsson *et al.*, 1999, Hansen *et al.*, 1998, Brotons *et al.*, 1995), endometriosis, efectos sobre el tiroides y pubertad adelantada (Sun *et al.*, 2010, Pombo y

Castro., 2005, Colborn *et al.*, 1993, Bolonga *et al.*, 2009, Stuart *et al.*, 2012, González *et al.*, 2012). Lo anterior es provocado por ingesta de estos compuestos a través de la comida y la bebida (Purdom *et al.*, 1994, Hansen *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que los estrógenos pueden afectar a varios organismos acuáticos en aguas naturales (Sumpter y Johnson., 2005) y diversos estudios evidencian la relación que existe entre exposición a compuestos disruptores endocrinos y alteraciones del desarrollo reproductivos en estos organismos (Segner *et al.*, 2003). Tales alteraciones pueden ser reflejadas de distintas formas como por ejemplo: inhibición del desarrollo, la intersexualidad, la feminización y el comportamiento territorial inusual reportados en peces (Bell *et al.*, 2001) y son considerados como una de las más graves amenazas antropogénicas a la diversidad biológica de los ecosistemas (Jenssen., 2006, Johnson, A., 2004, Diamanti - Kandarakis *et al.*, 2009) provocando daños incluso a bajas concentraciones (Pedrouzo *et al.*, 2009, Sumpter y Johnson., 2009). Esa pequeña cantidad de masa es suficiente para contaminar y alterar el sistema endocrino de la fauna acuática (Arikan., 2008). Otra de las preocupaciones es la manifestación a largo plazo de efectos quizás imperceptibles que se pueden desencadenar tras un periodo de acumulación llevando tal vez a grandes cambios en el medio, que inicialmente pueden ser atribuidos a cambios naturales, de adaptación o de sucesión ecológica, pasando desapercibidos.

Los disruptores endocrinos (EDCs) activos más potentes presentes en el entorno, pertenecen a la clase química de los esteroides, que son formados naturalmente por los seres humanos y la vida silvestre o producidos sintéticamente.

Las hormonas esteroides que están presentes en la biosíntesis del cuerpo se denominan hormonas endógenas y las hormonas exógenas son esteroides o compuestos extraños, producidos ya sea natural o sintéticamente.

Además, pueden ser clasificados por su estructura química y sus efectos farmacológicos (estrógenos, gestágenos y andrógenos). (Jobling y Sumpter., 1993, Díaz-Cruz *et al.*, 2009).

Tabla 1: Disruptores endocrinos

Estrógenos	Andrógenos	Progestágenos
E1,E2,E3,EE2 (Esqueleto C18)	TT (Esqueleto C19)	LEVO, NORE, P (Esqueleto C21)

Estrona (E1) estradiol (E2), estriol (E3), etinil estradiol (EE2), testosterona (TT), levonorgestrel (LEVO), norgestrel (NORE), progesterona (Pg).

En cuanto a la estructura química, los esteroides se componen de un esqueleto de tres anillos de carbono ciclohexal y uno anillo de carbono pentagonal, que generalmente están dispuestos en una estructura 6-6-6-5 a la que diversos grupos funcionales y cadenas laterales están unidos. Todos los esteroides se pueden derivar a partir del colesterol.

La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de las hormonas esteroides y su compuesto original, el colesterol. Los tres principales estrógenos naturales, estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3), son esteroides C₁₈ que difieren en el estado de oxidación de sus anillos.

Estos esteroides C₁₈ estimulan el desarrollo del sistema reproductor femenino dando las estructuras y características sexuales secundarias.

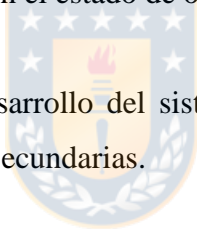
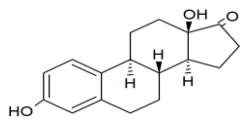
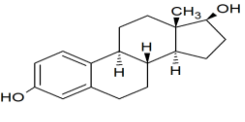
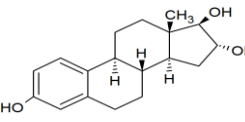
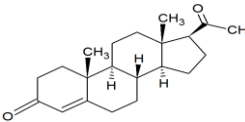
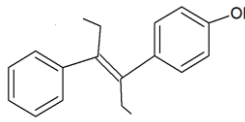
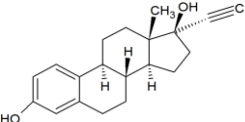


Tabla 2 Hormonas esteroides

Nombre	Nombre	Sintético o natural(S)(N)	Grupo	Pka Kow	Formula	Estructura
Estrona (E1)	Estra 1,3,5 (10) - trien-17-one	N	C ₁₈	10,77 3,4	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	
Estradiol (E2)	Estra 1,3,5 (10) - trien-3,17 diol	N	C ₁₈	10,08 4,0	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
Estriol (E3)	(16-α,17-β)-estra- 1,3,5 (10) - triene-3,16,17-triol	N	C ₁₈	10,4 2,4	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	
Progesterona (P)	Pregn -4-ene-3,20-diona	N	C ₂₁	Na 3,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
Dietilbestrol (DES)	Trans 3,4-bis(p-hidroxifenil)-3-hexeno	S	C ₁₈		C ₁₈ H ₂₀ O	
Etinilestradiol (EE2)	19-norpregna-1,3,5(10)-triene-20-yn-3,17-diol	S	C ₁₈	10.4 3.7	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	

Los Gestágenos, también llamados progestágenos, se derivan del pregnano - C₂₁ de esteroides tales como la progesterona (P) y los andrógenos son esteroides C₁₉ que estimulan o controlan el desarrollo de las características masculinas (testosterona (T) (Aufartová *et al.*, 2010)

1.4.2.- Incidencia en el medio

La gran mayoría de los disruptores endocrinos terminan en las aguas residuales. El estradiol, por ejemplo, se consume a través de los anticonceptivos, se expulsa del organismo por la orina, así que acaba por contaminar el agua y llega a las aguas residuales. Por ello, es lógico que las aguas residuales contengan cantidades importantes de disruptores endocrinos. Aunque sólo sean algunos nanogramos por litro, esa pequeña cantidad de masa es suficiente para contaminar y alterar el sistema endocrino de la fauna acuática (Arikan., 2008). Otra de las razones por la cual podemos encontrar disruptores endocrinos en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Arditsoglou y Voutsas *et al.*, 2008, Ternes., 1998), es debido a que los procesos de tratamiento convencionales no son capaces de eliminarlos (Moreira *et al.*, 2009; Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2009) y los procesos avanzados tales como la oxidación fotoquímica, nanofiltración, osmosis inversa, biorreactores de membrana todavía se están evaluando a nivel mundial (Lee *et al.*, 2008; Bolong *et al.*, 2009).



1.5.- Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POA) permiten ya sea, destruir completamente los contaminantes orgánicos, mineralizándolos, a través de reacciones de oxidación hasta convertirlos en CO₂ y H₂O o producir compuestos menos tóxicos que los compuestos originales. Estos procesos se han venido desarrollando a través de la última década y han probado ser efectivos en la destrucción de muchos contaminantes orgánicos (Pavas *et al.*, 2003).

La búsqueda de Tecnologías Limpias para el tratamiento de los residuos de los procesos industriales contribuye al desarrollo de los procesos de oxidación avanzada, los cuales son capaces de degradar estos contaminantes a sustancias que son inocuas para el medio ambiente, por lo que constituyen uno de los futuros recursos tecnológicos para el tratamiento de efluentes líquidos y gaseosos (Pavas *et al.*, 2003).

Los POAs se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de los contaminantes. El concepto fue establecido inicialmente por Glaze y *col.*, 1987, quienes definieron los POAs como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias poderosas, principalmente el radical hidroxilo (Huang, D *et al.*, 1993). Este radical puede ser generado por medios fotoquímicos (incluida la luz solar) o por otras formas de energía y posee alta efectividad para la oxidación de la materia orgánica (Doménech *et al.*, 1998, 2004). Es así como estas tecnologías (POAs) pueden ser utilizadas, tanto como tratamiento único para la degradación de las sustancias orgánicas persistentes o refractarias contenidos en un vertido, el que posteriormente puede ser tratado biológicamente.

Entre los diferentes POAs se encuentran por ejemplo los sistemas: O₃/UV, H₂O₂/UV, O₃/H₂O₂/UV, Fe/H₂O₂ (Fenton), Fe/H₂O₂/UV-Vis (foto Fenton) y la fotocatalisis utilizando un semiconductor (Nogueira *et al.*, 1997). La tabla N° 3 muestra diferentes procesos de oxidación avanzada sean estos accionados sin una fuente luminosa o en presencia de una fuente luminosa.

Tabla 3 Clasificación de los diferentes POAs utilizados para la eliminación de contaminantes (Tomado de: Díaz 2008).

PROCESOS NO FOTOQUÍMICOS	PROCESOS FOTOQUÍMICOS
<ul style="list-style-type: none"> Ozonización en medio alcalino (O₃/OH) 	<ul style="list-style-type: none"> Oxidación en agua sub. y supercrítica
<ul style="list-style-type: none"> Procesos Fenton (Fe²⁺/H₂O₂) y relacionados 	<ul style="list-style-type: none"> Fotólisis del agua en el ultravioleta al vacío (UV/V)
<ul style="list-style-type: none"> Oxidación electroquímica 	<ul style="list-style-type: none"> UV/peróxido de hidrógeno
<ul style="list-style-type: none"> Radiólisis y tratamientos con haces de electrones 	<ul style="list-style-type: none"> UV/O₃
<ul style="list-style-type: none"> Plasma no térmico 	<ul style="list-style-type: none"> Foto-Fenton
<ul style="list-style-type: none"> Descarga electrohidráulica ultrasonido 	<ul style="list-style-type: none"> Fotocatalisis Heterogénea

Algunas ventajas de las tecnologías de oxidación avanzada son las siguientes:

- No sólo cambian de fase al contaminante, sino que lo transforman químicamente.
- Generalmente se consigue la mineralización completa del contaminante. En cambio, las tecnologías convencionales, que no emplean especies fuertemente oxidantes, no alcanzan a oxidar completamente la materia orgánica.
- Usualmente no generan barros que a su vez requieren de un proceso de tratamiento y/o disposición.
- Son muy útiles para contaminantes refractarios resistentes a otros métodos de tratamientos, principalmente el biológico
- Sirven para tratar contaminantes en muy baja concentración.
- No se forman subproductos de la reacción, o se forman en baja concentración.
- Son ideales para disminuir la concentración de compuestos formados por pretratamientos alternativos como la desinfección.
- Generalmente mejoran las propiedades organolépticas del agua tratada.
- En muchos casos, consumen menos energía que otros métodos (Ej. la incineración).
- Permite transformar contaminantes refractarios en productos tratables luego por métodos más económicos como el tratamiento biológico.
- Eliminan efectos de desinfectantes y oxidantes residuales sobre la salud.

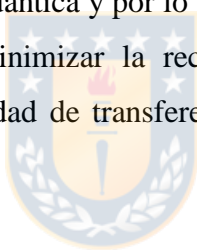
Los POAs son especialmente útiles como pretratamiento, antes de un tratamiento biológico, en contaminantes resistentes a la biodegradación o como proceso de postratamiento para efectuar un pulido de las aguas antes de la descarga a los cuerpos de agua receptores (Doménech *et al.*, 2004).

Uno de los procesos de oxidación avanzada más prometedores en el tratamiento de aguas residuales es la fotocatalisis heterogénea mediada por semiconductores, la cual se basa en la destrucción de los contaminantes en la superficie de un sólido (fotocatalizador heterogéneo) excitado con energía radiante (visible o UV), como lo documentan Doménech y *col.*,2000, Malato y *col.*, 2001.

Sin embargo, las investigaciones sobre la capacidad de degradación de los contaminantes orgánicos a través de esta técnica se han limitado al estudio de unos pocos compuestos y aún existe una gran cantidad de ellos por estudiar (Pavas *et al.*, 2003).

Por otro lado, el transporte de materia hacia o desde la superficie del semiconductor puede limitar la velocidad de fotodegradación. Esta limitación difusional pone en evidencia la baja eficiencia cuántica para la generación de radicales en la superficie del semiconductor (4%), ya que deben coincidir en la superficie la llegada del fotolito desde la solución con la presencia de huecos fotogenerados o con los radicales -OH^\cdot (Huecos atrapados en estado superficiales). En una primera aproximación, el origen del bajo rendimiento cuántico es la alta velocidad de recombinación entre electrones y huecos con respecto a la transferencia de carga a aceptores en solución.

Una vía para aumentar la eficiencia cuántica y por lo tanto para optimizar el funcionamiento del fotocatalizador soportado, es minimizar la recombinación de pares electrón-hueco fotogenerados y aumentar la velocidad de transferencia de electrones y de huecos a sus respectivos aceptores.



1.6.- Foelectrocatalisis

Conceptualmente la aplicación de un campo eléctrico es una manera de aumentar la separación espacial de portadores de carga, de forma tal que los electrones sean conducidos por un circuito externo y la reacción de reducción ocurra en otro electrodo.

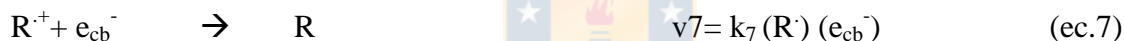
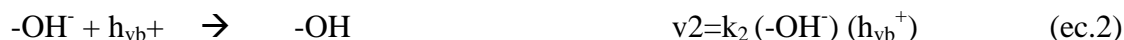
De este modo la reacción de reducción –que normalmente limita el proceso- ocurre con una energía de activación menor; consecuentemente la velocidad de fotooxidación aumenta. Al iluminar el electrodo se genera un flujo adicional de electrones en la banda de conducción. Como el pasaje de corriente por el circuito modifica el potencial de cada uno de los electrodos, un dispositivo alternativo es una celda de tres electrodos.

El principal objetivo de la foelectrocatalisis es proveer de un camino de menor energía de activación para la transferencia de carga a través del interfaz semiconductor/electrolito y,

en cierto modo, se busca minimizar la disipación de la energía de excitación y recuperar la máxima energía eléctrica o química.

1.6.1.- Fotocorriente y velocidad de reacción

En una celda fotoelectroquímica en ausencia de reacciones directas entre el oxidante y la materia orgánica, la fotocorriente provee una medida de la velocidad de la reacción ya que, por cada hueco que se transfiere circula un electrón por el circuito. Un esquema cinético sencillo de fotooxidación de una especie R está dado por las ecuaciones siguientes:



El paso (ec.1) corresponde a la generación de pares efectivos electrón-hueco. Los pasos (ec.2) y (ec.5) corresponden a la transferencia de huecos a especies en superficie, mientras que el paso (ec.4) corresponde a la oxidación del fotolito R mediada por radicales-OH·. Los pasos (ec.3) y (ec.7) describen la recombinación con electrones en la banda de conducción; (ec.6) describe la inyección de electrones en la banda de conducción que ocurre cuando la energía del par R/R²⁺ se ubica encima del fondo de la banda de conducción.

La mineralización completa de un fotolito involucra una secuencia compleja de reacciones de oxidación, con participación de radicales libres. El proceso inicial de transferencia de un hueco al fotolito adsorbido (ec.5) o de formación de un radical -OH· (ec.2) es seguido por otros pasos de transferencia de carga a través de la interfaz y/o por reacciones de los intermediarios con O₂. Los experimentos de fotocatalisis asistida por potencial demuestran que en la mayoría de los casos hay un incremento de la velocidad de reacción en las soluciones saturadas con O₂.

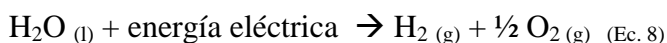
1.7.- Electrólisis

La palabra electrólisis comprende todas aquellas manifestaciones y fenómenos a que da lugar el paso de una corriente eléctrica a través de los cuerpos electrolíticamente conductores.

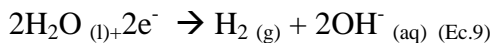
En el transporte de corriente toman parte todos los iones presentes y en tanto mayor escala cuanto mayor es su número y mayor también su velocidad de translación; los cationes se dirigen al cátodo y los aniones al ánodo y el resultado es que si no hay obstáculo o separación que lo impida, los cationes se acumularan en el cátodo y los aniones en el ánodo. Al mismo tiempo, y debido al paso de la corriente por los electrodos, desaparecen los cationes o se forman aniones en el cátodo y lo contrario sucede en el ánodo. Cuantitativamente se distribuyen los iones de tal manera que en todas las partes del electrolito el número de aniones es igual al de cationes.

1.7.1.- Fenómenos que tienen lugar en el electrolito

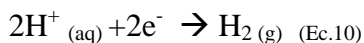
Fenómenos de reducción y oxidación. Este último es más difícil de interpretar teóricamente que los catódicos (reducción) porque en el ánodo hay que tener en cuenta los iones O^{2-} y OH^- que casi siempre ejercen acción sobre el metal electrodito y cuya separación aún en contacto con Pt es irreversible. Esto hace experimentar modificaciones al metal que forma el ánodo, volviéndolo parcialmente pasivo (Ulleberg., 2003).



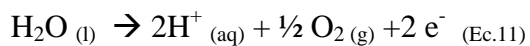
En el cátodo el agua se reduce llevando a la producción de hidrogeno (ecuación 9).



En su defecto, dependiendo de la presencia de cationes de hidrógeno, la reacción en el cátodo puede ser también (ecuación 10).

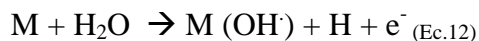


Mientras que en el compartimento anódico, el oxígeno se produce a partir de la oxidación del agua (Ecuación 11) (De Souza *et al.*, 2007).



El proceso de Oxidación electroquímica de compuestos orgánicos se puede realizar de forma directa, mediante la simple transferencia de electrones al ánodo, o indirecta, mediante especies electrogeneradas en el mismo, como el radical hidroxilo (Martínez *et al.*, 2009).

El modelo de electro-oxidación propuesto en este trabajo tiene como primer paso la generación de radicales OH. a partir de la oxidación del agua (ecuación 12).



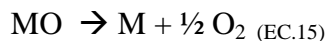
La superficie de los ánodos activos, pueden interactuar fuertemente con el radical hidroxilo, formando superóxidos (ecuación 12).



Finalmente, el par redox MO/M, actúa como mediador para la oxidación de compuestos orgánicos (ecuación 14).



Sin embargo, dicha reacción debe competir con la generación de oxígeno, mediante descomposición química de los superóxidos (ecuación 15).



En un posible esquema de degradación de compuestos endocrinos, se puede pronosticar que los esteroides se verán afectados por ataque electrofílico de los radicales OH al anillo aromático. El anillo se hidrolizará, formando intermediarios aromáticos que continuarán

degradándose, romperán su anillo y producirán ácidos alifáticos, aldehídos y cetonas para finalmente convertirse en CO_2 y H_2O (Sanzana., 2011).

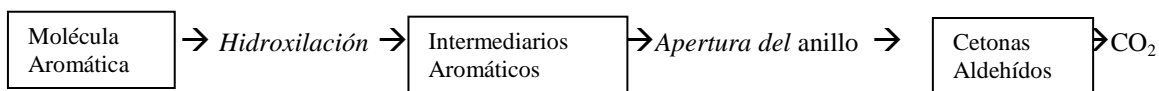


Figura 1: Esquema proceso general de degradación de compuestos aromáticos.

1.8.-Reactores fotoelectroquímicos

Una celda electroquímica, o electro-reactor, es un dispositivo dentro del cual ocurren reacciones electroquímicas. Existen dos grandes tipos las celdas galvánicas en las que se obtiene energía eléctrica a partir de una reacción espontánea y electrolíticas en donde se provocan reacciones a partir de un potencial externo (Brett., 1994).

A las reacciones de oxidación y reducción anteriormente mencionadas, se les conoce como reacciones de semicelda, ya que para que ocurra una necesariamente debe ocurrir la otra, dentro de una misma celda electroquímica. De esta forma se puede definir un electro reactor (Bockris., 2002), como la suma de dos semi-celdas, llamadas compartimento anódico y compartimento catódico. Ambas semi-celdas pueden estar físicamente juntas o separadas, sin embargo, deben estar conectadas eléctricamente.

Un electroreactor se utiliza para estudiar ciertos fenómenos electroquímicos, por ello es importante identificar los factores que afectan su funcionamiento, y por lo tanto cuales son las variables que deben ser fijadas con el fin de estudiar otras. Generalmente son de interés la concentración de especies, la intensidad de corriente y el potencial eléctrico (bard., 2001).

- Variables electródicas: material, área superficial, geometría, estado de la superficie.
- Variables configuracionales: Tipo de puente salino, área de contacto, resistencia eléctrica.
- Variables de solución: Especies presentes, concentración, pH, solvente, temperatura, conductividad.

- Variables externas: Temperatura, presión, tiempo.
- Variables eléctricas: Potencial (E), Corriente (I), cargas (Q).

La conductividad de la solución es una variable determinante a la hora de evaluar el desempeño de las reacciones electroquímicas, un electrolito soporte es el encargado de intensificar esta propiedad, por lo que la elección de este y su concentración son importantes para garantizar un buen funcionamiento del electroreactor. De la misma manera las características del puente salino deben permitir un eficiente traspaso de cargas y una larga vida útil.

Cuando un electrodo se pone en contacto con un electrolito, se crea una diferencia de potencial entre ambos sin embargo esta diferencia de potencial no puede ser mediada de manera absoluta. Por ellos se mide en comparación con un electrodo especial, que es un electrodo de referencia (Brett 1994).

La referencia primaria internacionalmente aceptada es el electrodo estándar de hidrogeno (SHE) o electrodo normal de hidrogeno (NHE). Sin embargo, los potenciales son usualmente medidos y citados con electrodos diferentes al NHE, como por ejemplo el electrodo de plata y cloruro de plata (Ag/AgCl).

1.8.1.- Potencial aplicado y control de potencia

En general el potencial aplicado no supera los 2 V (medidos contra electrodo de calomel saturado, ECS). El uso de potenciales más positivos no mejora la separación electrón-hueco y puede dar origen a reacciones secundarias puramente electroquímicas, con el consiguiente desaprovechamiento de energía. En general se elige el modo potencioestático con sistema de tres electrodos, fijando el potencial del fotoánodo con respecto a un electrodo de referencia.

1.8.2.- Electrodo de trabajo (ET)

Se deben utilizar fotoánodos resistentes a la corrosión y a la abrasión producida por el líquido mediante pruebas de largo plazo. Para alcanzar valores bajos de resistencia a la

corriente eléctrica, se usan electrodos de películas delgadas (espesor $< 1\mu\text{m}$) soportadas sobre sustratos conductores. El tipo de sustrato depende de la geometría de la celda y de la iluminación. Los sustratos más comunes son de vidrio conductor o titanio, y la película de TiO_2 se prepara ya sea por dip-coating o spin-coating a partir de suspensiones, o por el método sol-gel.

1.8.3.- Contraelectrodo (CE)

La reacción en el CE debe tener el menor sobrepotencial posible y generalmente se prefiere la reducción de O_2 , que favorece la longitud de oxidación y no la liberación de H_2 .

Hasta el momento los electrodos más empleados se construyen de platino que es un excelente catalizador para la reducción de O_2 . También se han obtenido buenos resultados con carbón vítreo, y se ha propuesto el uso de cátodos de acero inoxidable.

1.8.4.- Compartimentos y separadores

Algunos modelos de celdas fotoelectroquímicas ubican el fotoánodo y al CE en compartimentos separados para evitar la mezcla de los productos generados en cada electrodo. Los resultados de estos diseños son dispares y dependen del fotolito empleado, cambio de pH durante la reacción y el potencial de reducción de las distintas especies. Se ha encontrado tanto un aumento como una disminución de la eficiencia.

En los diseños de dos compartimentos para mantener la electroneutralidad, se utilizan separadores que permitan el intercambio de iones. Los separadores permeables (diafragmas), se construyen habitualmente de vidrio poroso que limita inespecíficamente la migración de aniones y cationes de un compartimento al otro. Los separadores semipermeables (membranas) emplean una matriz polimérica con grupos iónicos fijos que actúan como intercambiadores de aniones; estas membranas dejan pasar selectivamente aniones o cationes y son impermeables al solvente y a moléculas no ionizadas.

1.8.5.- Iluminación

Para alcanzar una iluminación homogénea del fotoánodo, la localización de los electrodos debe tener en cuenta no solo la distribución del campo eléctrico, sino también la posición

de la fuente de radiación, de forma tal de evitar (o disminuir) efectos de pantalla entre los electrodos. Para ello, algunos reactores en batch colocan el CE en un compartimento separado, o emplean como ventana un CE transparente (vidrio conductor o vidrio conductor platinizado); este caso es imposible evitar una pérdida de intensidad de iluminación. También se puede utilizar un fotoelectrodo transparente (TiO_2 soportado sobre vidrio conductor) como ventana; en este caso debe compatibilizarse la integridad a largo plazo de la película de TiO_2 con un espesor adecuadamente delgado, que permita que la luz llegue a la superficie.

Respecto a las fuentes de radiación se han ocupado lámparas de arco (Hg-Xe o Xe), tubos fluorescentes (luz negra) y luz solar. Cuando se utilizan lámparas de arco, habitualmente se filtra la radiación infraroja y la radiación UV de longitud de onda menor a 300nm.

1.8.6.- Aplicaciones

La eficacia de la fotoelectrocatalisis para la mineralización de distintos compuestos orgánicos ha sido demostrada. También se ha aplicado a la desinfección de aguas que contienen *Escherichia Coli* y *Clostridium Perfringens* y la oxidación de nitrito a nitrato en medio anaeróbico sobre fotoelectrodos de TiO_2/Ti . En el caso de la desinfección se ha propuesto que las bacterias, cargadas negativamente se absorben sobre la superficie positiva, y son destruidas por acción de los -OH^\cdot fotogenerados.

La fotoelectrocatalisis también se ha aplicado a la degradación de tintes de la industria textil (Bhaskar *et al.*, 2011) con remociones de 60% (20 kWh/m^3) y una remoción casi completa con el sistema UV/ $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (2500 kWh/m^3), a la oxidación de pequeñas moléculas de materia orgánica por nanoparticulas de oro soportadas en nitruro de carbono (Chang *et al.*, 2014). Zhang y col., 2013, utilizó nanocristales de TiO_2 /Carbono aerogel (ánodo) platino (Cátodo) y calomel saturado (referencia) para eliminar azul de metileno. Paschoal y col., 2009 desarrollo un tratamiento para eliminar tintes en aguas residuales textiles ocupando Ti/TiO_2 como ánodo, preparado a través del método sol-gel, platino (cátodo), Ag/AgCl (ref), se aplicó radiación UV (lámpara Hg 254nm) y un potencial de 1V, con Na_2SO_4 como electrolito conductor, con eliminaciones del color en el rango entre 80-89%, la DQO entre 52-69% y el TOC entre 47-50%.

En el trabajo de Rodríguez *y col.*, 2008, se eliminaron el 98,5 % de iones presentes (Mg, Na, Cr, SO₄, Cl₂, NH₃, detergentes) en efluentes de aguas de curtiembre en un periodo de 24 horas con electrodos de TiO₂/RuO₂ (ánodo) y TiO₂ (cátodo). La fuente de iluminación fue una lámpara de vapor de Hg de 400 W.

En otras aplicaciones también se han estudiado la eliminación de fármacos como la clortetraciclina en aguas residuales por procesos de fotoelectrooxidación con luz solar (Daghrir *et al.*, 2014) ocupando TiON₂ dopado (ánodo) preparado por medio de un magnetrón de radiofrecuencia proceso de pulverización catódica.

En el trabajo de Brugnera *y col.*, 2010 para la eliminación de bisfenol A (CDE) se ocuparon electrodos de Ti nanotubulares autoorganizados y la degradación se siguió por HPLC-DAD, obteniendo 100% de eliminación de TOC y de 20 y 30% para fotólisis y fotocatalisis, con degradaciones del 99,6.

En general se han utilizados dispositivos con iluminación solar y con lámparas, electrodos de láminas de Ti recubiertas con TiO₂ por dip-coating a partir de una suspensión de TiO₂ en metanol, con un tratamiento térmico posterior a altas temperaturas 300 a 450°C para mejorar la estabilidad y adherencia. Como CE se han empleado vidrio conductor con un depósito de Pt, carbón vítreo y electrodos de referencia de calomel saturado.

En particular estudios de degradación para compuestos disruptores endocrinos por fotoelectrooxidación no hay muchos y tampoco esto se ha complementado con estudios biológicos para corroborar si existen o no actividades estrogénicas a las concentraciones de degradación alcanzadas por los distintos métodos. Por lo que este proyecto busca englobar puntos de vista que estaban siendo utilizados por separado, de manera de obtener una mejor comprensión del sistema utilizando para ello las herramientas tecnológicas disponibles.

1.9.- Referencias

Altenburger, R., Walter, H., Grote, M. (2004). What contributes to the combined effect of a complex mixture, *Environmental Science and Technology*, 38, 6353-62.

Arikan, O.A., Rice y Codling E. (2008). Occurrence of antibiotics and hormones in a mayor agricultural watershed. *Desalination*, 226, 121-133.

Aufartová, J., Mahugo-Santana, C., Sosa, S., Santana, J., Nováková, L., Solich, P. (2011). Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta*, 704, 33–46.

Arditsoglou, A., Voutsas, D. (2008). Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*, 15, 228–236.

Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis TrAC Trends in *Analytical Chemistry*, Vol. 22, Pag. xiv-xvi.

Bolonga, N., Ismail, A., Salim, M., Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239, 229–246.

Bard, A., Faulkner, R. (2001). Potential sweep methods. En *electrochemical Methods: Fundamentals and applications*, 2^oed, John Wiley and Sons. EEUU.

Bell, A (2001). Effects of an endocrine disruptor on courtship and aggressive behavior of male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Anim. Behav*, 62,775–780.

Bockris, O'M., Reddy, A. (2002). *Electroquímica moderna*. Ed. Reverté., Barcelona, España.

Brotons, J., Olea-Serrano, M., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Persp*, 103, 608–612.

Brugnera, M., Rajeshwar, K., Cardoso, J., Valnice, M. (2010). Bisphenol A removal from wastewater using self-organized TiO₂ nanotubular array electrodes. *Chemosphere*, 78, 569–575.

Colborn, T., vom Saal, F., Soto, A. (1993). *Environ. Health Prespect*,101,378-384.

Chang, S., Xie A., Chen, S., Xiang, J (2014). Enhanced photoelectrocatalytic oxidation of small organic molecules by gold nanoparticles supported on carbon nitride. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 719, 86–91.

Daghrir, R., Drogui, P., Delegan, N., Khakani, M. (2014). Removal of chlortetracycline from spiked municipal wastewater using a photoelectrocatalytic process operated under sunlight irradiations. *Science of the Total Environment*, 466–467: 300–305.

Damstra, T., y colaboradores: Evaluación global del estado de la ciencia sobre disruptores endocrinos. OMS. 2003.

Darbre, P., Aljarrah, A., Miller, W., Coldham, N., Saver, M., Pope G (2004). Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *Appl Toxicol* 24.

Doménech, X., Wilson F., Jardim, W., Litter, M. (2004). Procesos avanzados de oxidación para eliminación de contaminantes. En Blesa, M & Sánchez, B (eds) Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea: 7-33, CIEMAT, Buenos aires.

De Souza, R., Padilha, J., Gonzalez, R., De Souza, M., Rault-Berthelot, J. (2007). Electrochemical hydrogen production from wáter electrolysis using ionic liquid as electrolytes: Towards the best device, *Journal of power sources*, 164,792-798.

Díaz-Cruz, M., García-Galán, M., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M., Petrovic, M, Barceló, D. (2009). Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge *Trend Anal. Chem*, 28,1263-1275.

Glaze, W. (1987). Drinking-water treatment with ozone. *Environmental Science Technology*, 21,224-230.

1-GEO-3: Perspectivas del Medio Ambiente Mundial 2002. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. © 2002, ISBN: 84-8476-062-6. <http://www.grida.no/geo/geo3/>

González, S., López, R., Cortina, J. (2012). Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review. *Environmental Pollution*, 161, 83-92.

Hansen, P., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., Blaise, C. (1998). Vitellogenin: a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Anal. Chem*, 17,448-451.

Huang, P., Dong, H., Tang, Z. (1993). Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste Management*, 13, 361-377.

Joss, A., Keller, E., Alder, A.C., Göbel, A., Mc Ardell, C.S., Ternes, T., Siegrist, H. (2005). Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39, 3139-3152.

Jobling, S., Sumpter, J. (1993). Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes. *Toxicol*, 27, 361-372.

Johnson, A., & Williams, R. (2004). A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental science & technology*, 38(13), 3649-3658.

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater

contaminants in US streams, 1999 – 2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36, 1202-11.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R., Guwy, A. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters, *Water Res.*, 43, 363–380.

Lange, R., Hutchinson, T., Croudace, C., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, H., Panter, G., Sumpter, J. (2001). Effect of the synthetic estrogen 17 α -Ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (PIMEPHALES PROMELAS). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (6), 1216–1227.

Loos, R., Hanke, G., Eisenreich, S. (2003). Multi-component analysis of polar water pollutants using sequential solid-phase extraction followed by LC-ESI-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 5, 384-394.

Larsson, D., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A., Olsson, P, Förlin, L. (1999). Ethinylloestradiol - an undesired fish contraceptive: *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.

Lee, J., Lee, B., Ra, J., Cho, J, Kim, I., Chang, N., Kim, H., Kim, S, (2008). Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes. *Chemosphere* 71,1582–1592.

Malato, S., Blanco, J., Vidal, A., Alarcón, D., Maldonado, M.I., Cáceres, J., Gernjak, W. (2003). Applied studies in solar photocatalytic detoxification: an overview. *Solar Energy*, 75, 329-326.

Malato, S., Maldonado, I., Blanco, J. (2001). Descontaminación de aguas de lavado de plaguicidas mediante foto catálisis solar. Madrid, CIEMAT.188-191pp.

Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G., Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2881.9.

Moreira, D., Aquino. S., Afonso. R., Santos, E., DePadua, V. (2009). Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil, *Environ. Technol.* 30, 1041–1049.

Normas de calidad ambiental y de emisión. Planes de prevención y descontaminación. Ministerio del medio ambiente, Gobierno de Chile 2011

Nogueira, R., Alberci, M., Jardim, F. (1997). An alternative TiO₂ variety for aqueous and gas- phase decontamination. In: Proceedings third international conference on TiO₂ photocatalytic purification and treatment of water and air. Orlando, Florida, Naval Surface Warfare Center, Maryland, USA :83-84. *Ciencia y Cultura*, 49, 14-20.

Paschoal, F., Anderson, M., Valnice, M. (2009). The photoelectrocatalytic oxidative treatment of textile wastewater containing disperse dyes. *Desalination*, 249, 1350–1355.

Pavas, G. M., Cabrerars., Jaramillo, S. (2003). Foto-oxidación del sistema cromo hexavalente-4-clorofenol. *Revista Universidad EAFIT* 39(131), 60-76.

Petrovic, M., Gonzales, S y Barcelo, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water, *Trends Anal. Chem*, 22 (10), 685-696.

Pombo, M., Castro, L. Disruptores Endocrinos, Universidad de Santiago de Compostela. <http://www.seep.es/privado/download.asp?url=congresos/C2005/Conferencias/Conferencia-Manuel%20Pombo.pdf>

Purdom, C., Hardiman, P., Adiós, V., Eno, N., Tyler, C., y Sumpter, J. (1994). Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem. Ecol* 8, 275 – 285.

Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2008). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuate*. *Science of the Total Environment*, 389, 306-314.

Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., Ventura, F., Knepper, T. (2006). Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European Perspective. *Environmental Science and Technology*, 40, 5451-5438.

Rodríguez, M., Amado, F., Xavier, J., Streit, K., Bernardes a., Ferreira, J. (2008). Application of photoelectrochemical electro dialysis treatment for the recovery and reuse of water from tannery effluents. *Journal of Cleaner Production*, 16, 605-611.

Sanzana, J. Electro-Oxidación de compuestos organoclorados presentes en compuestos celulósicos. Memoria de título. Departamento de ingeniería química- Facultad de ingeniería. Universidad de Concepción. Concepción- Chile (2011).

Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G., Watts, M., Wenzel, A. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.

Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1–21.

Sumpter, J., Johnson, A. (2009). Reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between), *J. Environ. Monit.* 10, 1476–1485.

Sun, M., Du, L., Gao, S., Bao, Y., Wang, S. (2010). Determination of 17- estradiol by fluorescence immunoassay with streptavidin-conjugated quantum dots as label. *Steroids* 75, 400–403.

Ternes, T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res.* 32, 3245–3260.

Ulleberg, O. (2003). Modeling of advanced alkaline electrolyzers: a system simulation approach. *International Journal of hydrogen Energy*, 28, 21-33.

White, R., Jobling, S., Hoare, S., Sumpter, J., Parker, M. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic *Endocrinology*, 135,175–182.



CAPITULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis general

Es posible degradar compuestos disruptores endocrinos a través de distintas técnicas de procesos de oxidación avanzada, la cual puede ser mejorada por la aplicación de luz en el caso de fotoelectrooxidación, además de reducir tiempo v/s la fotooxidación.

2.2.- Objetivo general

Degradar disruptores endocrinos contenidos en una muestra acuosa, a través de técnicas de fotooxidación, electrooxidación y fotoelectrooxidación, bajo la influencia de radiación adecuada.



2.2.1.- Objetivos específicos

- Estudiar las cinéticas de la reacción a través de espectrofotometría UV y HPLC-UV y a la luz de estos resultados proceder a un diseño experimental.
- Utilizar el análisis multivariado para comprender los factores que más influyen en la degradación (Concentración de sustrato, potencial, etc) a través de un polinomio de respuesta.
- Obtener las superficies de respuesta que describan este comportamiento y estudiar la cinética de la reacción en las condiciones óptimas de degradación.
- Seguir la mineralización del compuesto a través de determinaciones de: TOC.
- Estudiar las actividades estrogénicas con los distintos tratamientos aplicados.

CAPITULO 3

METODOLOGIA

El presente trabajo tiene por objetivo general; degradar compuestos disruptores endocrinos por diferentes procesos de oxidación avanzada, para ello, fue necesario diseñar y construir un electro reactor de celdas divididas, que permite estudiar las reacciones de oxidación y reducción por separado, sin que sus contenidos líquidos o gaseosos se mezclen, solo que haya una transferencias de cargas entre el ánodo y cátodo a través de un puente salino, el cual es fundamental para completar el circuito del proceso electroquímico, y para lograr el equilibrio entre las cargas transferidas.

3.1.-Reactor

El reactor diseñado fue de celdas divididas de material borosilicato, con una capacidad para tratar 300 mL de solución, con toma muestra, tapas herméticas del mismo material, con perforaciones para adaptar los respectivos electrodos y puente salino (figura 3.1).

El reactor fue dispuesto dentro de una caja que sirvió como medio de reacción donde fue soportada la fuente de luz, agitadores magnéticos, extractor de aire y ventilador. La caja reactiva fue forrada en su interior con papel aluminio, para no perder energía luminosa por absorción. Además, se construyó un separador de acrílico con protección UV entre la fuente de luz y el investigador, para evitar el daño colateral por exposición directa a la radiación.

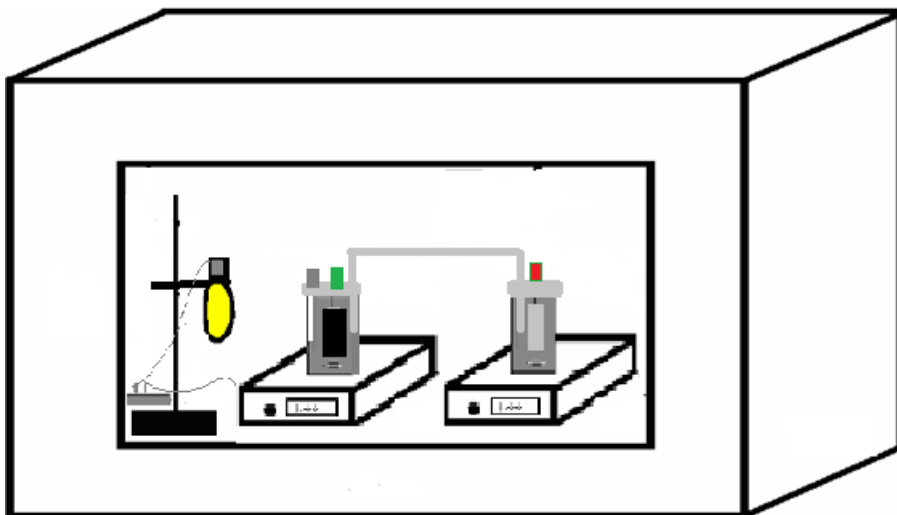


Figura 3.1: Esquema sistema reactor en presencia de luz UV de 125 W

3.2.- Puente salino

Para permitir el contacto entre las celdas divididas se utilizó un tubo de vidrio en forma de U relleno en base al electrolito soporte inerte KNO_3 4 M inmovilizado en un sustrato de agarosa al 1%, cuyas dimensiones fueron 8x5 cm y di: 10 mm.

3.3.- Reacciones de electrooxidación y fotoelectrooxidación

3.3.1.- Medidas potencioestáticas

Se aplica un potencial constante al electrodo de trabajo y se mide la variación de la corriente (I) con el tiempo. Se obtiene así una curva corriente- tiempo potencioestática.

3.3.2.- Voltamperometría de barrido lineal

La voltamperometría consiste en la aplicación de un potencial variable en el tiempo, con el que es posible diagnosticar mecanismos de reacciones electroquímicas, identificar especie

presentes en la solución y analizar semi-cuantitativamente las velocidades de reacción (brett., 1994).

En la voltamperometría de barrido lineal se realiza un escaneo de potencial en una sola dirección, hasta llegar a un valor elegido. Si se quiere observar el fenómeno de oxidación o reducción, el barrido se realiza en dirección positiva o negativa. En la votamperometría cíclica la dirección del escaneo de potencial es invertida automáticamente al llegar al valor máximo (brett., 1994).

3.4.- HPLC – DAD

Las reacciones de fotooxidación, electrooxidación, y fotoelectrooxidación fueron seguidas por HPLC-DAD, utilizando como fase estacionaria una columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, 5 μm) y una fase móvil de acetonitrilo- agua, en proporción 50-50, a un flujo de 1 mL min^{-1} . La longitud de onda de trabajo fue 200 nm.

Debido a las bajas concentraciones de estrógenos en diferentes matrices ambientales, ha habido mucha expectación por métodos de análisis instrumentales sensibles. El desarrollo de instrumentos analíticos tales como cromatografía de gas y líquido con espectrometría de masas (GC-MS- LC-MS) ha proporcionado el apoyo técnico para el análisis a nivel de ultra trazas de compuestos orgánicos. Sin embargo, cuando estás tecnologías no se encuentran disponibles (debido a su alto costo), se puede optar por detectores UV, de fluorescencia o electroquímicos, los cuales permiten junto a técnicas de extracción y pre concentración, la identificación y cuantificación de los analitos de interés, en matrices simples y complejas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Peñalver y *col.*, 2002, ocupando micro extracción en fase sólida con detección UV-DE (detector electroquímico) se lograron detectar 3 compuestos (b- estradiol, 4-tert. octilfenol -4-nonilfenol), de los cuales uno pudo ser cuantificado.

Generalmente, independiente del cromatografo o detector que se emplee, las columnas utilizadas para separación de los analitos son en la mayoría columnas apolares y las fases

móviles son medianamente polares usando combinaciones de solventes como metanol/agua, acetonitrilo/ agua, hidróxido de amonio acuoso/agua (Peñalver *et al.*, 2002).

3.5.- Consideraciones generales del muestreo de aguas

Dependiendo del objetivo del estudio las muestras son tomadas en forma representativa. Por ejemplo, si se quiere evaluar la eficiencia de las plantas de tratamiento de aguas en la eliminación de contaminantes, entonces se procede a muestrear a la entrada y a la salida de la planta, además de muestrear en cada etapa de tratamiento. Si el objetivo es evaluar la contaminación producida por descargas de aguas residuales, distribución y alcance de los contaminantes en el ambiente, entonces se muestreará en las zonas de descargas de aguas residuales y a lo largo del curso de ríos, lagos, estuarios incluyendo además aguas de origen subterráneo y sedimentos. Es importante tener en claro si el muestreo será espacial (vertical o horizontal) por ejemplo en un río a lo largo de la cuenca, tomando como referencia los lugares más densamente poblados y zonas de descargas de aguas residuales o temporal, por ejemplo, a intervalo de horas, días o meses.

En el presente trabajo se recolectaron muestras, en las etapas de tratamiento primario, secundario y terciario de la planta de tratamiento de aguas servidas Bio –Bio, perteneciente a ESSBIO.

3.5.1.- Consideraciones de almacenamiento y conservación de muestras

La recolección de muestras de aguas se realiza en botellas de vidrio ambar, deben ser congelados para su transporte y almacenados a -20°C o -30°C en oscuridad hasta su análisis. Alternativamente se pueden añadir agente para evitar el crecimiento bacteriano (NaN_3 , HgCl_2) (Pojana *et al.*, 2007).

Las muestras acuosas o lodosas pueden ser centrifugadas y filtradas para eliminar el material particulado con filtro de fibra de vidrio, de celulosa o nylon y luego pueden ser pasadas por membranas de acetato de celulosa y sobrecargadas con el analito objetivo

deuterado (Chen *et al.*, 2012, Iparraguirre *et al.*, 2011, Sodré *et al.*, 2010, Giraud *et al.*, 2010).

3.5.2.- Pretratamiento de muestras

La bibliografía detalla principalmente el uso de la extracci3n en fase s3lida para la determinaci3n de compuestos endocrinos (Brossa *et al.*, 2004., Vulliet *et al.*, 2008) en agua de rio, mar, afluyente y efluentes de pantas de tratamientos de aguas residuales, ocupando cartuchos Strata C18 modificados superficialmente con estirenodivinilbenceno. Los cartuchos OASIS HLB, al igual que los apolares como LiChrolut RP-18 o Strata C18 son usados para la extracci3n de compuestos disruptores endocrinos, pero OASIS HLB presenta la ventaja respecto a los otros, ya que al ser un relleno con balance hidrofílico-lipofílico, permite la extracci3n adecuada en fase s3lida de todo tipo de compuesto. Su composici3n consiste en una proporci3n equilibrada de N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica), proporcionando una capacidad de retenci3n superior en fase reversa, con capacidad especial para optimizar la retenci3n de analitos polares.

Otra alternativa de extracci3n es la extracci3n sobre barras magnética (SBDE), la cual fue aplicada por Brossa y *col.*, 2005 (desorcici3n líquida combinada con GC/MS) y Iparraguirre y *col.*, 2011 (derivatizaci3n en tubo con desorcici3n térmica combinada con GC/MS). Respecto a este tipo de extracci3n se tiene algunas ventajas ya que las recuperaciones, sensibilidades y capacidades son mayores que en el caso de ocupar microextracci3n en fase s3lida, ya que la cantidad de polidimetilsiloxano (PDMS) que recubre la barra magnética es mayor que el de una fibra de microextracci3n en fase s3lida (SPME). Pero a la vez presenta desventajas por ejemplo por pérdidas del analito en la parte inferior de la barra por contacto con el vaso.

En tanto la Extracci3n en fase s3lida (SPE), ha sido una técnica rápida y simple que se utiliza comúnmente para el pretratamiento y ha sido ampliamente utilizado para el enriquecimiento y la limpieza de muestras estrogénicas (Brossa *et al.*, 2004; Vulliet *et al.*, 2008).

3.6.- Carbono orgánico total (COT)

Los compuestos que contiene carbono orgánico, mediante disgregación con ácido sulfúrico y peroxodisulfato, se transforman en dióxido de carbono. Este reacciona con una solución indicadora, cuya coloración se determina fotométricamente. El carbono unido inorgánicamente (dióxido de carbono disuelto y aniones del ácido carbónico) se expulsa previamente como gas después de acidificar.

3.7.- Análisis en líneas celulares

Se trabajó en colaboración con el centro de biología celular de la Universidad de Concepción, donde se diseñaron los experimentos a realizar para cumplir con el objetivo. Se implementó la técnica E-screen (proliferación celular), para evaluar actividad estrogénica en soluciones sintéticas de hormonas esteroidales, usando la línea celular MCF7 (línea celular de adenocarcinoma de mama humano) (Cifuentes, P., 2013).

Se emplearon cultivos de la línea celular tumoral mamaria MCF-7, con receptores estrogénicos (RE) positivos. Las células MCF-7 se cultivaron tanto en un medio completo como en un entorno libre de estrógenos. Como control, se aplicaron los disolventes de los preparados en medios de cultivos similares (Bodinet, C., Freudenstein, J., 2004; Lau, J., 2010).

Para lo anterior el centro de biología contaba con stock de células congeladas, las cuales fueron cultivadas como se mencionará en los siguientes capítulos.

3.8.- Validación y análisis estadístico

Validar es comprobar con evidencia documentada que un método, sistema o proceso, cumple y se desarrolla tal y como estaba previsto, dentro de intervalos definidos. Esto asegura que los resultados de un método, sistema o proceso son confiables, consistentes y que existe un nivel de confianza en los resultados (Stanley., 1982., Skoog. D., Thurman.,1998).

3.8.1.- Parámetros de validación

- Selectividad/especificidad
- Exactitud (Sesgo)
- Precisión (repetibilidad, reproducibilidad)
- Linealidad/ función respuesta

- Limite de detección
- Limite de cuantificación
- Intervalo de trabajo/ rango
- Incertidumbre

Los parámetros que es preciso determinar difieren según el alcance del método que se vaya a validar (tabla 3.4).

Tabla 3.4: Parámetros a considerar para cada tipo de ensayo

Tipo de ensayo	Parámetro
Determinación cualitativa	Selectividad/ Especificidad Límite de detección
Determinación cuantitativa	Intervalo de trabajo Linealidad/función respuesta Selectividad/ Especificidad Precisión Exactitud Limite de cuantificación Incertidumbre

3.8.2.- Análisis multivariado

El método de análisis multivariado consistió en hacer un número mínimo de experimentos de forma simultánea modificando las variables que afectan a la eficiencia de la degradación (concentración de sustrato, potencial, tiempo etc) con el fin de cuantificar los efectos que tienen cada una de las variables, tanto como efectos de primer orden, segundo orden e

interacciones de manera de encontrar las condiciones en las cuales la degradación es favorecida. Los resultados serán analizados por el software modde 7.0 el cual arrojará una expresión polinómica y superficie de respuesta que representara al sistema en estudio.

3.9.- Bibliografía

Bodinet, C., Freudenstein, J. (2004). Influence of Marketed Herbal Menopause Preparations on MCF-7 Cell Proliferation. *Menopause*, 11(3), 281-289.

Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R. (2004). Solid-Phase Extraction/High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry to Determine Endocrine Disruptors in Water Samples. *Chromatographia*, 59, 419–423.

Cifuentes, P. (2013). Implementación de la técnica “Yeast Estrogen Screen” para evaluar la presencia de sustancias estrogénicas en agua. Memoria de título magister en ciencias microbiológicas. Universidad Nacional de Colombia.

Chen, Q., Shi, J., Wu, W., Liu, X, Zhang, H. (2012). A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 104, 49–55.

Lau, J. (2010). Differential expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma and cyclin D1 does not affect proliferation of asthma- and non-asthma-derived airway smooth muscle cells. *Respirology*, 15, 303-12.

Sodré, F., Pescara, I., Montagner, C., Jardim, W. (2010). Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96, 92–98.

Skoog, D., Holler, J., Nieman, T. Principios de análisis instrumental, 5 nd.ed. Capitulo 27, pp 781-783.

Peñalver, P., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R. (2002). Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 964, 153–160.

Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33, 929–936.

Stanley, H. Química Orgánica. Mc Graw Hill. 4 nd.ed. 1982. pp. 2-13

Thurman, M., Mills, M. Solid- phase extraction, Principles and Practice. 1998. p. 384.

Iparraguirre, A., Prieto, A., Navarro, P., Olivares, Fernández, L & Zuloaga, O. (2011). Optimization of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples. *Anal Bioanal Chem* 401,339–352.

Vulliet, E., Wiest, L, Baudot, R., Grenier, M. (2008). Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210, 84–91.



CAPITULO 4**EFFECT OF CHEMICAL AND PHYSICAL VARIABLES IN THE PHOTO-ELECTROCHEMICAL REMOVAL OF ESTRIOL (E3) AND 17 α -ETHINYLESTRADIOL (EE2) IN AQUEOUS SOLUTION**

NAYSA DÍAZ₁, MÓNICA PÉREZ-RIVERA₂, ROSARIO CASTILLO₃, RODOLFO MUNDACA₃, FELIPE ARAVENA₁, MARIO ARANDA₃, CARLOS PEÑA-FARFAL₁*

1 Department of Analytical and Inorganic Chemistry, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción,

Edmundo Larenas 129, 4070043 Concepción, Chile

2 Department of Polymers, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 129, 4070043 Concepción, Chile.

3 Faculty of Pharmacy, Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 129, 4070043 Concepción, Chile.

4.1.- Abstract

The effect of different variables in the electrochemical removal of estriol (E3) in aqueous solution was studied and it was compared with the removal of 17 α - Ethinylestradiol. The photoelectrooxidations were carried out with DSA electrode (Ti/RuO₂), varying the pH, substrate concentration and supporting electrolyte, potential configuration of saline bridge, reactor volume, and light source. Results for both Estriol and 17 α - Ethinylestradiol are similar, showing to be the best removals at concentrations of 500 μ g/L of substrate, volumes to be treated of 90 mL of solution, saline bridge of 30 cm in length, voltages between 0.8 and 3, concentration of Na₂SO₄ of 0.1 M, pH between 6 and 10, and UV lamp of 125 W.

Keywords: Photoelectrooxidation, Estriol, Ethinylestradiol, endocrine disruptor, DSA (Ti/RUO₂)

4.2.- Introduction

In recent decades, the interest in studying the so-called emerging pollutants has increased, as they are compounds that are used in large quantities by the population. Moreover, many of them have not been regulated in their maximum or minimum amount allowed in the environment and it is known that they return to the natural water systems, often without being treated by wastewater treatments, causing adverse effects in organisms (Parks, L *et al.*, 2001). This occurs even at very low concentrations, including ng L^{-1} (Clouzot, L *et al.*, 2008). The effect mostly reported in different works is the known “endocrine disruptor effect”. The environment association defines an endocrine disruptor as an exogenous agent that interferes with synthesis, secretion, transport, union, action or elimination of natural hormones, which are responsible for maintaining homeostasis, reproduction, development and or behavior (Kavlock, R *et al.*, 1996).

Because of the aforementioned problems is that the exhaustive study of data of environmental monitoring, transport, transformation and incidence on health has allowed focusing the study on the improvement and creation of new water treatments. Among these treatments, the “treatments of Advanced Oxidation” can be found. These are based on physicochemical processes capable to produce deep changes in the chemical structure of pollutants, which involve the generation and use of transitory powerful species such as the hydroxyl radical (Huang, C *et al.*, 1993). This radical can be generated by photochemical processes or by other forms of energy (Doménech *et al.*, 1998) and it has high effectiveness for oxidizing organic matter (Klavarioti, M *et al.*, 2009).

In the present study, photoelectrooxidation techniques are used to remove Estriol and α -Ethinylestradiol, 2 steroidal hormones. The first of them is a hormone of natural origin present mainly during pregnancy and the second one is a synthetic hormone used in oral contraceptives (Liu, Z *et al.*, 2009). Both have been reported in natural and wastewaters (Johnson, A., 2004) and there is evidence of their potential effect (Aris, S *et al.*, 2014).

In the environment, these two hormones can be partially degraded by direct photolysis (absorption of the photoactive phenolic group) or indirectly (absorption of light by photosensitizing species such as nitrates or dissolved organic matter, which generate reactive oxygenated radicals). Sometimes, this depends on many factors, including climatic, which are often unpredictable.

Therefore, at the laboratory scale, various studies focused on removing hormones with physical, biological and chemical techniques have been developed, many times with promising results.

This work is aimed to know different variables both physical and chemical that could affect the photoelectrochemical removal of these hormones in aqueous solution, taking into account that this is a viable and efficient alternative that will allow decreasing removal times compared to the traditional electrooxidation. In this photoelectrochemical removal by using an external light source, an additional flow of electrons is generated, decreasing the activation energy for transfer of charge through a semiconductor/electrolyte interface, obtaining a lower energy dissipation and the recovery of the maximum electrical or chemical energy (Coleman, H *et al.*, 2005).

In addition to the intrinsic advantage of using light, we will study different variables both physical and chemical that could influence in the removal of pollutants in aqueous solution, in order to apply the technique optimally.

4.3.- Materials and methods

The molecular structure of the hormones under study is shown in Figure 1: Estriol (E3) and 17 α -Ethinylestradiol (EE2). Both differ from each other in the amount of OH present in each of them; in addition to the ethynil group present EE2.

Both EE2 and EE3 were obtained from Sigma Aldrich, with a purity > than 97%. The working solutions were obtained from patterns of 5.6 mg L⁻¹ of Estriol and 1 mg L⁻¹ of 17 α

Ethinylestradiol, dissolved in ultrapure water, and filtered with PVDF filters (0.45 μm , Whatman).

In order to study the effect of concentration of the analyte on the degradation rate, there were three concentration levels: 500, 700 and 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of hormones, keeping three concentration of Na_2SO_4 (0.1 M) constant, whereas when performing the Na_2SO_4 concentration variation experiments (0.1 – 0.3 – 0.5 M), the concentration of hormone was kept constant (500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Experiments of different light sources (260 W mixed lamp, 125 W mercury lamp, 20W UV lamp, and 125 W UV-C Philips lamp), saline bridge length (20-30 cm), solution volume to be treated (90-250 mL), pH (3-6-10) and Potential (0.8-6-10 V) were performed at 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of hormone and 0.1 M de Na_2SO_4 .

The dimensionally stable electrode (DSA) (Ti/RuO_2) was obtained from the cooperation of an academic of the Department of Chemical Engineering. In the experimental studies an electrode measured 16 cm^2 total surface with a thickness of 0.1 mm was used. The saline bridge was built with a U-shaped glass tube (0.5 mm \varnothing), filled with a 4M KNO_3 solution (Merck), gelled in 1% agarose.

4.3.1.-Electrochemical measurements and photooxidations

Pulse voltammetry and cyclical voltammetry (scanning rate = 0.1 V/s) was performed in order to observe the electrochemical performance of the hormones in the scanning range of 0 to 1 V, whereas for photoelectrooxidations of the solutions, the bulk electrolysis modality with coulometry was used. The equipment used was an Electrochemical Analyzer (HCH Instruments), using the CHI 821C software, connected to a computer. The working electrodes were dimensionally stable electrode (16 cm^2 area, 0.1 mm thickness) against stainless steel electrode and Ag/AgCl electrode as counter and reference electrode, respectively, because potentiostatic oxidation was used

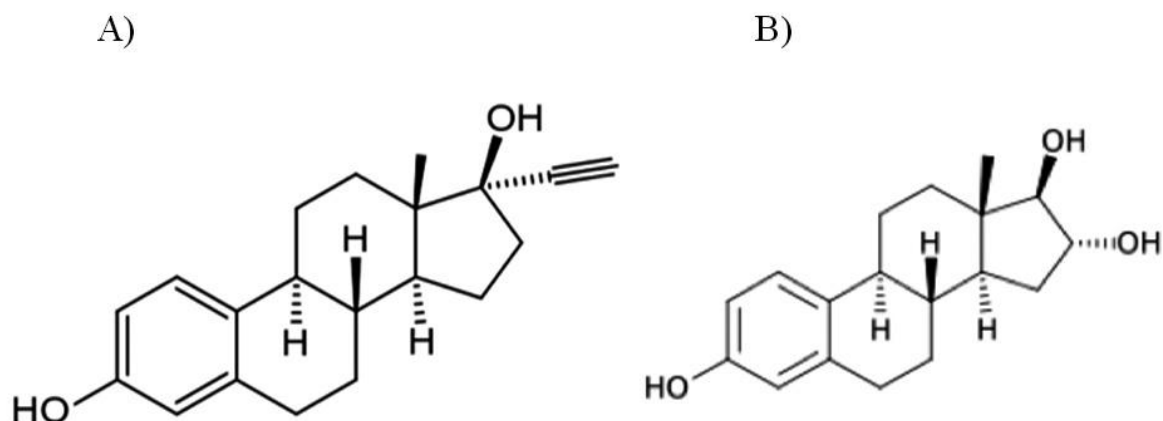


Figure 4.1: Chemical structure of 17 α -Ethynylestradiol (A) and Estriol (B).

All photoelectrooxidations were performed in divided cells, whose content was continuously stirred with magnetic stirrer. The anode was illuminated with different light sources (mixed lamp, 20 W UV, 125 W UV) at a distance of 8 cm from the anode. This is different from the classic oxidation cells in which a single two-electrode cell is used (anode and cathode without reference electrode). This configuration was preferred to avoid the appearance of parasitic reactions in the cathode.

Anode and cathode were separated by a saline bridge (glass tube 4M gelled KNO_3). After each experiment, electrodes were washed with acetone/water (50 – 50 %v/v) and electrolyzed with diluted H_2SO_4 (0.5 M) for 5 minutes and then rinsed with abundant Milli Q water. Samples were taken every 5 minutes, which were filtered and injected in high resolution liquid chromatographer (HPLC).

4.3.2.- Analysis of Estriol and 17 α Ethynylestradiol by high resolution chromatography (HPLC).

Concentrations of E3 and EE2 were measured by HPLC (YL Clarity 9100). Separations were performed in an RP-C8 column (125 mm X 4.6 mm, particle size, 5 μm). On the other hand, the mobile phase was acetonitrile / water (50:50 v/v) at a flow of 1 mL min^{-1} . The injection volume was 20 μL and the working wavelength for the quantitative analysis was

200 nm. Retention time of E3 was 2.05 min and for EE2 was 5.71 min. The relative standard deviations (RSD) ranged from 0.92 and 3.93% for E3 and 0.46 to 7.8 for EE2, in the range of concentrations between 20 and 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. The linear adjustment of the calibration curve was $R^2 > 0.99$.

4.4.- Results and discussion

4.4.1.- Pulse and cyclic voltammetry

Pulse and cyclic voltammetry (0 – 1 V), of 200 mg L^{-1} for E3 and EE2 in 0.1 M Na_2SO_4 , shows a defined oxidation peak around 0.62 and 0.68 V against Ag/AgCl (Fig. 4.2). In inverse exploration 1 – 0 V no peak corresponding to the reduction is observed. This suggests that the electrochemical oxidation of E3 and EE2 in Ti/RuO₂ is totally irreversible.

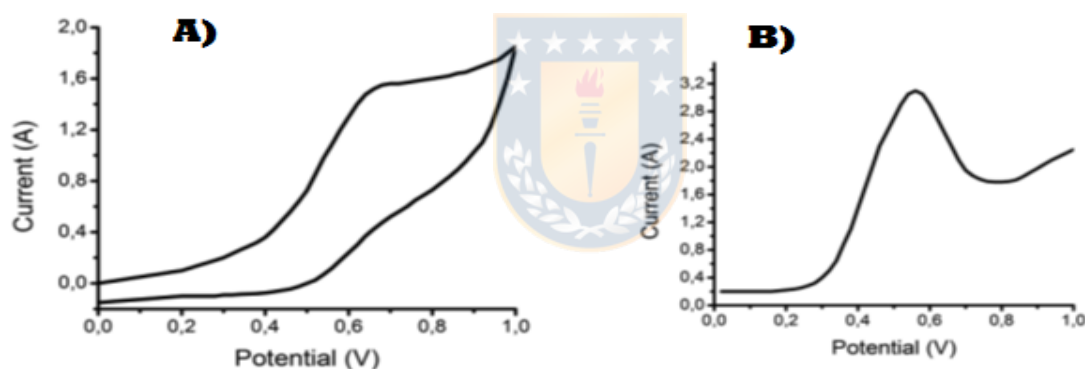


Figure 4.2 Cyclic (A) and pulse (B) voltamperogram of 200 mg L^{-1} E3, 0.1 M Na_2SO_4 .

4.4.2.- Effect of light source

In this experience, the removal efficiency of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of hormones, with and without exposition to different sources of artificial lights was compared. As can be observed in Figure 3, in the experiments performed in absence of light (electrolysis), removals of 40% for E3 and 25% for EE2 were obtained at 120 min of reaction (0.8 V, 0.1M Na_2SO_4 , pH 6), with degradation rates 6-7 times lower for E3 and EE2 at 90 min reaction, respect to experiments performed with 125 W ultraviolet radiation. In the latter conditions, higher

removals up to 100% for E3 and 92% for EE2 can be obtained after 120 min of reaction (125 W UV-lamp) (Figure 3). When comparing artificial light sources, differences are also evidenced. By using lamps that emit in the visible light spectrum (mixed lamps), radiations 3-4 times higher for E3 and EE2 are obtained after 60 min of reaction, respect to the 125 W UV light source. Finally, if UV Light sources with different power are compared, it will be evidence that the speed of the reactions will be favored at higher powers, this due to the higher number of target photons/molecules.

The degradation of hormones in water under different experimental conditions have been studied in several works and in general, the photolysis achieves degradations in the range of 1-35% for EE2. Results will depend on the type of matrix, power of the light source, and the concentration of the compound, as well as the intrinsic properties such as its molar extinction coefficient and its quantum performance (Cedat, B *et al.*, 2016), though in general the removals are insignificant.

In river water, the average lifetime of EE2 is at least 10 days, with daily exposures of 12 hours at sunlight. However, this type of natural system where no control of all variables can not be maintained, degradation is limited for instance, by the turbidity of the water and attenuation of light in the depths, among other variables (Racz, L., 2010). Better results have been reported in other works in the degradation of endocrine disrupting compounds, but when combined with Iron, H₂O₂, TiO₂, O₃, among others. Thus, the removal % of BPA can be increased from 60% through photolysis until 100% at 60 min with self-organized matrix nanotubular TiO₂ electrodes, using a 125 W mercury lamp, 1.5 V at pH 6 (Brugnera, Rajeshwar *et al.*, 2010).

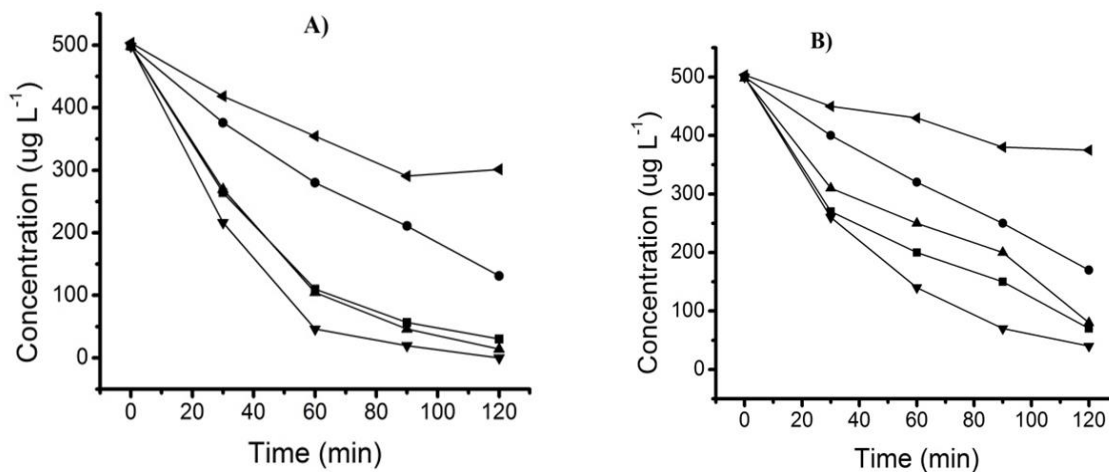


Figure 4.3 Effect of Light, on the degradation of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de E3 (A) and EE2 (B), with UV lamp 20 W. (■), mixed lamp. 260 W (●), mercury lamp 125 W (▲), UV lamp 125 W (▼), electrolysis (◄) at 0.1 M Na_2SO_4 , pH 6, 0.8 V.

4.4.3.- Saline bridge configuration effect and solution volume

When performing experiments varying the solution volume and keeping constant the concentration of hormone (500 $\mu\text{g L}^{-1}$), supporting electrolyte (0,1M) at a voltage of 0.8 V, an increase in the removal at a volume of 90 mL can be observed (Fig. 4.3). This can be due to the shorter path of the analyte to the electrode, in comparison to the distance between what the analyte must travel in a larger size reactor.

When the reactor is 90 mL, high removals of the species under study are obtained especially in the first minutes of reaction, which would indicate that the removal is a first-order reaction. Another factor to be considered is that the electrode is the same for both cases, having the same contact surface but for a larger volume. These results (250 mL) could be improved by increasing the size of the electrode, proportionally to the increase in volume.

Regarding the configuration of the saline bridge, a greater longitude favors removals, since there is more KNO_3 being driven through it (Racz, L., 2010; Salazar, C *et al.*, 2012; Zaror, C *et al.*, 2011).

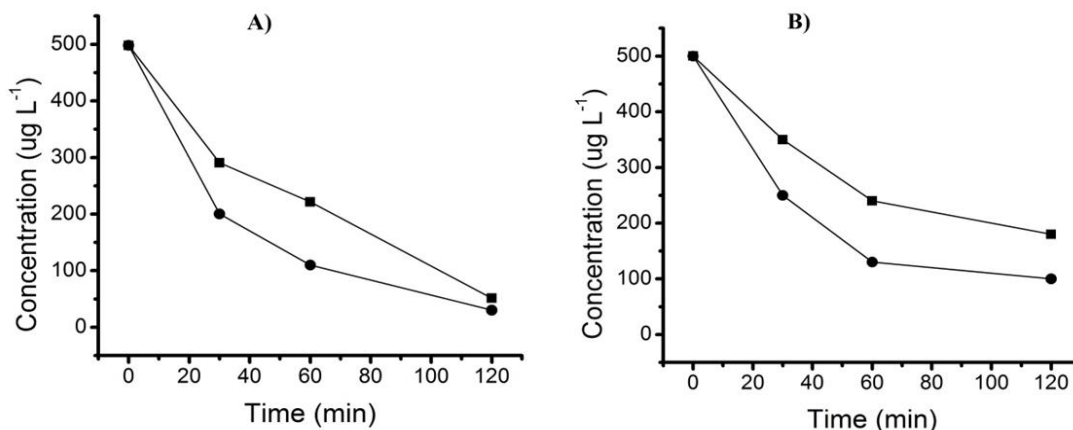


Figure 4.4 Effect of saline bridge length on the removal of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of E3 (A) and EE2 (B) with S.B.1 (■) and S.B.2 (●) at 0.8 V, 0.1 M of Na_2SO_4 , pH 6.

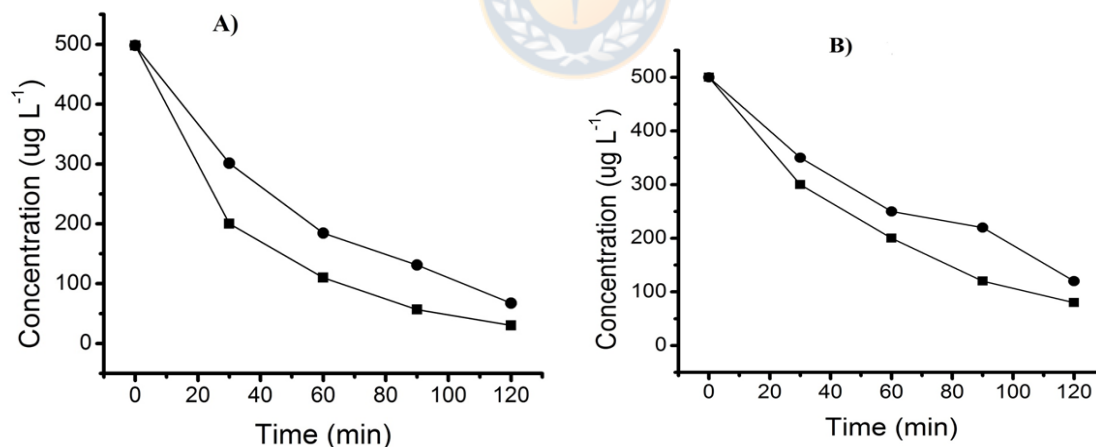


Figure 4.5 Effect of the volume of the solution to be treated in the removal of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de E3 (A) and EE2 (B) with 90 mL (■), 250 mL (●) solution, at 0,8 V, 0,1 M of Na_2SO_4 , pH 6.

4.4.4.- Effect of the supporting electrolyte concentration

When carrying out the experiences of hormone removal ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), 0.8 V , at different concentrations of Na_2SO_4 , removals higher than concentrations of 0.1 M are obtained, as well as a significant decrease, for instance at 0.5 M de Na_2SO_4 . This suggests that at these concentrations the work is being performed with an excess of electrolyte, which causes an increase in the viscosity of the medium and hence, a lower transport of analyte to the electrode and a lower removal. In the work by Brugnera (Brugnera, M., *et al.*, 2010), the effect of the supporting electrolyte is also studied, but at lower concentrations. Thus, a maximum of mineralization at concentrations of 0.1 M are obtained.

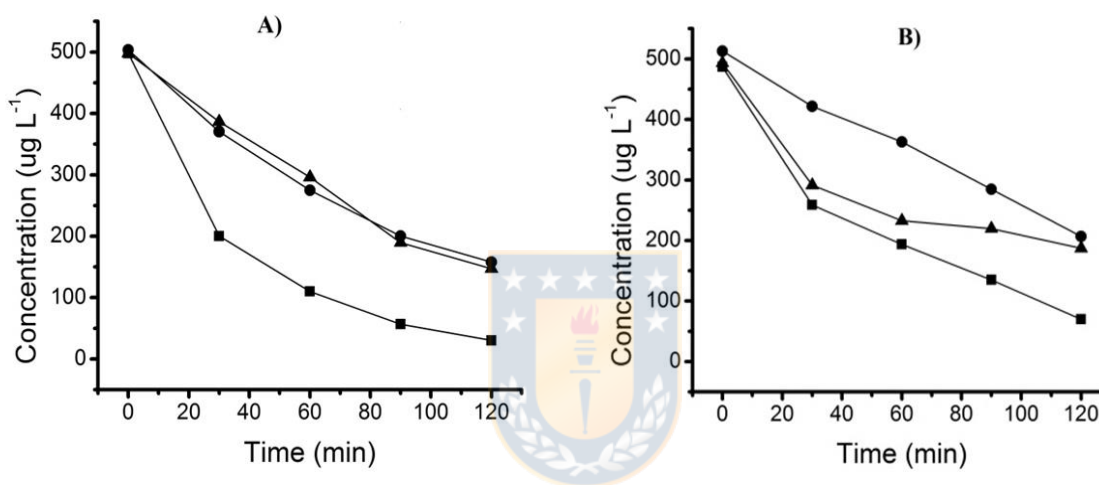


Figure 4.6 Effect of the variation of concentration of the supporting electrolyte (Na_2SO_4) in the removal of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of E3 (A) and EE2 (B) with 0.1 M (■), 0.25 M (●), 0.5 M (▲) Na_2SO_4 at 0.8 V , pH 6.

4.4.5.- Efecto de la variación de pH

Removal of hormones is directly affected by pH. Thus, it can be observed in Figure 4.7 that as pH increases, removals also do so. The above is explained by observing the chemical structures of hormones (Figure 4.1), which are weak acids, with a $\text{pK}_a > 10$. This indicates that they are fully ionized at a $\text{pH} > 10$, leaving the structure negatively charged and it will facilitate the displacement to the anode (positively charged) where the removal takes place.

On the other hand, the isoelectric point of RuO_2 is found at pH 6.5, which indicated that E3 and EE2 are preferentially absorbed when the surface of RuO_2 is in the charged form (Zanoni, M *et al.*, 2003).

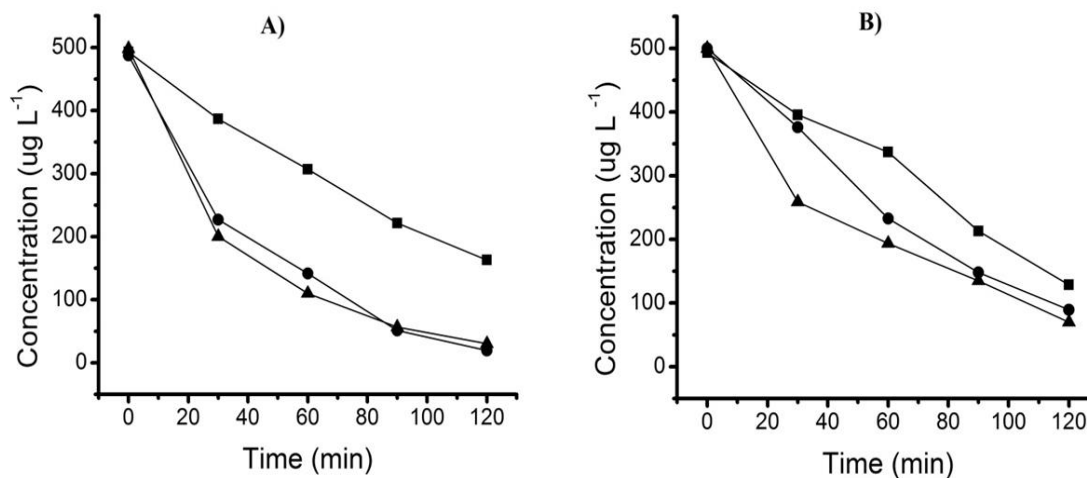


Figure 4.7 Effect of pH variation on the removal of $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of E3 (A) and EE2 (B) at pH 3 (■), pH 10 (●), pH 6 (▲), with 0.8 V and 0.1 M Na_2SO_4 .

4.4.6.- Efecto de la variación del potencial.

By varying the potential applied to the photoelectrochemical removal of E3 and EE2 it can be observed that the best removal potentials are found at a potential of 0.8 V compared to higher voltages. This can be attributed to the predominance of collateral parasitic reactions, such as the reaction of evolution of oxygen. This trend can be observed in other studies such as that by Nájera, H *et al.*, 2016, where they refer to the influence of the density of the applied current on the removal efficiency of a GES-EE2 mixture. In this study, three levels of densities of current of 16, 32 and 48 mA cm^{-2} were tested. As shown here, in some cases as the density of current increases (48 mA cm^{-2}), a limit value will be reached, where the reaction stabilizes. In other cases, there is a decrease in the efficiency of the anodic oxidation, so the density of the current and voltage is not capable to control the efficiency of the oxidative system.

On the other hand, although the potential applied is low, it is still more positive than the flat band potential, so there is a potential gradient on the film of ruthenium oxide, which will result in an electric field that keeps the photogenerated charges. Therefore, the adsorption of E3 and EE2 and/or the generation and separation of electron-hole pairs that are accelerated under this gradient will be favored. Thus, a quick decomposition is promoted (Rajeshwar and Ibanez 1997).

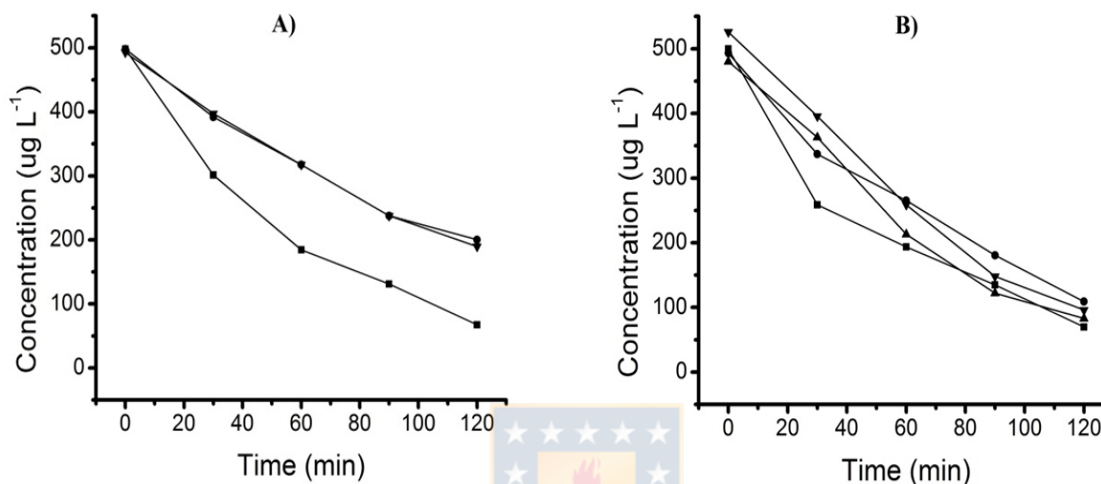


Figure 4.8 Effect of variation of potential on the removal of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de E3 (A) at 0,8 V (■), 3 V (●) and 10 V (▼) and EE2 (B) at 0,8 V (■), 3V (●), 6 V (▲) and 10 V (▼) at 0,1 M Na_2SO_4 , pH 6.

4.4.7. Effect of substrate variation concentration

A total of three concentrations of E3 and EE2 (500, 750, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$) were studied to observe the effect of concentration on the removal on the surface of the Ti/RuO₂ electrode. Figure 9 shows concentration removal with the decrease of the initial concentration. Thus, it is observed in Fig. 4.9 A that the removal at 30 min is five times higher when working at concentration 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ than 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, and double removal of concentration at 120 min of reaction.

For EE2 (Figure 4.9B) as well as estriol, removals are favored at lower initial concentration, doubling at 120 min of reaction at 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ compared to 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. It is known that an increase in the initial concentration of a compound increases its

concentration gradient and the mass transference through the diffusion layer and therefore, its degradation in the electrode. However, many times the electrode is saturated at high concentrations of the analyte (Coleman, H *et al.*, 2005) or the electrogenerated hydroxyl radicals are depleted due to competitive reaction for the OH radical. This leads to a parallel consumption of it, for example the oxidation of many compounds (intermediates) with OH (Boye, B., *et al.*, 2006).

On the other hand, the degradation profile follows the performance first-order kinetics, where reaction rates depend on the concentration as concentration increases (500 to 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the degradation rate decreases. This leads to a decrease in the kinetic coefficient of 0.023 to 0.006 min^{-1} for E3 and 0.016 to 0.006 min^{-1} for EE2.

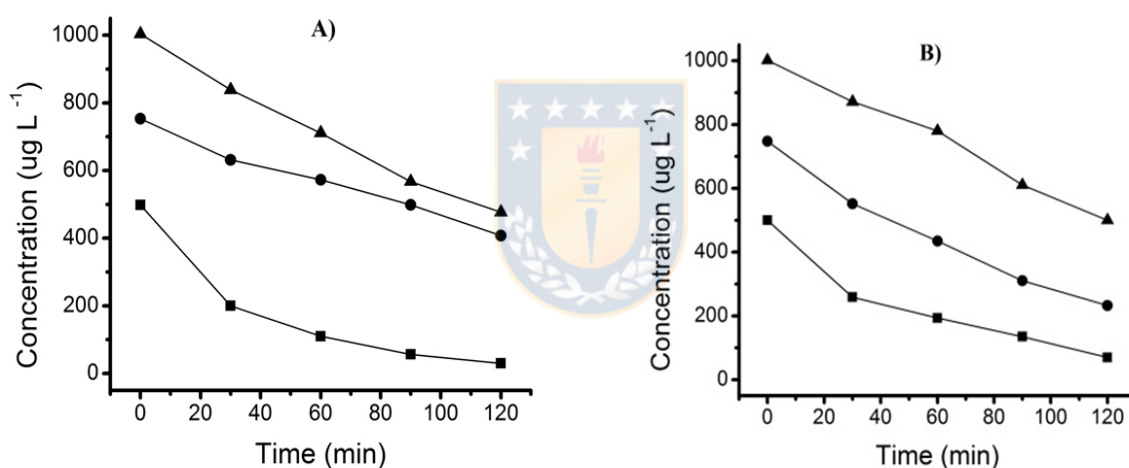


Figure 4.9. Effect of the concentration variation of E3 (A) and EE2 (B) at 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■), 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ (●), 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (▲) with 0.8 V, 0.1 M Na_2SO_4 , at pH 6.

4.5.- Conclusions

There are different variables that affect the removal of E3 and EE2. Thus, it can be concluded that a greater length of the saline bridge (30 cm) and smaller volume of solution (900 mL) favor the removals of hormones, especially during the first 30 min of reaction. In turn, the source light has direct implications on the efficiency of percentages of removal, as well as the light source with 125 W of power. This allows us to obtain removals greater than 90%, at a potential of 0.8 V, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de hormone, natural pH and 0.1 M of Na_2SO_4 .

On the other hand, the effect of concentration of the supporting electrolyte allows concluding that 0.1 M concentration of Na_2SO_4 is more effective than higher salt concentrations. The pH is also a significant factor, since at higher pH; removals also increase, favoring the transport of the analyte to the anode (see discussion).

Regarding the effect of the potential, lower potentials (0.8 V) present better efficiencies in the percentages of removal (30% higher at 120 min of reaction) respect to 3 V and 10 V. However, no significant differences are observed for EE2 at 120 min when using potentials of 0.8-6-1 V. This concludes that 0.8 V is more efficient, also due to an economic factor.

Finally, concentrations of 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ allow obtaining removals of Estriol five times higher than for 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ and double removal for EE2 at 120 min of reaction.

4.6.-Aknowledgmens

The authors are grateful for the financial support provided by FONDECYT 1120815 VRID 216.024.039, 215.071.063.

Naysa Díaz thanks CONICYT for Doctoral Grant and Thesis in the Industry Project 781412007

4.7.- References

- Aris, A., Shamsuddin, A., & Praveena, S. (2014). Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment international*, 69, 104-119.
- Boye, B., Brillas, E., Marselli, B., Michaud, P., Comninellis, C., Farnia, G., & Sandonà, G. (2006). Electrochemical incineration of chloromethylphenoxy herbicides in acid medium by anodic oxidation with boron-doped diamond electrode. *Electrochimica acta*, 51(14), 2872-2880.
- Brugnera, M., Rajeshwar, K., Cardoso, J., & Zanoni, M. (2010). Bisphenol A removal from wastewater using self-organized TiO₂ nanotubular array electrodes. *Chemosphere*, 78(5), 569-575.
- Cédac B., De Brauer, C., Métivier, H., Dumont, N., & Tutundjan, R. (2016). Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Research*, 100 (1), 357-366.
- Clouzot, L., Marrot, B., Doumenq, P., & Roche, N. (2008). 17 α -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental Progress*, 27(3), 383-396.
- Domenech, X., Jardim, W., y Litter, M. (1998). "Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogénea", Miguel A. Blesa (Ed.), Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes, Red Cydted VIII, Buenos Aires, pp. 3-26
- Coleman, H., Abdullah, M., Eggins, B., & Palmer, F. (2005). Photocatalytic degradation of 17 β -oestradiol, oestriol and 17 α -ethynloestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. *Applied Catalysis B: Environmental*, 55(1), 23-30.
- Huang, C., Dong, C., & Tang, Z. (1993). Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. *Waste management*, 13(5), 361-377.
- Johnson, A., & Williams, R. (2004). A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental science & technology*, 38(13), 3649-3658.
- Klavarioti, M., Mantzavinos, D., & Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment international*, 35(2), 402-417.
- Kavlock, R., Daston, G., De Rosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M., Maczka, C. (1996). Research needs for the risk assessment of health

and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. *Environ. Health Perspect*, 104 (4), 715–740.

Liu, Z., Kanjo, Y., & Mizutani, S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the Total Environment*, 407(2), 731-748.

Nájera, H., Gutiérrez, R., González, R., García, C., Méndez, R., & Rojas, M. (2016). Degradation of gestodene (GES)–17 α -ethinylestradiol (EE2) mixture by electrochemical oxidation. *Journal of Water and Health*, 14(6), 980-988.

Parks, L., Lambright, C., Orlando, E., Guillette, L., Ankley, G., & Gray, L. (2001). Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological Sciences*, 62(2), 257-267.

Racz, L., & Goel, R. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(1), 58-70.

Rajeshwar, K., & Ibanez, J. (1997). *Environmental electrochemistry: Fundamentals and applications in pollution sensors and abatement*. Academic Press. Chapter 7

Salazar, C., Zaror, C., Mondaca, M., Gonzalez, P., Mansilla, H., Pena, P. (2012). Advanced Electrochemical Oxidation of Ultrafiltration Permeates from Cellulose Bleaching Effluents. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 15 (2), 254-265

Zanoni, M., Sene, J, & Anderson, M. (2003). Photoelectrocatalytic degradation of Remazol Brilliant Orange 3R on titanium dioxide thin-film electrodes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, 157(1), 55-63.

Zaror, C., Salazar, C., Araneda, E., Mondaca, M., Mansilla, H., Pena, C. (2011). Electrochemical Treatment of Segregated Effluents from the D-Stage in ECF Kraft Cellulose Bleaching. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 14 (1), 47-53.

CAPITULO 5**ELECTROXIDACIÓN, FOTOELECTROXIDACIÓN Y FOTOFENTON
REACCION EN LA DEGRADACION DE ESTRIOL Y ETINILESTRADIOL CON
ELECTRODOS DE Ti/RuO₂ – ACERO INOXIDABLE Y EVALUACION DE
ACTIVIDAD ESTROGENICA MEDIANTE ENSAYOS E-SCREEN.****5.1.- Resumen**

Los disruptores endocrinos son agentes exógenos que interfieren con la función normal del sistema endocrino. Al estar presentes en el ambiente pueden provocar efectos tales como; feminización de peces, presencia de tumores, disminución de la fertilidad. En las plantas de tratamientos de agua pueden ayudar a la formación de cepas bacterianas resistentes, permitir la formación de especies más tóxicas y finalmente pueden retornar a la red de agua potable. Es por ello la importancia de contar con tratamientos de aguas que sean capaces de eliminar de forma efectiva estos contaminantes y de pruebas post tratamiento que den cuenta de esto. El ensayo E-screen es un ejemplo de la manera en que la proliferación celular puede usarse para determinar la estrogenicidad de muestras de agua. En el presente estudio los procesos de Electrooxidación, Fotoelectrooxidación, y Foto Fenton, fueron optimizados mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), para poder evaluar como la concentración de Na₂SO₄, H₂O₂, Fe (II), Voltaje y pH, afectan los porcentajes de degradación y mineralización de E3 y EE2 en el tiempo. Los rangos de trabajo para realizar los diseños experimentales por Electrooxidación y Fotoelectrooxidación fueron: Na₂SO₄ (0,05-2,5 M), voltaje (0,6-3) y pH (4-10) y las condiciones óptimas encontradas para la degradación de 500 µg L⁻¹ de solución de E3 y EE2, fueron: pH 10, concentración Na₂SO₄ 0,05 M/0,1353 M, voltaje 1,6/1.5 A, obteniendo degradaciones de 47-64 % (E3/EE2) por Electrooxidación, 85-95% (E3/EE2) por Fotoelectrooxidación, con mineralizaciones de un 29 % (Electrooxidación) y 84% (Fotoelectrooxidación). Los ensayos E-Screen muestran casi nula estrogenicidad (Crecimiento similar al control negativo) a los 180 min de reacción por Fotoelectrooxidación a diferencia de Electrooxidación donde la actividad estrogenica es predominante hasta finales de la reacción.

Los resultados obtenidos por los procesos electroquímicos fueron comparados con los resultados de la tradicional Foto Fenton, donde las variables y rangos estudiados fueron los siguientes: H_2O_2 (0,6-4) y Fe (II) (1-5), donde las mejores condiciones fueron 4-5 mg L^{-1} de H_2O_2 y Fe (II), con degradaciones de 82-90 % (E3/EE2) y mineralizaciones de un 31%.



5.2.- Introducción

Los estrógenos naturales estradiol, estrona, y estriol, junto con el etinilestradiol estrógeno sintético, se conocen como las fuentes más importantes de la actividad estrogénica en muestras ambientales (Onda *et al* 2003), son frecuentemente detectados en muestras de agua y normalmente sus concentraciones en las aguas residuales no exceden unos pocos ng/L (Jenkins *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2002). Desde el año 2015 son parte de la lista de vigilancia de la directiva marco del agua (WFD) de la Union Europea (Decision 2015/495, desde 24 de marzo 2015), lo anterior se ha logrado gracias a las investigaciones sobre los efectos e incidencia de estos compuestos en el ambiente, por ello también, desde hace décadas se ha trabajado en impulsar el desarrollo de nuevas tecnologías de purificación de aguas (Maldonado *et al.*, 2004, Seoanez., 1999), estas tecnologías se han generado bajo la premisa de que los métodos más deseables para tratar residuos son aquellos que a un bajo costo son capaces de eliminar los compuestos contaminantes residuales o transformarlos en materiales inocuos al hombre y a la naturaleza (Marquez *et al.*, 2000) y que sean eficaces, ya sea eliminando al contaminante, o no produciendo sustancias de alta toxicidad, como en el caso de la cloración, que tiende a generar compuestos halogenados (Rodríguez *et al.*, 1997). Por otra parte, los tratamientos biológicos con lodos activados son utilizados extensamente debido a su bajo costo. Sin embargo, son poco eficientes frente a sustancias no biodegradables o en presencia de compuestos de alta toxicidad como antibióticos, pesticidas, compuestos fenólicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos. Alternativamente a los métodos convencionales se cuenta con los procesos de oxidación avanzada, entre los que podemos encontrar los sistemas Fenton y Foto- fenton (colombo *et al* 2011), la fotocatalisis homogénea y heterogénea (Czech y Rubinowska., 2013), procesos electroquímicos (Sirés *et al.*, 2010), ozonización (Qiang, Z *et al.*, 2013), entre otros, la principal ventajas de las tecnologías de oxidación avanzada es que no solo cambian de fase al contaminante, sino que lo transforman químicamente, logran buenas mineralizaciones y son muy útiles para contaminantes refractarios resistentes a otros métodos de tratamientos (Liu *et al.*, 2009).

Los ensayos biológicos por su parte han sido utilizados como una herramienta para detectar y monitorear la actividad estrogénica de los compuestos disruptores endocrinos, y ofrecer

un enfoque alternativo para la evaluación de los impactos potenciales que ellos puedan generar. La detección de la actividad estrogénica en los ensayos “in vitro”, se puede llevar a cabo mediante un gran número de mecanismos como la proliferación celular, la inducción de la producción de vitelogenina, o la inducción de genes reporteros en organismos recombinantes. Los ensayos más conocidos son: el E-Screen (proliferación de células) y los ensayos ERE (Estrogen Receptor Elements), YES (Yeast Estrogen Screen) en los cuales se inducen genes específicos de organismos recombinantes (Singhal *et al.*, 2009). El ensayo E-screen es un ejemplo de la manera en que la proliferación celular puede usarse para determinar la estrogénicidad de muestras de agua. En este ensayo se cuantifica el efecto sobre la mitosis de células MCF-7 de cáncer de seno, al tener contacto con compuestos estrogénicos (Soto *et al.*, 1995).

Los métodos biológicos del tipo E-screen pueden ser utilizados sin problema en conjunto con metodologías químicas, de manera de poder analizar la actividad estrogénica de compuestos químicos presentes en una fuente de agua, siendo una medida de control y una medida de la eficiencia de los distintos procesos a los cuales son sometidos las aguas servidas en una planta de tratamiento. La aplicación de los ensayos E-screen son múltiples, han sido utilizados en análisis ambientales de compuestos disruptores endocrinos en muestras de efluente de plantas de tratamientos de aguas servidas, muestras de efluentes de aguas servidas de la industria textil, así como también para determinar la estrogénicidad de los constituyentes de desodorantes de uso cosmético (Claudia Lange, *et al* 2014). Pueden ser utilizados en combinación con técnicas como la extracción con barras de agitación (C. Bicchi, *et al* 2009), ensayos in vitro como el de gen reportero de luciferasa (Tiziana Schilirò, *et al* 2012), y con técnicas instrumentales como cromatografía de gases o líquido, con detector de masas, entre otras.

La degradación por POAS de Estriol y Etinilestradiol ha sido estudiada a través de la utilización de diferentes técnicas, por ejemplo usando ánodos de BDD, donde se han logrado degradaciones de un 100 % para EE2 ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) en tan solo 7 min de reacción (Frontitis *et al* 2011), con densidad de corriente de 21 mA cm^2 y superiores al 99 % para sistema $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de EE2, pH:3, $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$) (Guedes *et al* 2008), por otro lado

Zhou H et al 2015, obtuvo 63,9 % de degradación de EE2 en 12 min de reacción mediante el sistema O₃/UV (30 mg L⁻¹ O₃, 15 W/254 nm) y el equipo de Frontistis Z y col., 2015, degradaciones del 86% (100 µg L⁻¹ de EE2) en 60 min, con un sistema solar/FE⁺², mientras que para el sistema H₂O₂/UVC (10 mg L⁻¹) la eliminación fue completa en 30 min; sin embargo las mineralizaciones y disminución de la actividad estrogénica sólo fue de un 6 y un 35% respectivamente, por otro lado en el estudio de Cedat B y col., 2016, se logra que un 80% de los compuestos estrogénicos iniciales y la actividad estrogénica puedan eliminarse del agua residual tratada, combinando UV/H₂O₂ (254 nm, 423 y 520 Mj/cm² con 50 y 30 mg L⁻¹ de H₂O₂).

Estríol por su parte es el de menor potencia estrogénica dentro de los cuatro estrógenos mayormente encontrados en aguas, pero no deja de ser importante evaluar su degradación por nuevas tecnologías como las POAS, ya que éste no es removido totalmente desde las plantas de tratamientos de aguas residuales (Belhaj, D et al 2015) y se conoce que los procesos de fotólisis solar sólo elimina un 50 % en un periodo de 40 días (Fonseca et al 2011), al utilizar luz UV estos porcentajes aumentan a un 74% (Huang, B et al 2013), y con otras tecnologías como fotocátalisis con P25/UVA se obtienen 25 % de degradación, este porcentaje aumenta al utilizar una fuente de luz UVC a un 60% (Puma, G et al 2010), por otro lado al combinar POAS, por ej O₃/H₂O₂/UV (1:1,6, 230 W) se degrada un 98% de E3 (efluente secundario) Pešoutová, R. y col 2014, similar a lo que se obtiene utilizando H₂O₂/UV (94% con 0.018 mol L⁻¹, 70 W) Zhang, A y col., 2014.

En vista de esta información, el presente artículo tiene por objetivo optimizar los procesos de Electrooxidación, Fotoelectrooxidación, y Foto Fenton mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), para poder evaluar como la concentración de Na₂SO₄, H₂O₂, Fe (II), Voltaje y pH, afectan los porcentajes de degradación y mineralización de E3 y EE2 en el tiempo y a continuación evaluar la actividad estrogénica de las aguas tratadas por las técnicas antes mencionadas, a través de ensayos E-Screen.

En el trabajo se muestran los datos obtenidos de la degradación de E3 y EE2 a través de la oxidación anódica usando electrodos de Ti/RuO₂/ acero inoxidable. Las variables

estudiadas fueron la concentración del electrolito soporte, pH del medio de reacción y el potencial, esto para determinar bajo que condiciones se alcanzan mayores degradaciones, mineralizaciones y disminución de la actividad estrogénica.

5.3.- Materiales y métodos

5.3.1.- Degradación de Estriol y Etinilestradiol

Las Electrooxidaciones y Fotoelectrooxidaciones de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de solución acuosa de E3 y EE2 (Sigma Aldrich, pureza > 97%) se llevaron a cabo en un reactor de celdas divididas, con capacidad de 250 mL, conectado a través de puente salino de KNO_3 (4M) gelificado en agarosa (1M). El ánodo utilizado fue de Ti/RuO_2 con un área total de 16 cm^2 , contra electrodo de acero inoxidable y electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, se ocupó la modalidad bulk electrolysis with coulometry con el equipo HCH Instruments, Electrochemical Analyzer, utilizando el programa CHI 821C conectado a un computador. Para las degradaciones de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de E3 y EE2 por Foto Fentón, se ocuparon soluciones patrones de 40 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y de 150 mg L^{-1} de H_2O_2 . La solución a degradar se acidificó a pH 3 con H_2SO_4 y se les adicionó Na_2SO_3 (2M) para detener la reacción, finalmente se ajustó pH (6,5) con tampón fosfato, antes de inyectar las muestras al cromatografo líquido.

Las soluciones a degradar fueron agitadas durante todo el proceso con agitador magnético e iluminado con lámpara UV (125 W PHILIPS) a una distancia de 8 cm. El tiempo total de reacción fue de 120 min y el porcentaje de degradación de la solución se calculó como se muestra en la ecuación 1, donde C_0 representa la concentración inicial y C representa la concentración final de E3 y EE2. Las degradaciones fueron seguidas cada 30 minutos, por HPLC-UV (YL Clarity 9100, equipado con una columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, 5 μm). La fase móvil fue acetonitrilo / agua (50:50, v/v), a un flujo de 1 mL min^{-1} . El volumen de inyección fue de 20 μL a una longitud de 200 nm y las concentraciones se determinaron por interpolación en la curva de calibración respectiva. La mineralización (COT) se midió en el equipo Vario TOC select, donde la muestra líquida es directamente inyectada dentro de un reactor de combustión a 900°C en una corriente de aire

transportadora de gas. El gas es secado, su flujo es estabilizado y medido mediante un detector infrarrojo no dispersivo (NDIR). Un PC calcula la concentración total de carbono (TC) a partir de la señal de CO₂ medida de la muestra. El carbono inorgánico (TIC) se puede medir automáticamente acidificando la muestra y detectando el CO₂ liberado y el contenido total de carbono orgánico (TOC) se calcula a partir de la diferencia de TC y TIC.

$$\% R = (C_0 - C) / C_0 * 100 \quad (\text{Ec } 1)$$

5.3.2.- Análisis multivariado

El método de análisis multivariado consistió en hacer un número mínimo de experimentos (2³ experimentos y de 2² por RMS) de forma simultánea modificando las variables que afectan a la eficiencia de la degradación del Estriol y Etinilestradiol (pH, voltaje, concentración de Na₂SO₄ en el caso de las Electrooxidaciones y concentración de H₂O₂ y Fe (II) para Foto Fentón) con el fin de cuantificar los efectos que tienen cada una de las variables anteriores en la degradación, tanto como efectos de primer orden, segundo orden e interacciones de manera de encontrar las condiciones en las cuales la degradación es favorecida. Los resultados fueron analizados por el software modde 7.0 el cual arrojó una expresión polinómica y superficie de respuesta que representa al sistema en estudio.

La respuesta fue medida como el porcentaje de degradación de Estriol y Etinilestradiol a los 60 min de reacción.

5.3.3.- Variables y rangos del diseño de experimentos

Tabla 5.1 Rangos de trabajo procesos de Electrooxidación y Fotoelectrooxidación

Variables	Rangos
pH (X ₁)	4 – 10
Electrolito (X ₂)	0,05 – 0,25
Voltaje (X ₃)	0,6 – 3

Tabla 5.2 Rangos de trabajo proceso Foto Fenton

Variablen	Rangos
Peróxido (X ₁)	0,6 – 4
Hierro (X ₂)	1 – 5

5.3.4.- Cultivo celular y ensayo de proliferación de la línea celular

La línea celular de adenocarcinoma de mama humano positivo para receptores de estrógeno MCF7, se adquirió de la colaboración del Dr. Ariel Castro, del Departamento de Biología Celular, perteneciente a la Universidad de Concepción (Concepción- Chile). Las células MCF7 fueron sembradas en placas de 100 mm de Ø, utilizando un medio esencial (MEM) modificados con 10% de suero fetal de bovino (FBS), 1% de glutamina y 0,5 %, de penicilina + estreptomycin, para luego ser incubadas a 37° C, 5% CO₂, por 5 días. Seguido a ello se realizó el Split (resiembra), donde se remueve el medio por aspiración, se lavó con 1 mL PBS 1X, se agregó 500 uL de tripsina 5X para remover las células y finalmente para inhibir la tripsina se agregó 3 mL de MEM completo y se homogeniza. Por último, con 10 uL de colectado, se realizó conteo de células MCF7 con cámara de Neubauer.

Para ver el efecto de los tratamientos de Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidacion y Fotoelectrooxidacion, se diluyeron 750 µL de células MCF7 (obtenidas del Split) con 12,25 mL de medio, para completar un volumen final de 13 mL. Se sembraron 25 mil células por pocillo (24 pocillos) tomando 500 µL de MCF7, previamente diluida y se le adicionaron las muestras tratadas por los tratamientos de Electrooxidación y Fotoelectrooxidacion a distintos tiempos, se incluyeron controles negativos (solvente) y positivos (17-β-estradiol o E2) y se incubo a 37°C, 5% CO₂, seguidamente (24 horas) se cambió el medio y finalmente (día 6) se realizó conteo de células MCF7 con cámara de Neubauer para determinó el porcentaje de disminución o aumento de estrogenicidad, además se calculó el efecto proliferativo PE (PE=Máx n° de células en muestra / n° células control negativo), y RPE que compara la máxima proliferación inducida por una muestra con la proliferación inducida por E2 (RPE=((PE-1)_m/(PE-1)_{E2})*100)).

5.4.- Resultados y discusión

Para el diseño factorial aplicado en la optimización de la degradación de Estriol y Etinilestradiol, se consideraron variables previamente estudiadas de forma univariada (ver capítulo 4), en donde se concluyó que la degradación de estos compuestos es dependiente del pH, concentración de electrolito, concentración de los analitos y el voltaje, así como también de algunas variables físicas como las dimensiones del reactor o del puente salino. Es por el anterior estudio que en este trabajo se consideraron sólo tres variables para ser estudiadas de forma simultánea, que se creen pueden ser las más relevantes de analizar en un sistema electroquímico, como son el pH, la concentración del electrolito y el voltaje. La tabla 5.3 describe los experimentos desarrollados en el procedimiento de optimización, donde las columnas 3-5 presentan el valor real y codificado de pH, concentración de Na_2SO_4 y voltaje. Un Total de 17 experimentos fueron desarrollados de acuerdo al diseño central compuesto centrado en las caras (CCF), incluyendo 8 experimentos del diseño factorial, 6 puntos centrados en las caras, y 3 puntos centrales. Las columnas 6 – 7 y 10-11, describen el porcentaje de Estriol y Etinilestradiol degradado después de 60 min de reacción por Electrooxidación y Fotoelectrooxidación respectivamente (Y_E y Y_{EF}) y las columnas 8-9 y 12-13 describen los valores calculados. El diseño factorial Foto Fentón (tabla 5.4) se realizó con el fin de comparar resultados entre los métodos electroquímicos y esté conocido y ampliamente utilizado método como lo son los procesos Fentón o Foto Fentón, en este caso solo se consideraron dos variables, concentración de peróxido (H_2O_2) y Hierro (Fe (II)). El pH se mantuvo constante (pH 3) ya que se conoce que estas reacciones se ven favorecidas a pH ácidos. El diseño fue central compuesto centrado en las caras, con un total de 11 experimentos, donde 4 corresponden al diseño factorial, 4 son puntos centrados en las caras, y 3 puntos centrales. Las columnas 3-4 muestran el valor real y codificado de H_2O_2 y Fe (II), 5-6 describen el porcentaje de Estriol y Etinilestradiol degradado a los 60 minutos de reacción (Y_{PF}) y las columnas 7-8 el porcentaje de Estriol y Etinilestradiol calculado.

Tabla 5.3: Diseño factorial de la degradación de Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación y Fotelectrooxidación, los valores codificados para cada variable son mostrados en paréntesis. El factor de respuesta Y es definido como el porcentaje de degradación de E3y EE2 a los 60 minutos de reacción bajo condiciones de electrooxidación (Y_E) y Fotelectrooxidación (Y_{EF}).

Run	Order	pH	Na ₂ SO ₄	Voltaje	Y _E exp E3 (%)	Y _E exp EE2 (%)	Y _E calc. E3 (%)	Y _E calc. EE2 (%)	Y _{EF} exp. E3 (%)	Y _{EF} exp. EE2 (%)	Y _{EF} calc. E3 (%)	Y _{EF} calc. EE2 (%)
1	7	4 (-1)	0,05 (-1)	0,6 (-1)	14	20	10	14	65	71	65	69
2	1	10 (+1)	0,05 (-1)	0,6 (-1)	68	75	69	74	90	95	90	94
3	16	4 (-1)	0,25 (+1)	0,6 (-1)	7	13	12	21				
4	12	10 (+1)	0,25 (+1)	0,6 (-1)	61	68	60	67	90	94	90	93
5	2	4 (-1)	0,05 (-1)	3 (+1)	67	67	74	78	89	92	92	95
6	11	10 (+1)	0,05 (-1)	3 (+1)	56	61	53	60	87	92	85	91
7	14	4 (-1)	0,25 (+1)	3 (+1)	60	60	50	47	88	92	85	89
8	17	10 (+1)	0,25 (+1)	3 (+1)	49	54	48	51	87	91	89	92
9	13	4 (-1)	0,15 (0)	1,8 (0)	49	50	47	46	79	84	77	82
									91	96	89	94
11	10	7 (0)	0,05 (-1)	1,8 (0)	63	66	58	60	89	89	88	90
12	8	7 (0)	0,25 (+1)	1,8 (0)	56	59	61	65	89	89	90	92
									74	84	74	87
14	4	7 (0)	0,15 (0)	3 (+1)	58	60	64	65	84	93	84	94
15	3	7 (0)	0,15 (0)	1,8 (0)	59	62	62	63	85	90	89	93
16	9	7 (0)	0,15 (0)	1,8 (0)	59	62	53	58	85	90	82	87
17	5	7 (0)	0,15 (0)	1,8 (0)	59	62	65	70	85	90	86	90

Tabla 5.4 Diseño factorial de la degradación de Estriol y Etinilestradiol por Foto Fenton, los valores codificados para cada variable son mostrados en paréntesis. El factor de respuesta Y es definido como el porcentaje de degradación de E3y EE2 a los 60 minutos de reacción bajo condiciones Foto Fenton (Y_{PF}).

Run	Order	H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)	Fe (II) (mg L ⁻¹)	Y _{PF} exp E3 (%)	Y _{PF} exp EE2 (%)	Y _{PF} calc. E3 (%)	Y _{PF} calc. EE2 (%)
1	1	0,6 (-1)	1 (-1)	20	18	23	21
2	9	4 (+1)	1 (-1)	33	38	39	40
3	4	0,6 (-1)	5 (+1)	45	43	45	44
4	5	4 (+1)	5 (+1)	75	85	79	86
5	10	0,6 (-1)	3 (0)	32	31	29	27
6	6	4 (+1)	3 (0)	54	62	44	59
7	8	2,3 (0)	1 (-1)	33	38	30	34
8	2	2,3 (0)	5 (+1)	66	74	68	73
10	11	2,3 (0)	3 (0)	50	56	52	60
11	3	2,3 (0)	3 (0)	50	56	49	57

5.4.1.- Polinomios de respuesta

A partir de regresiones lineales múltiples, se obtienen los polinomios de respuesta (ec 2-7), donde Y_E , Y_{EF} , Y_{PF} corresponden a variables dependientes o factor respuesta, definido como el porcentaje de degradación de Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación (Y_E) Foelectrooxidación (Y_{EP}) y Foto Fenton (Y_{PF}) a los 60 minutos de reacción.

5.4.2.- Polinomios de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Electrooxidación

$$Y_E \text{ E3} = 59,45 + 10,71X_1(\pm 4,8) - 3,30X_2 (\pm 4,6) + 10X_3 (\pm 4,9) - 11,67X_3X_3 (\pm 7,7) - 16,25X_1X_3 (\pm 5,1) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$Y_E \text{ EE2} = 62,33 + 12,04 X_1 (\pm 6,2) - 3,50 X_2 (\pm 5,8) + 8,10 X_3 (\pm 6,1) - 10,24 X_3X_3 (\pm 9,7) - 15 X_1X_3 (\pm 6,5). \quad (\text{Ec. 3})$$

Las variables son definidas como:

$X_1 = \text{pH}$

$X_2 = \text{Na}_2\text{SO}_4$

$X_3 = \text{Voltaje}$

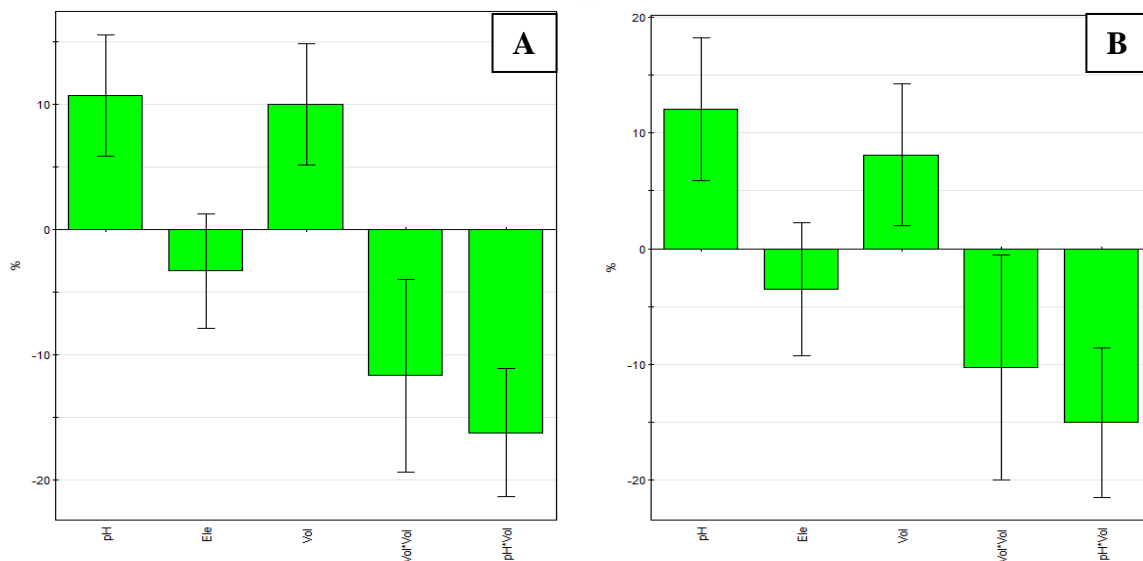


Figura 5.1 Coeficientes para la degradación de Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Electrooxidación.

Los coeficientes de cada factor indican que tan importante o influyentes son en la degradación del Estriol y Etinilestradiol, de acuerdo a esto se puede ver que las variables de primer orden más importantes que favorecen la degradación por Electrooxidación son X_1 =pH, seguido de X_3 = Voltaje. Por último se puede observar que existe un efecto cruzado de X_1X_3 (pH, voltaje) de importancia, y un efecto de segundo orden X_3X_3 (voltaje, voltaje) que son antagonicos a la degradación.

5.4.3.- Polinomios de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Foelectrooxidación

$$Y_{EP E3} = 84,71 + 5,90X_1 (\pm 0,96) - 0,10X_2 (\pm 0,96) + 5,10X_3 (\pm 0,96) + 3,98X_2X_2 (\pm 1,60) - 6,01X_3X_3 (\pm 1,60) - 6,63X_1X_3 (\pm 1,09) \tag{Ec. 4}$$

Las variables son definidas como:

X_1 = pH

X_2 = Na_2SO_4

X_3 = Voltaje

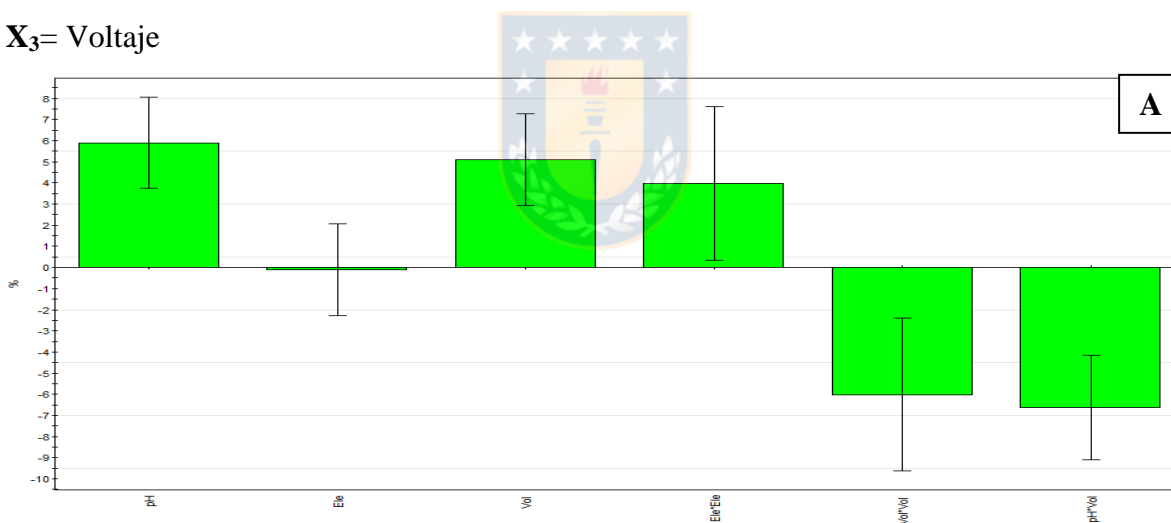


Figura 5.2 Coeficientes para la degradación de Estriol por Foelectrooxidación.

De acuerdo al polinomio de respuesta (ec 4) y grafico de coeficientes (Figura 5.2) se observa que las variables más importantes en la degradación de Estriol por Foelectrooxidación, que ejercen un efecto sinérgico son: X_1 =pH, seguido de X_3 = Voltaje, y en menor escala de importancia se observa un efecto de segundo orden del electrolito. Por otro lado existe un efecto de segundo orden X_3X_3 (voltaje, voltaje) y un efecto cruzado de

las variables X_1X_3 (pH, voltaje) que ejercen un efecto antagonico en la remoción del Estriol.

$$Y_{EP EE2} = 90,42 + 5,94X_1 (\pm 0,75) - 0,34X_2 (\pm 0,75) + 4,84X_3 (\pm 0,75) - 3,57X_1X_1 (\pm 1,11) - 6,18X_1X_3 (\pm 0,86) \quad (\text{Ec. 5})$$

Las variables son definidas como:

X_1 = pH

X_2 = Na_2SO_4

X_3 = Voltaje

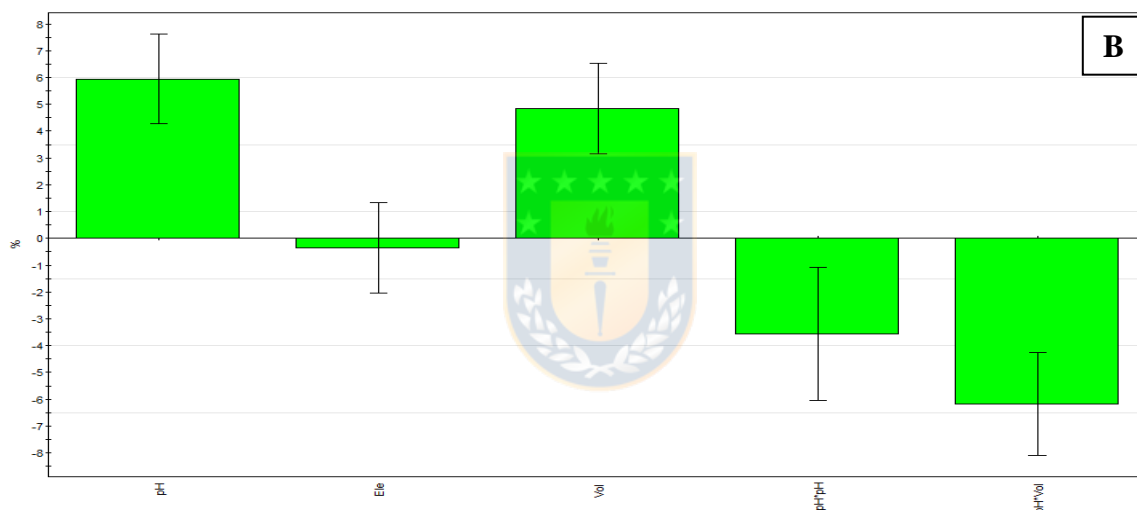


Figura 5.3 Coeficientes para la remoción de Etinilestradiol por Fotelectrooxidación.

Las variables de primer orden más importantes que ejercen un efecto sinérgico en la degradación de Etinilestradiol son X_1 =pH, seguido de X_3 = Voltaje. Por otro lado existe un efecto cruzado de las variables X_1X_3 (pH, voltaje) y un efecto de segundo orden X_1X_1 (pH, pH) que ejercen un efecto antagonico en la remoción del Etinilestradiol.

5.4.4.- Polinomio de respuesta para Estriol y Etinilestradiol por Foto Fentón

$$Y_{PF \ E3} = 49,75 + 10,83X_1 (\pm 2,5) + 16,66X_2 (\pm 2,5) - 6,58X_1X_1 (\pm 3,9) + 4,5 X_1X_2 (\pm 3,0). \quad (\text{Ec. 6})$$

$$Y_{PF \ EE2} = 56 + 15,5 X_1 (\pm 1,4) + 18X_2 (\pm 1,4) - 9,83 X_1X_1 (\pm 2,3) + 5,75 X_1X_2 (\pm 1,8). \quad (\text{Ec. 7})$$

Las variables son definidas como:

$$X_1 = H_2O_2$$

$$X_2 = Fe (II).$$

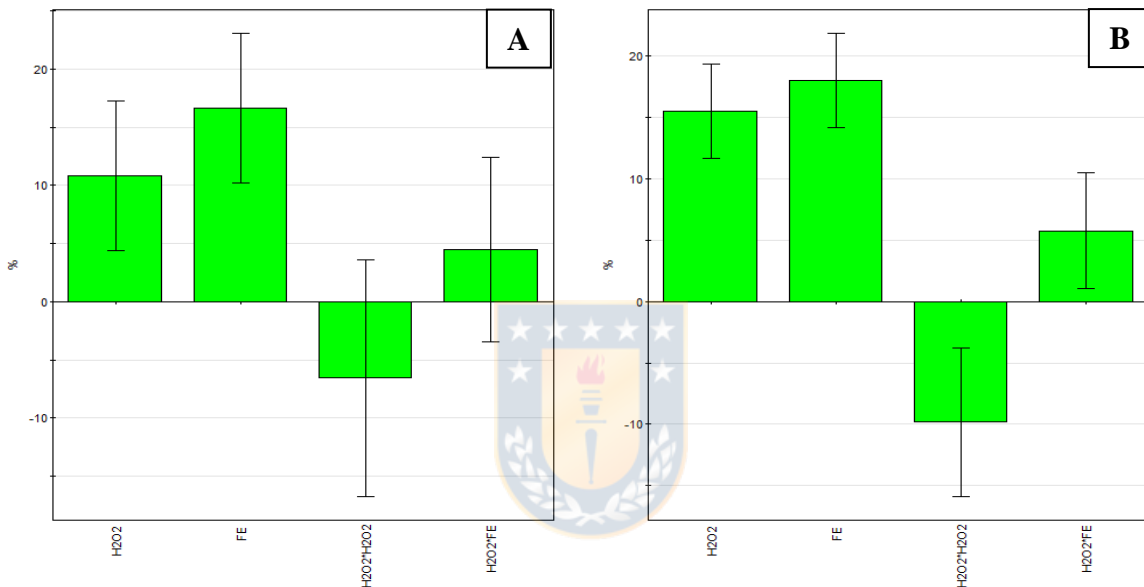


Figura 5.4 Coeficientes para la remoción de Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Foto Fentón

Los coeficientes de primer orden más importantes para Foto Fentón son $X_2=Fe (II)$ y $X_1=H_2O_2$, seguido del efecto cruzado de $X_1X_2 (H_2O_2, Fe (II))$, además existe un efecto antagonico de $X_1X_1 (H_2O_2, H_2O_2)$

5.4.5.- Validación estadística del método a través del análisis de varianza de Fisher

Todo método necesita ser validado es por ello que una forma de realizar esta validación de los datos experimentales es a través de las herramientas estadísticas disponibles.

Para ello la validación se basa en la siguiente hipótesis:

- H_0 : La variación debida a la regresión no es significativamente mayor que la variación sobre la regresión (Residual) para un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

Es necesaria la comparación del F experimental y el F de crítico para que el modelo se valida por este método. En las tablas 5-7, se muestran las ANOVA para el Estriol y Etinilestadiol por Electrooxidación, Fotoelectrooxidacion y Foto Fentón. Los tres modelos son validados, ya que F experimental 21,49 – 12,18 (Electrooxidación) son mayores al F crítico 3,48 ($F_{5/9}$ con un nivel de confianza de 95%, de una cola) y 15,57 - 24,39 (Fotoelectrooxidación) son mayores al F crítico 3,37-3,33 ($F_{6/9}$ para Estriol y $F_{5/10}$ para Etinilestradiol con un nivel de confianza de 95%, de una cola), y parar Foto Fentón F experimental 16,83-69,87, es mayor al F crítico 5,19 ($F_{4/5}$ con un nivel de confianza de 95%, de una cola), además la probabilidad experimental es menor al p crítico ($\alpha=0,05$) para las tres técnicas, por lo que la hipótesis nula se rechaza, lo que significa que los residuales son despreciables, por lo tanto el modelo es válido.

Para la validación de los modelos mediante el análisis de ANOVA, se debe comprobar, además, que no existan errores sistematicos. La hipótesis para la validación de esto es:

- H_0 : El error presente en los datos es de tipo aleatorio.

Para poder validar los modelos, los valores de F experimental (determinado a partir del cuociente de los cuadrados medios residuales y los cuadrados medios totales), debe ser menor al F crítico. Es así como se validan los tres modelos ya que los F experimental 1,05-2,07 es menor al F crítico 19,35 ($F_{7/2}$ con un nivel de confianza del 95 % probabilidad, de una cola) para Electrooxidación. F experimental 0,5-2,03 es menor al F crítico 19,35-19,37

($F_{7/2}$ para Estríol y $F_{8/2}$ para Etinilestradiol, con un nivel de confianza del 95 % probabilidad, de una cola) para Fotoelectrooxidación. Por último para Foto Fentón, F experimental 10,22- 3,33 es menor al F crítico 224,6 ($F_{4/1}$ con un nivel de confianza del 95 % probabilidad, de una cola), por otro lado P experimental es mayor al P crítico para $\alpha = 0,05$, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula, y los errores del modelos pueden ser atribuidos a la aleatoriedad.

Además R^2 o coeficiente de determinación son cercanos a uno (0,923-0,871) para Electrooxidación, 0,912-0,924, para Fotoelectrooxidación y para Foto Fentón 0,931 y 0,982, lo que indica que casi toda la proporción de la variación total está siendo explicada por la regresión. Además ofrece una buena idea de la calidad del ajuste del modelo a los datos.

Tabla 5.5 Anova para Estríol y Etinilestradiol por Electrooxidación

R60	DF	SS (E3-EE2)	MS (varianza)	F (E3-EE2)	P (E3-EE2)	SD (E3-EE2)
Total	16	45962-51495	3064-3433			
Constante	1	41186-46928	41186-46928			
Total Correctas	14	4775-4566	341-326			18-18
Regresión	5	4406-3979	881-795	21,49 -12,18	0/0,001	29-28
Residual	9	368-587	41-65			6,40 y 8,08
Falta de ajuste	7	290-514	41-73	1,06- 2,02	0,56/0,37	6,44 y 8,57
Error puro	2	78-73	39-36			6,24 y 6,02
	N = 15	Q2 = 0,735-0,498		Cond.no. 2,973		
	DF = 9	R2 = 0,923-0,871		Y-miss = 0		
		R2 Adj. =0,88/0,8		RSD =6,40-8,08		

Tabla 5.6 Anova para Estríol y Etinilestradiol por Fotoelectrooxidacion

R60	DF	SS (E3-EE2)	MS (varianza)	F (E3-EE2)	P (E3-EE2)	SD (E3-EE2)
Total	16	115527-128784	7220-8049			
Constante	1	114752-128164	114752-128164			
Total Correctas	15	775-620	52-41			7,18-6,43
Regresión	6/5	707-573	118-114	15,57-24.39	0-0	10,85-10.70
Residual	9/10	68-47	7,6-4.7			2,75-2,16
Falta de ajuste	7/8	43-29	6,2-3.6	0,5-0,4	0,79-0,85	2,49-1.90
Error puro	2	25-18	12,3-9			3,51-3
	N = 16	Q2 =0,707-0,761		Cond. no. =2,881		
	DF = 9/10	R2 =0,912-0,924		Y-miss =0		
		R2 Adj. =0,854-0,886		RSD =2,75-2,16		

Tabla 5.7 Anova para Estriol y Etinilestradiol por Foto Fentón

R60	DF	SS	MS (varianza)	F (E3-EE2)	P (E3-EE2)	SD (E3-EE2)
Total	10	23722-28917	2372-2891,7			
Constante	1	20976-25100	20976-25100,1			
Total Correctas	9	2745-3816	305-424			17,46-20,59
Regresión	4	2555-3749	638-937	16,83-69,87	0,004	25,27-30,61
Residual	5	189-67	38-13			6,160-3,66
Falta de ajuste	4	185-62	46-15	10,29-3,47	0,229-0,38	6,80-3,95
Error puro	1	4,5-4,5	4,5-4,5			2,12-2,12
	N = 10	Q2 = 0,537-0,914		Cond. no= 2,92-2,92		
	DF = 5	R2 = 0,931-0,982		Y-miss = 0-0		
		R2 Adj. = 0,876-0,968		RSD = 6,16-3,66		

El análisis multivariado permite calcular efectos cuando las variables en estudio tienen diferente orden de magnitud, codificando los valores de manera de que el polinomio es válido para los valores de las variables codificados, por ejemplo, si se quiere predecir cuanto es la respuesta de y ocupando el punto central 0 (implica que todas las variables van a tener un $X=0$) el valor de y sería igual a la constante. Si se quiere saber qué valor toma y a valores altos de Na_2SO_4 (electrolito 0,25 M) se reemplaza todo por +1 y si quiero saber cuánto vale la respuesta y a valores bajos se reemplaza por -1, lo mismo se hace para las otras variables.

Esto no es posible de graficar ya que implica cuatro dimensiones, entonces de manera de obtener una gráfica tridimensional se debe reemplazar uno de estos valores por un valor constante como se puede ver en las siguientes figuras, donde se muestra el efecto del voltaje /pH para electrolito =1, en el porcentaje de degradación de E3 y EE2.

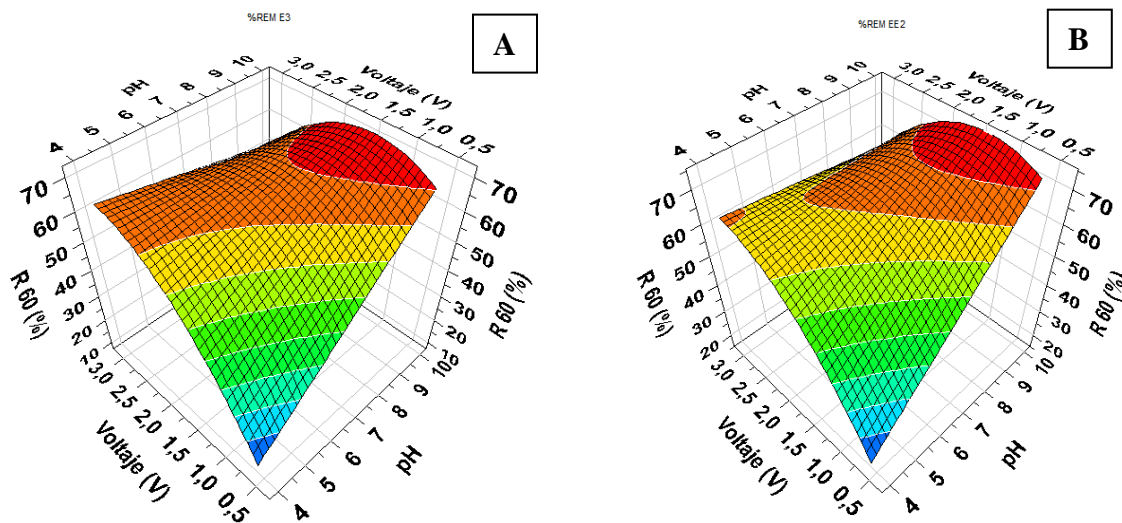


Figura 5.5 Superficie de respuesta para Estriol(A) y Etinilestradiol(B) por Electrooxidación a los 60 minutos de reacción.

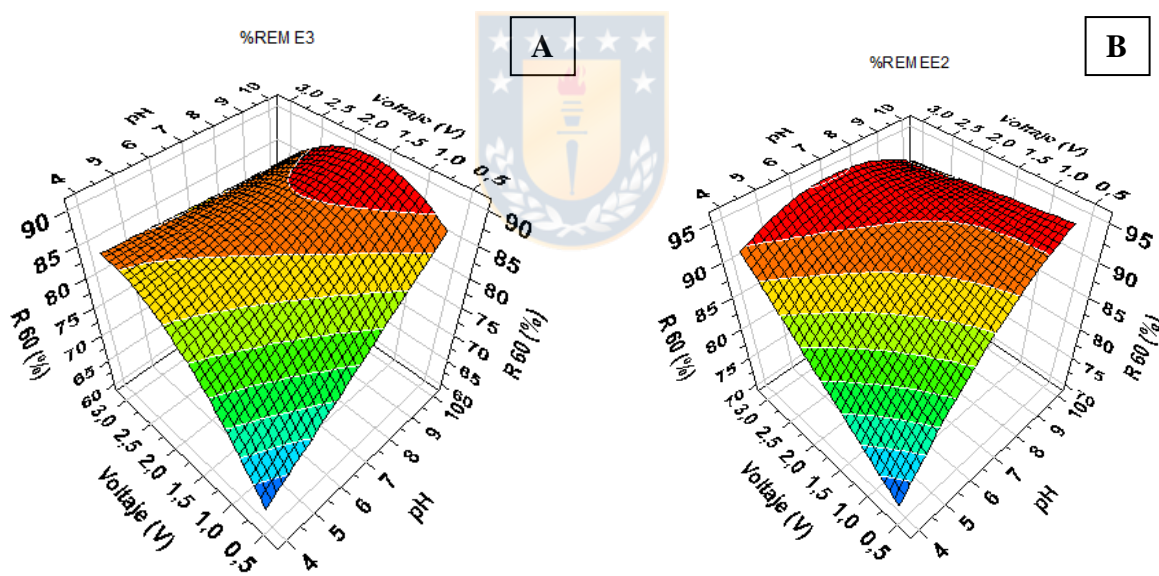


Figura 5.6 Superficie de respuesta para Estriol (A) y Etinilestradiol (B) por Fotoelectrooxidación a los 60 minutos de reacción.

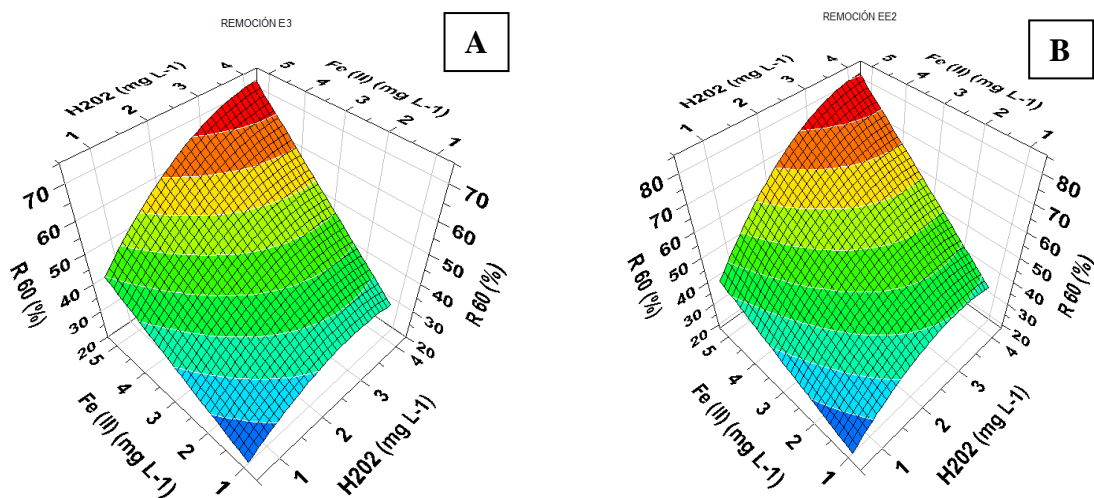


Figura 5.7 Superficie de respuesta para Estrinol (A) y Etinilestradiol (B) por Foto Fentón a los 60 minutos de reacción.

5.4.6.- Óptimos de degradación

Luego de obtener las expresiones polinómicas y las superficies de respuesta a partir de los coeficientes entregados por cada uno de los modelos y haber comprobado que los métodos son válidos a través de ANOVA, se obtienen las condiciones óptimas para cada uno de los métodos las cuales se detallan a continuación:

- 1) Para Electrooxidación las condiciones óptimas fueron: pH 10, 1,6 volt, y 0,05 M de Na_2SO_4 .
- 2) Para el proceso de Fotoelectrooxidación las condiciones óptimas fueron: pH 10, 1,5 voltaje, y 0,1353 M de Na_2SO_4 .
- 3) Para el proceso Foto Fentón las condiciones óptimas fueron: $4 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ y $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Fe (II)}$.

A continuación se puede observar en las figura 5.8, las cinéticas óptimas a los 30, 60 y 90 minutos de tratamiento, para Estrinol (A) y Etinilestradiol (B), degradando un 47-64 % por Electrooxidación, 85-95% por Fotoelectrooxidación y un 82-90 % por Foto Fentón.

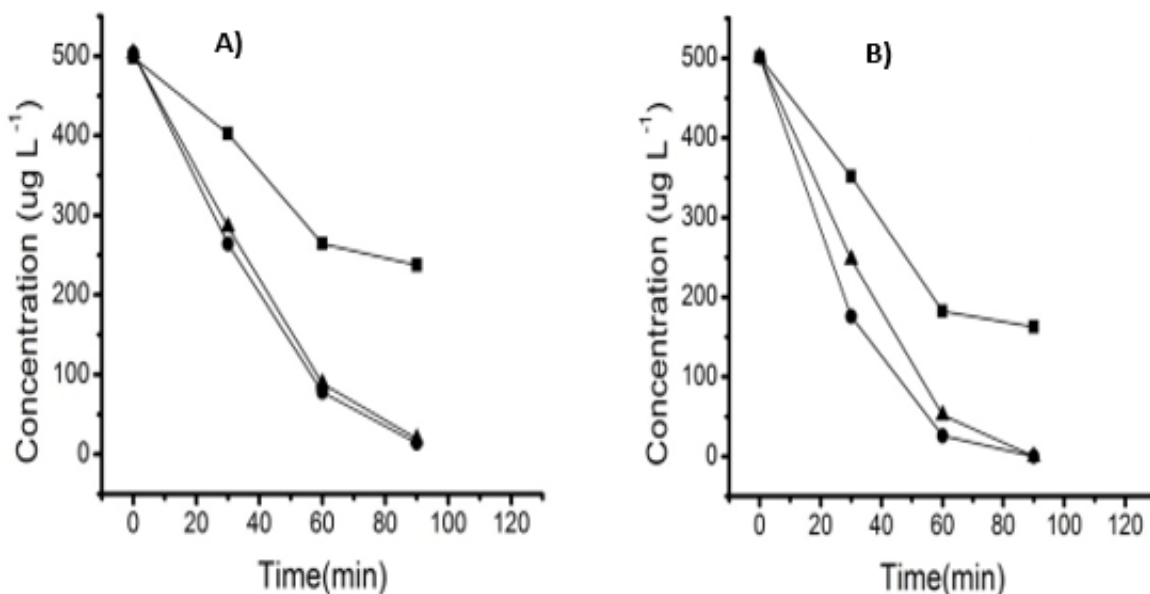


Figura 5.8 Cinéticas de degradación de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de E3 (A) y EE2 (B) por Electrooxidación (■), Foelectrooxidación (●) y Foto Fentón (▲), durante 90 minutos de reacción.

5.4.7.- Control del proceso.

5.4.7.1.- Determinación de carbono orgánico total

Para llegar a la completa mineralización del compuesto puede aparecer o desaparecer previamente toda una serie de compuestos intermediarios de la reacción, entonces para poder verificar la viabilidad del proceso de degradación del Estriol y Etinilestradiol es importante poder demostrar que todos los compuestos iniciales, intermediarios hayan sido eliminados, es así como en la figura 5.9, se observa que la mineralización no supera al 40 % ni para los métodos de Electrooxidación ni Foto Fentón, en cambio se ve claramente mejorada cuando se utiliza radiación UV, alcanzando valores superiores al 80 %.

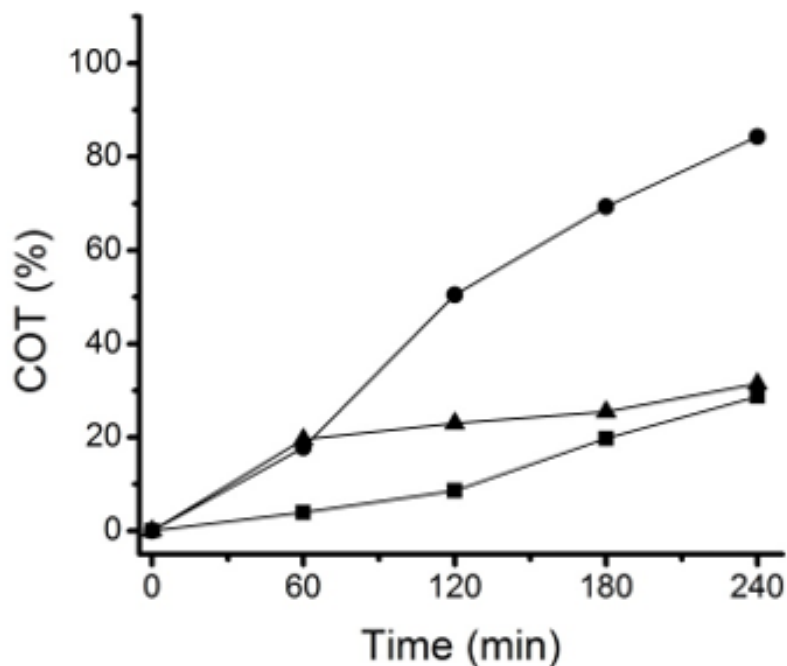


Figura 5.9 Cinética de degradación de COT para Estriol y Etinilestradiol, por proceso de Electrooxidación (■), Fotoelectrooxidación (●) y Foto Fenton Foto Fentón (▲).

5.4.7.2.- Ensayos MCF7

Esta técnica fue utilizada para controlar el proceso y para evaluar la eficiencia de los tratamientos de Electrooxidación y Fotoelectrooxidación, como un indicador de pérdida de la actividad estrogénica de Estriol/Etinilestradiol y de los compuestos intermediarios formados a partir de las distintas reacciones. Esto nos ofrece una mirada global y complementaria sobre la efectividad de los tratamientos aplicados no sólo desde el punto de vista analítico, si no desde los efectos, ya que estos se pueden evidenciar sin la necesidad de que los compuestos que provocan el efecto disruptor hayan sido identificados y/o cuantificados analíticamente, además es un procedimiento poco costoso y no es necesario utilizar animales de experimentación. En las siguientes imágenes se puede apreciar claramente la disminución de la actividad estrogénica por Fotoelectrooxidación, a medida que aumenta el tiempo de tratamiento de la muestra, llegando a ser similar al crecimiento del control negativo a los 180 minutos de reacción (Fig 6.0-6.1).

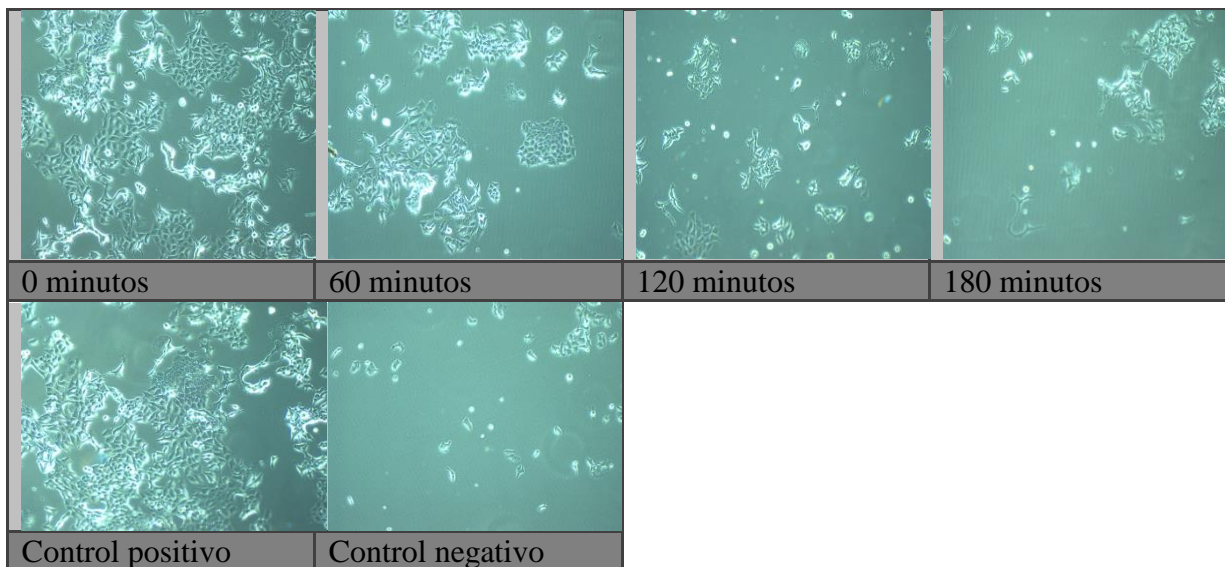


Figura 6.0 Registro visual de ensayo MCF7, para el tratamiento de Estríol y Etinilestradiol por Fotelectrooxidación.

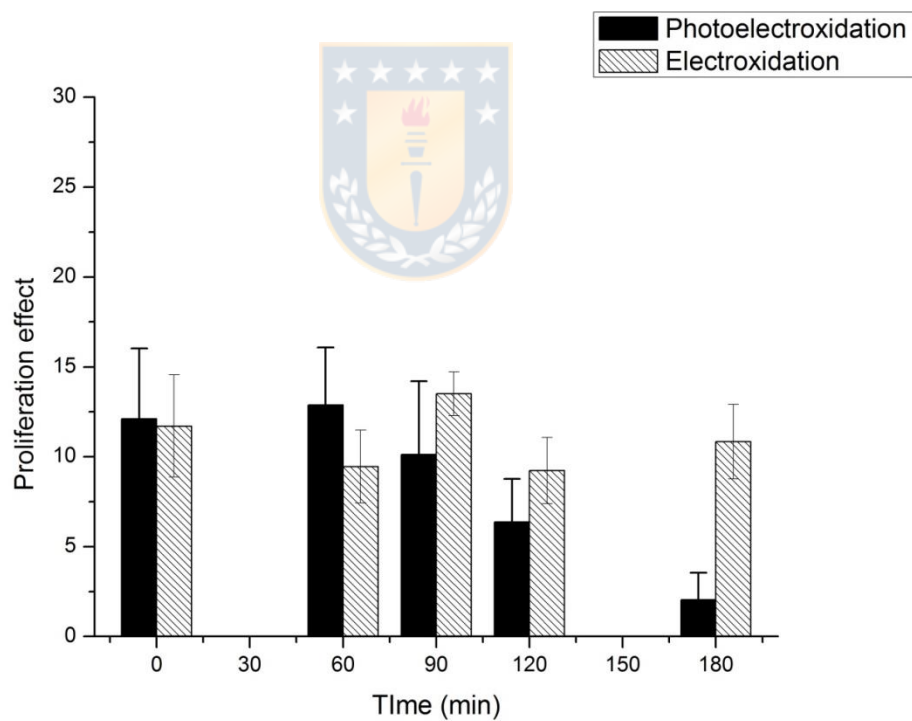


Figura 6.1 Efecto proliferativo a distintos tiempos de tratamiento de Estríol y Etinilestradiol por Electrooxidación y Fotelectrooxidación ($500 \mu\text{g L}^{-1}$).

5.5.- Conclusión

De acuerdo a los resultados se puede concluir lo siguiente:

El diseño de experimentos es una herramienta útil, que permitió la optimización de los procesos de Electrooxidación, Fotoelectrooxidación y Foto Fentón, realizando sólo un pequeño número de experimentos.

Mediante análisis multivariado se observa que las variables más importantes en la degradación de E3/EE2 por Electrooxidación, son: X_1 =pH, seguido de X_3 = Voltaje y existe un efecto cruzado importante de X_1X_3 (pH, voltaje) y un efecto de segundo orden X_3X_3 (voltaje, voltaje) que son antagonicos a la degradación. Por Fotoelectrooxidación al igual que en Electrooxidación, las variables más importantes son: X_1 =pH, seguido de X_3 = Voltaje, y el efecto antagonico de X_1X_3 (pH, voltaje), sólo existe una diferencia con el sistema anterior, en que se observa efecto de segundo orden del electrolito para Estriol, pero este es un efecto de menor grado. Lo más relevante se obtiene al observar las claras diferencias en los promedio de los polinomios que denotan las mayores remociones de la técnica de Fotoelectrooxidación tanto para Estriol como Etinilestradiol. Por último en el caso de Foto Fentón los coeficientes de primer orden más importantes son X_2 =Fe (II) y X_1 =H₂O₂, seguido del efecto cruzado de X_1X_2 (H₂O₂, Fe (II)), además existe un efecto antagonico de X_1X_1 (H₂O₂, H₂O₂).

Se logra obtener un óptimo a través del polinomio y superficie de respuesta, que presenta una degradación de 47-64 % (E3/EE2) por Electrooxidación, 85-95% (E3/EE2) por Fotoelectrooxidación y 82-90 % (E3/EE2) por Foto Fentón.

Existe una mineralización, de un 29 % por Electrooxidación, 84% Fotoelectrooxidación y de un 31%. Por Foto Fentón.

Los productos de degradación obtenidos de las reacciones de Fotoelectrooxidación muestran casi nula actividad estrogenica.

5.6.- Referencias

- Belhaj, D., Baccar, R., Jaabiri, I., Bouzid, J., Kallel, M., Ayadi, H. (2015). Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Sci. Total, Environ.* 505, 154–160.
- Bicchi, C., Schilirò, T., Pignata, C., Fea, E., Cordero, C., Canale, F., Gilli, G. (2009). Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents, *science of the total environment* 407, 1842 – 1851.
- Cedat, B., De Brauer, C., Metivier, H., Dumont, D., Tutundjan, R. (2016). Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Research*, 100, 357-366
- Colombo, R., Ferreira, T., Alves, S., Lanza, M. (2011). Photo-Fenton degradation of the insecticide esfenvalerate in aqueous medium using a recirculation flow-through UV photoreactor. *J. Hazard. Mater.* 198, 370–375.
- Czech, B. & Rubinowska, K. (2013). TiO₂-assisted photocatalytic degradation of diclofenac, metoprolol, estrone and chloramphenicol as endocrine disruptors in water. *Adsorption* 19, 619–630.
- Fonseca, A., Lima, D., Esteves, V. (2011). Degradation by solar radiation of estrogenic hormones monitored by UV–visible spectroscopy and capillary electrophoresis. *Water Air Soil Pollut.* 215, 441–447.
- Frontistis, Z., Brebou, C., Venieri, D., Mantzavinosa, D. & Katsaounis, A. (2011). BDD anodic oxidation as tertiary wastewater treatment for the removal of emerging micropollutants, pathogens and organic matter. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 1233–1236.
- Frontistis, Z., Kouramanos, M., Moraitis, S., Chatzisyneon, E., Hapeshi, E., Fatta-Kassinou, D., Xekoukoulotakis, NP., Mantzavinos, D. (2015). UV and simulated solar photodegradation of 17 α -ethynylestradiol in secondary-treated wastewater by hydrogen peroxide or iron addition. *Catal. Today*, 252, 84–92.
- Guedes, M., Bila, M. & Márcia, D. (2008). Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *Sci. Total Environ.* 407, 105–115.
- Huang, B., Wang, B., Ren, D., Jin, W., Liu, J.L., Peng, J.H. (2013). Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in dianchi lake catchment, China. *Environ. Int.* 59, 262–273.

- Lange, C., Kuch, B., Metzger, J. (2014). Estrogenic activity of constituents of underarm deodorants determined by E-Screen assay, *Chemosphere*, 108, 101–106.
- Liu, Y., Gan, X., Zhou, B., Xiong, B., Li, J., Dong, C., Bai, J. & Cai, W. (2009). Photoelectrocatalytic degradation of tetracycline by highly effective TiO₂ nanopore arrays electrode. *J. Hazard. Mater.* 171, 678–683.
- Onda, K., Nakamura, Y., Takatoh, C., Miya, A., Katsu, Y. (2003). The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Sci. Technol.* 47, 109–116
- Qiang, Z., Nie, Y., Ben, W., Qu, J., Zhang, H. (2013). Degradation of endocrinedisrupting chemicals during activated sludge reduction by ozone. *Chemosphere*, 91,366–373.
- Sirés, I., Oturan, N. & Oturan, M. A. (2010). Electrochemical degradation of β -blockers. Studies on single and multicomponent synthetic aqueous solutions. *Water Res.* 44, 3109–3120.
- Schilirò, T., Porfido, A., Spina, F., Varese, G., Gilli, G. (2012). Oestrogenic activity of a textile industrial wastewater treatment plant effluent evaluated by the E-screen test and MELN gene-reporter luciferase assay, *Science of the Total Environment*, 432, 389–395
- Pešoutová, R., Stříteský, L., Hlavínek, P. (2014). A pilot scale comparison of advanced oxidation processes for estrogenic hormone removal from municipal wastewater effluent. *Water Sci. Technol.* 70, 70–75.
- Puma, G., Puddu, V., Tsang, H., Gora, A., Toepfer, B. (2010). Photocatalytic oxidation of multicomponent mixtures of estrogens (estrone (E1), 17 beta-estradiol (E2), 17 alpha-ethynylestradiol (EE2) and estriol (E3)) under UVA and UVC radiation: photon absorption, quantum yields and rate constants independent of photon absorption. *Appl. Catal. B* 99, 388–397.
- Zhang, A., Li, Y. (2014). Removal of phenolic endocrine disrupting compounds from waste activated sludge using UV, H₂O₂, and UV/H₂O₂ oxidation processes: effects of reaction conditions and sludge matrix. *Sci. Total Environ.* 493, 307–323.
- Zhou, H., Liu, J., Xia, H., Zhang, Q., Ying, T., Hu, T. (2015). Removal and reduction of selected organic micro-pollutants in effluent sewage by the ozone-based oxidation processes. *Chem. Eng.J.* 269,245–254.

CAPITULO 6

EXTRACCIÓN DE ESTRIOL Y ETINILESTRADIOL CON RDSE Y DETERMINACIÓN EN AGUAS SERVIDAS.

6.1.- Resumen

La técnica de Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE), fue utilizada para extraer de forma simultanea Estriol y Etinilestradiol desde aguas servidas (tratamiento secundario). Las variables estudiadas fueron las fases sorbentes C18 y HLB (copolímeros de divinil-benceno-N-vinilpirrolidona), volumen de muestra, velocidad de rotación disco rotatorio y tiempo de extracción. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 100 mg de fase estacionaria (HLB), un volumen de 100 mL de muestra, una velocidad de rotación para el disco de 3000 rpm, un tiempo de extracción de 4 horas y un tiempo de desorción de 3 horas. Bajo estas condiciones se obtuvieron recuperaciones de 87% para Estriol y 103% para 17- α etinilestradiol con coeficientes de variación inferiores al 10%. Los límites de detección de estas hormonas en HPLC- DAD fueron de 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol y de 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17- α etinilestradiol. La determinación y cuantificación de hormonas en aguas servidas arrojó como resultado la presencia de Estriol y 17 α - Etinilestradiol a concentraciones de 103-75 $\mu\text{g L}^{-1}$ en afluyente, y concentraciones no detectables en agua provenientes del tratamiento secundario.

6.2.- Introducción

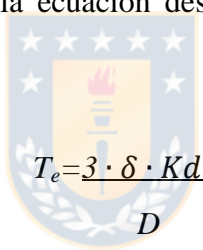
Diversos estudios indican que concentraciones de nano y microgramos por litro de hormonas esteroides, son un riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana. Se tiene evidencia de que a esos niveles se producen efectos en la biota, tales como feminización de peces, aumento de vitelogenina y en humanos puede reducir la cantidad de espermatozoides, aumento de la incidencia de cáncer de testículo y próstata, en hombres, y en mujeres se asocia a endometriosis (Bila, D *et al.*, 2007). Las principales fuentes de estrógenos en el ambiente son las hormonas secretadas por humanos, producto del consumo de anticonceptivos orales y la administración de hormonas en el área ganadera (Duong, C, *et al.*, 2010). Estas hormonas entran al ambiente a través de la descarga de efluentes desde las plantas de tratamientos de aguas residuales y se han detectado en aguas residuales, en aguas naturales a concentraciones de ng L^{-1} , por ejemplo en el estudio de Bertin y *col.*, 2011, se reportaron concentraciones de $48,98 \text{ ng L}^{-1}$ de EE2, Hernando y *col.*, 2006, detectó concentraciones de 13.3 a 1105.2 ng L^{-1} , para compuestos endocrinos en aguas residuales, Vulliet y *col.* 2008, reportó concentraciones de $0,3$ - $3,5 \text{ ng L}^{-1}$ y los estrógenos E1, E2 y EE2 fueron regularmente detectados en las aguas superficiales en concentraciones que variaron entre $0,1$ y 4 ng L^{-1} . Viglino y *col.*, 2008, reportó concentraciones de hormonas naturales y sintéticas en matrices acuosas de hasta 5 ng L^{-1} , analizando las muestras por HPLC- APPI-MS y extracción en fase sólida (SPE) online. Pojana y *col.*, 2007, reportó que la gran mayoría de compuestos estudiados (E2, E1, NP, nonilfenol monoetoxilado carboxilado NP1EC, BPA, BP, MES, EE2, DES) se encontraban en agua y sedimentos en el rango de concentraciones entre: $2,8$ a 211 ng L^{-1} y $3,1$ a $289 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, peso seco, respectivamente, mientras que sólo el 17 α -etinilestradiol y el nonilfenol se registraron en muestras de biota (conc. rango: 7.2 a 240 ng g^{-1} , peso seco).

Es por eso que en estos últimos años distintas técnicas se han aplicado para aislar estos compuestos, como, por ejemplo: Extracción en fase sólida (SPE) (Ingrand, V *et al.*, 2003, Seo, J *et al.*, 2005), extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE) (Vo Duy, S *et al.*, 2012), microextracción en fase sólida (Yang, L *et al.*, 2006). Una de las últimas técnicas desarrolladas, corresponde a la microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) (Richter, P *et al.*, 2009), esta consiste en un disco de teflón, con una

cavidad, la cual es cargada con una fase sorbente, de acuerdo a la polaridad del analito. Para evitar fugas de la fase sorbente, la cavidad es cubierta con un filtro de fibra de vidrio y sellada con un anillo de teflón. El disco en su interior posee una barra magnética, por lo que una vez que el disco se encuentra preparado, es puesto en un recipiente de vidrio junto con la muestra que se desea extraer y posteriormente se someten a agitación, mediante un agitador magnético.

Teóricamente se le llama capa de difusión de Nernst a la región estacionaria en las proximidades de la superficie del disco, donde las concentraciones de los analitos son diferentes al valor que poseen en el seno de la disolución, por lo tanto, corresponde a una zona importante en la transferencia de analitos desde la muestra a la fase de sorción.

La RDSE describe que la relación de la disminución de la capa de difusión de Nernst y el tiempo de equilibrio, está dada por la ecuación descrita previamente para la técnica de microextracción en fase sólida.



$$T_e = \frac{3 \cdot \delta \cdot K_d \cdot P_t}{D}$$

Donde δ es el espesor de la capa estacionaria; D es el coeficiente de difusión de la solución; T_e , el tiempo de equilibrio; K_d el coeficiente de distribución del analito entre la fase de sorción y la muestra y P_t es el espesor de la fase de sorción.

En consecuencia, mediante el aumento de la velocidad de rotación, se reduce la capa de Nernst facilitando la extracción y por consiguiente el tiempo de equilibrio disminuye.

Dentro de las ventajas que presenta el RDSE, en comparación con otras técnicas, se puede mencionar que gracias a la cavidad central que presenta el disco, dispone de una gran área de exposición de la fase de sorción, lo que permite que la transferencia de masa sea más eficiente y una extracción más rápida. Dado el material y las dimensiones del disco le permiten rotar a altas velocidades, permitiendo así una disminución de la capa de difusión de Nernst, mejorando la transferencia del analito. Fácil de montar en un laboratorio y tiene

un precio mucho menor que otras técnicas de extracción como la microextracción por fase sólida o la extracción por sorción en barras de agitación magnética (Corrotea Y *et al.*, 2015). Como toda técnica el RSDE presenta desventajas, uno de los problemas detectados deriva de la agitación del disco, debido a que hay pocos agitadores que controlen la velocidad de rotación en rpm, es decir, existe la posibilidad de que el disco no rote a la velocidad que indica el agitador, debido a la poca potencia que genera este mismo al momento de hacer rotar el disco. Además, si sumamos el peso del disco, la viscosidad y volumen de muestra, el problema de la agitación causaría dificultades en la extracción de analitos. Otra desventaja es que no existe disponibilidad comercial, por lo que el disco debe ser construido en un taller, que sea especialista en instrumentos de laboratorio y que trabaje con el material adecuado para el disco, por ejemplo, teflón.

En el presente trabajo se utiliza RSDE para preconcentrar y de esta forma poder cuantificar los niveles de Estriol y Etnilestradiol en una muestra de aguas servidas de la localidad de Concepción.

6.3.- Experimental

A partir de soluciones stock de 50 mg L^{-1} , de Estriol y Etnilestradiol (Sigma Aldrich) se realizaron curvas de calibración en el rango $20\text{-}1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, las que fueron analizadas por HPLC-DAD provisto de una bomba cuaternaria (YL9110) y una columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, $5 \text{ } \mu\text{m}$). La fase móvil utilizada fue agua ultrapura obtenida del sistema de purificación modelo Aqua Max Ultra 370 y acetonitrilo grado HPLC, adquirido de Merck. Los cuales fueron utilizados en una proporción (1/1), a un flujo de 1 mL min^{-1} en modo isocrático, con un tiempo de corrida de 8 minutos.

Los analitos son identificados por comparación de los tiempos de retención con estándares y la cuantificación se realiza por calibración externa en la respectiva curva de calibración.

6.3.1.- Microextracción en disco rotatorio (RDSE)

Se evaluaron dos fases sorbentes para la extracción de Estriol y Etinilestradiol; el copolímero formado por divinilbenceno-N-vinilpirrolidona, y el octadecil C-18, a dos niveles de concentración 50 y 100 mg, los cuales fueron depositados en la cavidad central del disco de teflón, la que es cubierta con un papel filtro soportado por un anillo de teflón.

Antes de la extracción de los analitos, las fases son acondicionadas con acetonitrilo durante 20 minutos. Posteriormente el disco se sumerge dentro de un tubo de vidrio modificado que contiene un volumen de solución determinado (25/100/250 mL) de concentración conocida de hormonas ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) el cual se mantiene en agitación constante (3000 rpm) por un tiempo de 60 minutos hasta 4 horas. Una vez finalizada la etapa de extracción, el disco es retirado y se somete a desorción de los analitos, con 10 mL de acetonitrilo, por un tiempo de 30 minutos, 1 hora y 3 horas. La solución obtenida es evaporada a sequedad con una corriente de nitrógeno gaseoso y luego reconstituida en 300 μL de acetonitrilo. Este extracto final es directamente inyectado al HPLC-DAD.

6.3.3.- Recolección y tratamiento de muestras de aguas servidas

Se recolectaron muestras de aguas servidas, de los tratamientos primarios, secundarios y terciarios desde planta de tratamiento Bio Bio ubicada en Hualpén, perteneciente a la empresa Essbio, en botella de vidrio ámbar de 4 L, las que fueron transportadas al laboratorio en condiciones de frío. Una vez en el laboratorio, 100 mL de muestras de cada una de las etapas se filtraron en 3 pasos. El primero corresponde a un filtrado con lana de vidrio, para eliminar material particulado de gran tamaño. El segundo es un filtrado con filtros de fibra de vidrio, los cuales tienen un tamaño de poro de $0,7 \mu\text{m}$. En el paso final, la muestra es pasada a través de filtros de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$. Luego del filtrado las muestras son sobrecargadas con estándares de hormonas de concentración conocida y sometidas a RDSE, para preconcentrar y determinar la concentración que hay en las muestras.

6.3.4.- Validación del método

Para la estimación de la exactitud se evaluó el grado de recuperación de los analitos, sometiendo las muestras sobrecargadas al método completo. La precisión se evaluó a través de la repetibilidad, donde se realizaron las mediciones el mismo día, por el mismo analista,

con el mismo equipo y los mismos instrumentos. Se probaron distintas concentraciones de Estriol y Etinilestradiol (correspondiente a todo el rango de trabajo de la curva de calibrado) y se hicieron tres repeticiones por concentración. Los resultados son expresados como coeficiente de variación de las repeticiones. Los límites de detección y cuantificación fueron obtenidos a través del error típico de los tres primeros puntos de la respectiva curva de calibración.

La sensibilidad se obtiene a través de la pendiente de cada curva de calibración y el intervalo lineal, se determina mediante el límite de cuantificación como valor inferior y la última concentración empleada en la curva de calibración.

6.4.- Resultados y discusión

Se seleccionó como longitud de onda de trabajo, 200 nm a partir del equipo HPLC-DAD y se trabajó en modo isocrático 50-50 (ACN/AGUA). La identificación de los analitos en muestras de aguas servidas fue realizada por comparación de los tiempos de retención de las muestras con mezclas de patrones disponibles y la cuantificación a través de calibración externa con la respectiva curva de calibración.

Tabla 6.1 Parámetros cromatograficos para la separación de compuestos disruptores endocrinos en columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, 5 μ m)

Compuesto	t_R (min)	t_R'	DS t_R'	K'	α	R_s	N	HETP
Estriol	2,053	1,303	0,006	1,7	3,8	5,3		
17 α etinilestradiol	5,717	4,967	0,02	6,6			351,8	0,2

t_R' , tiempo de retención corregida; DS, desviación estándar; K', factor de retención; α , factor de selectividad; R_s , resolución, N, número de platos teóricos; HETP, altura equivalente de plato teórico

Este orden de elución de la columna está de acuerdo con el factor de retención (k), por lo que es de esperar que Estriol sea el primero en eluir con la fase móvil, mientras que el 17- α etinilestradiol permanezca más tiempo retenido por la fase estacionaria.

6.4.1.- Parámetros de validación.

Los parámetros analíticos para la determinación de Estriol (*E3*) y Etinilestradiol (EE2) -con la columna RP-C8 (125 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula, 5 μm) se muestran en la Tabla 6.2. El intervalo de linealidad se estableció entre los límites de cuantificación (LOQ) y la última concentración empleada en la curva de calibración. El coeficiente de correlación (r_2), LOD, LOQ, error estándar de la recta (Sy/x), repetibilidad se determinaron a partir de las respectivas curvas de calibración (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Parámetros de validación para CDE por HPLC-UV

Parámetros de validación	Estriol	17 α etinilestradiol
Ecuación de la recta	$Y=0,188x+0,3477$	$Y=0,1536x+2,065$
Coef. de correlación (r_2)	0,998	0,998
Rango lineal	5,3-1000	4,5-1000
Error típico	0,099	0,069
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,6	1,4
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,3	4,5
Repetibilidad (%)	0.23-3.93	0,5-7.8
Recuperaciones (%) exactitud	$87\pm 2,05 - 93\pm 1,98$	$108\pm 1,53 - 116 \pm 1,87$

Los límites de detección y cuantificación (tabla 6.2) son expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$, la repetibilidad de las inyecciones en términos relativos como CV y en rangos ya que está no es la misma para las distintas concentraciones de la curva de calibración, el intervalo de trabajo en $\mu\text{g L}^{-1}$ y la linealidad representada a través de los coeficientes de determinación.

En comparación con otros estudios los resultados de recuperación, repetibilidad y linealidad fueron aceptables, ya que por ejemplo en el trabajo realizado en aguas residuales por Zafra, 2008 y Hernando, 2004 no se observaron diferencias en las recuperaciones ($> 100\%$), las linealidades fueron mayores en ambos casos al 0,99. Solo se obtuvieron diferencias en las precisiones, la cual fue superior en el estudio de Zafra, 2008 (LC-MS-SPE). Sin embargo, los límites de detección en estos trabajos estuvieron en el rango de 2,5-27,5 ng L^{-1} Hernando, 2004 (GC-MS-SPE) y en el estudio de Zafra, 2008 entre 12-69 ng L^{-1} , muy por debajo a los límites aquí reportados.

En aguas superficiales Sodré, 2010 (LC-MS-SPE) y Brossa, 2005 (GC-MS-SBDE) obtuvieron diferencias en las recuperaciones. Brossa solo superó el 60% mientras que

Sodré obtuvo recuperaciones > 100%. La precisión en cambio fue más adecuada en el estudio de Brossa, 2005 (GC-MS-SBDE) que en el de Sodré, 2010 (LC-MS-SPE) en el cual se obtuvieron precisiones superiores al 20%. En este caso se observan marcadas diferencias en las recuperaciones esto puede deberse a pérdida de analito en la barra por contacto con el vaso donde se realizó la extracción.

6.4.2.- Estudio de las mejores condiciones para la extracción de Estriol y Etinilestradiol por RDSE

Tanto la velocidad de rotación, como el tiempo de extracción son factores cruciales para que exista una correcta transferencia de analito desde la solución, hacia la fase sorbente en el disco. Utilizando información recopilada de la bibliografía se probaron distintos tiempos de extracción y desorción. Las mejores extracciones (por sobre el 90%) se obtuvieron con 100 mL de muestra, con un tiempo de extracción de 4 horas a una velocidad de extracción de 3000 rpm y un tiempo de desorción de 3 horas a 1700 rpm, utilizando 100mg de Oasis HLB (ver tabla 6.3). Para el caso de SPE se utilizaron los 100mL de muestra y 100mg de Oasis HLB en los cartuchos del equipo, haciendo pasar la muestra a un flujo aproximado de 1 mL min^{-1} , condiciones en las cuales se obtuvieron buenas recuperaciones (por sobre el 90%).

En cuanto a las fases sorbentes utilizadas en este estudio fueron seleccionadas por la afinidad que presentan, además de los buenos rendimientos registrados en bibliografía. Las fases seleccionadas fueron octadecil C18 y Oasis® HLB. En la Tabla 6.3 se puede observar, que, al realizar el proceso de extracción a un tiempo de 4 horas, la fase Oasis® HLB, logra una mayor recuperación de los analitos con respecto a C18, utilizando la técnica RDSE.

Tabla 6.3 Porcentajes de recuperación (%) de analitos en diferentes fases sorbentes, determinados por HPLC-DAD.

Fases sorbentes	Porcentaje de recuperación de estriol (%)	Porcentaje de recuperación de 17- α etinilestradiol (%)
C-18	72 \pm 0.23	23 \pm 1.41
HLB	98 \pm 3,0	96 \pm 1.77

De los datos presentados en la Tabla 6.3, se observa que para el caso del C 18 se alcanzan recuperaciones del 72 % para el Estriol y 23% para el 17- α etinilestradiol. En el caso del Oasis® HLB podemos observar porcentajes de recuperación de 98% para estriol y 96 % para 17- α etinilestradiol. Este aumento respecto al C-18 se debe a que, además de las interacciones con los sitios apolares de la fase sorbente, el Oasis® HLB presenta sitios polares, debido a su carácter hidrofílico-lipofílico, la cual permite la extracción de una gran variedad de compuestos. Por esta razón esta fase es seleccionada para la extracción de las hormonas mediante RDSE.

6.4.3.- Extracción de 17- α etinilestradiol y estriol en aguas residuales

Las pruebas de extracción se realizaron en aguas residuales provenientes de la planta de tratamientos de aguas servidas de Essbio, ubicada en la comuna de Hualpén. Para evaluar la extracción de los analitos, se utilizó las técnicas RDSE bajo las mejores condiciones (100 mL de muestra de agua residuales más una sobrecarga de $0,4\text{mgL}^{-1}$ de cada hormona y 0,1g de HLB). Se evaluó la recuperación a tres niveles de concentración, como se muestra en la tabla 6.4.

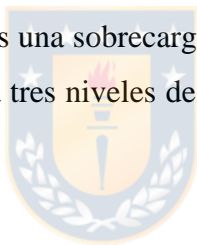


Tabla 6.4 Porcentaje de recuperación de 17- α etinilestradiol en aguas residuales después del tratamiento secundario, con las técnicas de extracción RDSE

Compuesto	Porcentaje recuperación ($300\ \mu\text{g L}^{-1}$) (N=3)	Porcentaje recuperación ($600\ \mu\text{g L}^{-1}$) (N=3)	Porcentaje recuperación ($900\ \mu\text{g L}^{-1}$) (N=3)
Estriol	$87 \pm 2,05$	$89 \pm 2,03$	$93 \pm 1,98$
17- α etinilestradiol	$116 \pm 1,87$	$108 \pm 1,53$	$112 \pm 1,50$

6.4.4.- Determinación de la concentración de analitos en aguas residuales.

Ambas hormonas fueron analizadas en cada fase del tratamiento de aguas residuales, determinando que su concentración en el afluente era de $103\ \mu\text{g L}^{-1}$ de E3 y $75\ \mu\text{g L}^{-1}$ de EE2. En tratamiento secundario tanto como en afluente las concentraciones son menores a LOD. Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo a otros trabajos que han reportado niveles de concentración de compuestos esteroides en niveles de ng L^{-1} en aguas

naturales, pudiendo llegar a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ en aguas servidas (Sodré *et al.*, 2010). Hernando y *col.*, 2006, detectó concentraciones de 13.3 a 1105.2 ng L^{-1} , para compuestos endocrinos en aguas residuales. Vulliet y *col.*, 2008, reportó concentraciones de estrógenos E1, E2 y EE2 que variaron entre 0,1 y unos pocos ng L^{-1} y fueron regularmente detectados en las aguas superficiales.

Las concentraciones mostradas anteriormente son en algunos casos considerablemente altas ya que se tiene evidencia que niveles de ng L^{-1} producen efectos en la biota. Por ejemplo concentraciones de 0,06 ng L^{-1} de etinilestradiol producen feminización y concentraciones de 0,1 ng L^{-1} aumento de vitelogenina.

Por lo anterior las técnicas ocupadas generalmente son acopladas a detectores de masa, masa/masa y en algunos casos tiempo de vuelo, que presenta sensibilidades superiores para la detección de estos compuestos en matrices ambientales. Sin embargo, existen algunos estudios como el de Peñalver donde se ocupó detector UV – ED en el que sí se detectaron y cuantificaron estos compuestos en aguas ocupando microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados fueron 3 de los cuales dos de ellos corresponden a 4-tert-octifenol y 4-nonilfenol. Solo se cuantificó β -estradiol (1,9 $\mu\text{g L}^{-1}$). Cabe destacar que los niveles de detección fueron de 0,3- 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. De igual forma se propone la verificación de estas concentraciones utilizando un detector más selectivo y sensible, ya que la utilización de un detector UV, puede derivar en errores asociados a la interferencia de otras moléculas que solapan la señal de los analitos y que tienen tiempos de retención similares, a la misma longitud de onda.

Existen varios estudios en los que se ha utilizado extracción en fase sólida y Microextracción por sorción con disco rotatorio especialmente ocupando rellenos de HLB y C18 para la determinación de 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estriol en aguas residuales. Estos estudios se realizan con equipos de GC-MS o HPLC-MS, bajo estas condiciones los límites de detección se encuentran en los rangos de ng L^{-1} (3,4-39) (Chen, H *et al.*, 2009; Migowska, N *et al.*, 2012).

Tabla 6 6 Concentración de analitos en aguas residuales

Hormona	Concentración en afluente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en tratamiento secundario ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración en efluente
Estriol	$103 \pm 2,25$	< LOD	< LOD
17- α etinilestradiol	$75 \pm 3,03$	< LOD	< LOD

6.5.- Conclusión

Se desarrolló un método de análisis de esteroides para muestra de agua servida, mediante cromatografía de líquidos, el cual fue validado apropiadamente mediante estudios de recuperación (>87%), precisión (0.23-7.8%), LOD (1.6-1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$), sensibilidades >0,98.

De acuerdo a las características y propiedades fisicoquímicas de las hormonas en estudio, fue factible la extracción por RSDE de Estriol y Etinilestradiol, desde muestras de agua residuales sobrecargadas, utilizando la fase sorbente Oasis HLB y C18, obteniendo porcentajes de recuperación superiores al 87%.

Es posible detectar y cuantificar Estriol y 17 α etinilestradiol sólo en el tratamiento primario, por la técnica antes validada, sin embargo, en tratamiento secundario y efluente no es posible, por lo que se sugiere la utilización de detectores de mayor sensibilidad para este tipo de estudios.

6.6.- Referencias

- Bertin, A., Inostroza, P., Quiñones, R. (2011). Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1530–1537
- Bila, D., Montalvão, A., Azevedo, A and Dezotti, M. (2007). Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, 69,736–46.
- Brossa, L., Marce, R., Borrull, F., Pocurull, E. (2005). Determination of Endocrine Disruptors in Environmental Water Samples by Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Desorption - Large Volume Injection-Gas Chromatography. *Chromatographia*, 61, 61–65.
- Brossa, L., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R. (2004). Solid-Phase Extraction/High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry to Determine Endocrine Disruptors in Water Samples. *Chromatographia*, 59, 419–423
- Corrotea, Y., Aguilera, N., Honda, L & Richter, P. (2015). Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *Analytical Letters*.
- Chen, H., Kuo, H and Ding, W. (2009). Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere*, 74,508–14.
- Duong, C., Ra, J., Cho, J., Kim, S., Choi, H., Park, J., Kim, K Inam, E, and Kim, S. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*, 78, 286–93.
- Hernando, M., Mezcuca, M., Fernández, A, Barcelo D. (2006). Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69,334-342.
- Ingrand, V., Herry, G., Beausse, J and De Roubin, M. (2003). Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020,99–104.
- Migowska, N., Caban, M. Stepnowski, P and J. Kumirska, J. (2012). Simultaneous analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. *Science of the Total Environment*, 441,77–88.
- Peñalver, P., Pocurull, E., Borrull, F., Marce, R. (2002). Method based on solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*, 964, 153–160.

- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, 33, 929–936.
- Richter, P., Leiva, C. Choque, C., Giordano, A and Sepúlveda, B. 2009. Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8598–602.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G., Watts, M., Wenzel, A. (2003) Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Seo, J., Kim, H., Chung, B and Hong, J. (2005). Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1067,303–09.
- Sodré, F., Pescara, I., Montagner, C., Jardim, W. (2010). Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 96, 92–98.
- Viglino, L., Aboufadi, K., Prevost, M., Sauvé, S. (2008). Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS. *Talanta*, 76, 1088–1096.
- Vo Duy, S., Fayad, P., Barbeau, B., Prévost, M and Sauvé, S. (2012). Using a novel sol–gel stir bar sorptive extraction method for the analysis of steroid hormones in water by laser diode thermal desorption/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 101,337–45.
- Vulliet, E., Wiest, L, Baudot, R., Grenier, M. (2008). Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210, 84–91.
- Yang, L., Luan, T., and Lan, C. (2006). Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1104, 23–32.
- Zafra, A., Ballesteros, B., Navalón, A., Vílchez, J. (2008). Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 88, 87–94.

CONCLUSION GENERAL

De acuerdo a nuestros objetivos se puede concluir lo siguiente:

Es posible Degradar disruptores endocrinos contenidos en una muestra acuosa, a través de técnicas de Foto Fenton, Electrooxidación y Fotoelectrooxidación.

Se estudiaron las cinéticas de la reacción (estudios preliminares) a través de HPLC-UV y se concluye que; una mayor longitud de puente salino (30 cm) y un menor volumen de solución (90 mL) favorecen las remociones. Al igual se observa la influencia en la degradación, de las variables concentración de electrolito soporte, del pH y del potencial, además de las concentraciones del sustrato, las cuales se mantienen en $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ya que permiten obtener remociones de Estriol 5 veces mayores que para $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ y el doble de remoción para EE2 a los 120 min de reacción. A la luz de estos resultados se procede a realizar un diseño experimental.

El análisis multivariado nos permite concluir que los factores más importantes en la degradación de E3/EE2 por Electrooxidación, son: $X_1=\text{pH}$, seguido de $X_3=\text{Voltaje}$ y existe un efecto cruzado importante de X_1X_3 (pH, voltaje) y un efecto de segundo orden X_3X_3 (voltaje, voltaje) que son antagonicos a la degradación. Por Fotoelectrooxidación al igual que en Electrooxidación, las variables más importantes son: $X_1=\text{pH}$, seguido de $X_3=\text{Voltaje}$, y el efecto antagonico de X_1X_3 (pH, voltaje), sólo existe una diferencia con el sistema anterior, en que se observa efecto de segundo orden del electrolito para Estriol, pero este es un efecto de menor grado. Lo más relevante se obtiene al observar las claras diferencias en los promedio de los polinomios que denotan las mayores remociones de la técnica de Fotoelectrooxidación tanto para Estriol como Etinilestradiol. Por último en el caso de Foto Fenton los coeficientes de primer orden más importantes son $X_2=\text{Fe (II)}$ y $X_1=\text{H}_2\text{O}_2$, seguido del efecto cruzado de X_1X_2 (H_2O_2 , Fe (II)), además existe un efecto antagonico de X_1X_1 (H_2O_2 , H_2O_2).

Se logra obtener un óptimo a través del polinomio y superficie de respuesta, que presenta una degradación de 47-64 % (E3/EE2) por Electrooxidación, 85-95% (E3/EE2) por Fotoelectrooxidación y 82-90 % (E3/EE2) por Foto Fentón.

Las mineralizaciones son seguidas para los distintos tratamientos, obteniendo porcentajes de 29 % por Electrooxidación, 84% Fotoelectrooxidación y de un 31%. Por Foto Fentón.

Los productos de degradación obtenidos de las reacciones de Fotoelectrooxidación muestran casi nula actividad estrogenica (Crecimiento similar al control negativo), a diferencia del tratamiento electroquímico donde aumenta la estrogenicidad.

Por ultimo complementario a nuestros objetivos es factible extraer Estriol y Etinilestradiol por RSDE desde muestras de agua residuales sobrecargadas, utilizando la fase sorbente Oasis HLB y C18, obteniendo porcentajes de recuperación superiores al 87%.

Es posible detectar y cuantificar Estriol y 17α etinilestradiol en el tratamiento primario, por la técnica antes validada, y ratificar que es necesario contar con tratamientos efectivos para la eliminación de estos compuestos, ya que sus concentraciones se encuentran en niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$; sin embargo también hay que disponer de detectores sensibles que permitan, detectarlos a niveles de ng L^{-1} , ya que a estas concentraciones también se tiene evidencia de sus efectos negativos.