

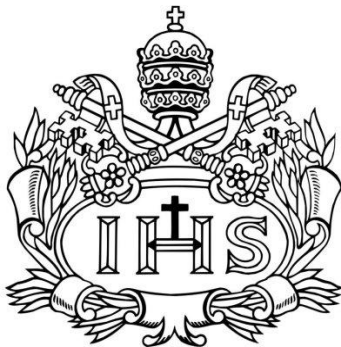
**SENSIBILIZACIÓN DE PELÍCULAS SEMICONDUCTORAS DE TiO_2 A PARTIR DEL
COLORANTE EXTRAÍDO DE LAS HOJAS DE CHOKANARI (*Picramnia sellowii*)**



DIANA CAROLINA GARCIA PEÑARANDA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLÓGIA INDUSTRIAL
2011**

**SENSIBILIZACIÓN DE PELÍCULAS SEMICONDUCTORAS DE TiO_2 A PARTIR DEL
COLORANTE EXTRAÍDO DE LAS HOJAS DE CHOKANARI (*Picramnia sellowii*)**



DIANA CAROLINA GARCIA PEÑARANDA

CARLOS ENRIQUE DAZA
Químico, Ph.D.
Profesor del Departamento de Química.
DIRECTOR

RICARDO VERA
Químico, Ph.D.
Profesor del Departamento de Química
JURADO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
2011

**SENSIBILIZACIÓN DE PELÍCULAS SEMICONDUCTORAS DE TiO_2 A PARTIR DEL
COLORANTE EXTRAÍDO DE LAS HOJAS DE CHOKANARI (*Picramnia sellowii*)**



DIANA CAROLINA GARCIA PEÑARANDA

Ingrid Schuler, Ph. D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios, M Sc-M. Ed
Directora de Carreras de Microbiología

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS
MICROBIOLÓGIA INDUSTRIAL
2011**

NOTA DE ADVERTENCIA:

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se duplique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946.

RESUMEN

La fotocatalisis con dióxido de titanio (TiO_2) es un proceso de oxidación avanzada (POAs) que se ha utilizado ampliamente para la eliminación de microorganismos patógenos presentes en aguas residuales, no obstante, su uso ha sido tan solo efectivo utilizando luz UV. El uso de colorantes orgánicos adsorbidos en la superficie del TiO_2 , proceso conocido como sensibilización, es una alternativa para disminuir el valor del *Band-Gap* del semiconductor y disminuir el requerimiento energético necesario para la dinámica fotocatalítica.

En el presente trabajo de grado se propuso el uso de los colorantes extraídos de Chokanari (*Picramnia sellowii*) para la sensibilización de películas semiconductoras de TiO_2 obtenidas por el método de sedimentación sobre sustratos de borosilicato.

En la primera parte de este estudio se evaluaron los métodos soxhlet y ultrasonido para la extracción de los colorantes a partir de las hojas de la planta y se realizó su separación mediante cromatografía en capa preparativa. Posteriormente, las películas de TiO_2 fueron sensibilizadas utilizando los colorantes extraídos mediante *spin-coating* (5000rpm/1min), la absorción de luz de las películas fue evaluada mediante espectroscopía UV-VIS. En la segunda parte del trabajo, las películas sensibilizadas fueron empleadas en la inactivación fotocatalítica de *E. coli* en experimentos de 6 horas mediante la técnica de microgota.

El trabajo permitió establecer que la extracción en frio asistida con ultrasonido fue adecuada para la obtención de los colorantes limitando su oxidación. Los colorantes extraídos son probablemente cromóforos de tipo antraquinónicos que fueron separados efectivamente con acetato de etilo en capa delgada preparativa obteniéndose seis diferentes compuestos.

La sensibilización utilizando los colorantes fue exitosa ya que se demostró la disminución del valor del *Band-Gap* del TiO_2 de 3,18 (eV) en el caso de la película sin colorantes a 2,58 (eV) para las películas con colorantes. Se lograron inactivaciones de *E.coli* entre el 18 y 22% con las películas sensibilizadas las cuales fueron superiores a las obtenidas con la película de TiO_2 sin sensibilización. La lixiviación del colorante durante los experimentos de inactivación fue mínima. Claramente, los resultados obtenidos demostraron los beneficios en el proceso fotocatalítico logrados con la adsorción de los colorantes de Chokanari en la superficie del TiO_2 .

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	7
2. Formulación del Problema	9
3. Marco Teórico	10
3.1 Dióxido de Titanio (TiO ₂)	10
3.2 Fotocatálisis heterogénea con TiO ₂	10
3.3 Sensibilización de TiO ₂	11
3.4 Colorantes Naturales	11
3.5 Colorantes orgánicos extraídos de plantas	11
3.5.1 Compuestos polifenólicos	11
3.5.2 Colorantes antraquinónicos	11
3.6 Chokanari (<i>Picramnia sellowii</i>): Antecedentes	12
3.6.1 Compuestos químicos presentes en Chokanari	12
4. Objetivos	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Específicos	13
5. Metodología	14
5.1 Primera parte: Extracción de los colorantes	14
5.2 Segunda parte: Sensibilización de las películas de TiO ₂	15
5.3 Tercera parte: Inactivación de <i>E.coli</i>	15
6. Resultados y Discusión	17
6.1 Primera parte: Extracción de los colorantes	17
6.2 Segunda parte: Sensibilización de las películas de TiO ₂	18
6.3 Tercera parte: Inactivación de <i>E.coli</i>	18
7. Conclusiones	20
8. Recomendaciones	20
9. Bibliografía	21
10. Anexos: Lista de Figuras	23
11. Anexos: Lista de Tabla	29

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del medio ambiente, y en especial del agua, se está convirtiendo en un problema cada vez más serio en la actualidad. La mayoría de los países en desarrollo tienen problemas en la distribución y abastecimiento de agua potable lo cual implica una disminución del recurso para el consumo humano y agrícola. La mayor parte de las fuentes de agua no solo están contaminadas por productos químicos derivados de actividades industriales, sino también por microorganismos patógenos y, por tanto, necesariamente deben ser tratadas antes de su uso [1-2].

Durante muchos años, se han venido aplicando diferentes métodos de desinfección del agua. Los métodos tradicionales de desinfección, eficaces contra la mayoría de microorganismos patógenos, pueden ser demasiado costosos de implementar en regiones en desarrollo y a su vez presentan consecuencias desfavorables por su uso ya que pueden producir subproductos tóxicos que pueden afectar la salud humana [2].

En tal sentido, se han implementado otros métodos para la depuración de aguas, que permiten obtener un agua de mejor calidad con menores costos y riesgos para la salud. Estos métodos son los procesos de oxidación avanzada (POAs), que están teniendo una progresiva implantación en los países industrializados. La finalidad de estos métodos es purificar el agua y aumentar la calidad de la misma una vez que ha pasado por un proceso de depuración primaria, ya que estos procesos tienen como objetivo la desinfección, al eliminar o inactivar bacterias y virus [3].

Los POAs se basan en la producción y uso de especies altamente oxidantes, que interactúan con cualquier tipo de compuesto orgánico e inorgánico. La especie oxidante altamente reactiva y no selectiva más usada es el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Esta capacidad oxidante permite el ataque a cualquier tipo de sustancia, especialmente de carácter orgánico que se encuentran en aguas contaminadas llevándolos finalmente a la obtención de productos como CO_2 , H_2O e iones inorgánicos [3].

Dentro de los POAs, la fotocatalisis ha sido uno de los métodos más empleados y que presentan alta eficiencia. Los fotocatalizadores se caracterizan por su capacidad para realizar procesos de oxidación-reducción simultáneos mediante activaciones fotónicas que ocurren en la superficie del material. Estas reacciones fotocatalíticas están implicadas en los procesos de degradación de los compuestos orgánicos contaminantes [4].

El TiO_2 ha sido el material semiconductor más utilizado en las reacciones fotocatalíticas debido a su alta eficiencia, estabilidad, bajo costo y nula toxicidad. Sus aplicaciones van desde la degradación de compuestos orgánicos hasta la inactivación de virus, bacterias, fungicidas, algas, células cancerígenas, etc. [1-3]. En la Pontificia Universidad Javeriana, se han realizado estudios en los que se aplicó la fotocatalisis con TiO_2 para la depuración de aguas residuales obteniéndose resultados de hasta 100% de inactivación de microorganismos coliformes utilizando luz UV [5].

Sin embargo, a pesar de ser un proceso considerablemente efectivo, su limitación radica en la necesidad de usar luz ultravioleta para generar toda la dinámica fotocatalítica debido al alto valor del *Band-Gap* del semiconductor [6]. Para superar esta limitación, se ha propuesto como alternativa la sensibilización de la superficie del material usando colorantes orgánicos, los cuales al tener la capacidad de absorber energía en todo el rango de la luz visible funcionan como inyectores de electrones directamente en la banda de conducción del TiO₂. No obstante, los compuestos utilizados en algunos casos son de un alto costo y pueden representar contaminación colateral. Para superar esta limitante se ha utilizado colorantes naturales con características similares a los colorantes sintéticos, los cuales pueden ser ventajosos para el transporte de carga entre el óxido y la fase que se impregna [6]. En tal panorama, el uso de colorantes naturales es altamente pertinente y es objeto de diversas investigaciones actuales.

En el presente trabajo de grado, se estudió la extracción de colorantes a partir de las hojas de Chokanari (*Picramnia sellowii*) como sensibilizadores de películas de TiO₂. La Chokanari es una de las plantas silvestres adaptadas provenientes de la Amazonía conocida por su capacidad tintórea [7].

En la primera parte de la investigación, se estudiaron dos métodos para la extracción del colorante la cual no ha sido reportada y se realizó la separación de los compuestos presentes en los extractos obtenidos mediante métodos cromatográficos en placa delgada. Los extractos obtenidos fueron empleados para la sensibilización de películas de TiO₂ preparadas por sedimentación en sustratos de borosilicato, la técnica empleada para la deposición de los colorantes fue *spin-coating* que asegura la homogeneidad del recubrimiento sobre la superficie. En la segunda parte, se evaluó la capacidad inactivante de las películas sensibilizadas en experimentos fotocatalíticos mediante la técnica de microgota sobre cepas de *E. coli*.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente en Colombia, las legislaciones ambientales exigen que los residuos industriales acuosos contengan bajos niveles de contaminación por lo que la obtención de materiales para ser empleados en procesos de depuración de dichos contaminantes es altamente pertinente y necesaria. Las reacciones fotocatalíticas mediante la utilización de semiconductores han sido aplicados para llevar a cabo procesos de fotodegradación de contaminantes con altas eficiencias [6].

El dióxido de titanio (TiO_2) ha sido empleado como catalizador en diferentes procesos avanzados de foto-oxidación para la eliminación y depuración de aguas con diferentes contaminantes entre los cuales se encuentran los microorganismos, compuestos fenólicos, entre otros derivados de actividades agrícolas y/o industriales [3].

No obstante, la eficiencia energética que presenta el TiO_2 es baja debido a que la absorción de luz solo sucede en la región del UV por el alto valor del *Band-gap* que presenta la fase anatasa de este óxido. El incremento de la capacidad semiconductor del TiO_2 mediante la adsorción superficial (sensibilización) de colorantes orgánicos ha recibido notable y creciente interés científico. La sensibilización disminuye el valor del *Band-gap* hacia la región visible del espectro gracias a la transferencia de carga de los grupos cromóforos de la estructura del colorante. En la búsqueda de este propósito, se han utilizado colorantes provenientes de productos naturales lo cual representa un beneficio económico adicional dado el uso racional de los recursos de origen vegetal [8,9].

En Colombia, son muchas las plantas silvestres que contienen pigmentos que pueden ser empleados en la sensibilización del TiO_2 . Entre ellas se puede mencionar la Chokanari (*Picramnia Sellowii*) como una de las plantas silvestres de la Amazonia que contienen colorantes. De las hojas de esta planta se obtiene un extracto de color violeta intenso que probablemente está compuesto por antraquinonas [9]. Por literatura se sabe acerca de estudios donde se han utilizado colorantes de tipo orgánico extraídos de las plantas empleadas para la sensibilización de TiO_2 en paneles solares, teniendo gran auge y permitiendo obtener buenos resultados para mejorar la energía fotovoltaica. Algunas de estas plantas son el Achiote y Espinaca [8,9].

En el presente trabajo de grado, se estudia la sensibilización de películas semiconductoras de TiO_2 mediante la adsorción superficial de los colorantes extraídos de Chokanari obtenidos mediante extracción con solventes y su capacidad de inactivación fotocatalítica frente a cepas de *E.coli*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Dióxido de Titanio (TiO₂)

El TiO₂ es uno de los materiales más usados para la degradación oxido-reductiva de contaminantes presentando múltiples ventajas funcionales que incluyen alta eficiencia foto-catalítica, estabilidad física y química, bajo costo y baja toxicidad, además de ser de fácil obtención [6]. El TiO₂ tiene tres estructuras cristalinas: rutilo, anatasa y brookita. De ellas, la más estable es el rutilo y la más activa foto-catalíticamente es la anatasa. Ambas pueden describirse en términos de cadenas de octaedros de $-TiO_6-$ y las diferencias entre las dos estructuras están relacionadas con la distorsión de cada octaedro y el patrón de unión de las cadenas. Como consecuencia de estas diferencias, el rutilo y la anatasa tienen densidades de masa y estructuras de banda electrónica diferentes [10].

En relación a la respuesta espectral del TiO₂, cabe mencionar que el material sólo es activo en la región ultravioleta cercana, debido a que su salto de banda (*Band-Gap*) se encuentra entre 3.02 y 3.24 (eV) en las estructuras cristalinas rutilo-anatasa. Por este motivo, solo es posible aprovechar alrededor de un 5% de la intensidad del espectro de la luz solar. Para solucionar esta limitante se han desarrollado diversos métodos dentro de los que se pueden destacar el dopaje del TiO₂ con metales de transición como Cu, Co, Ni, Ru, Au y la sensibilización con colorantes [11].

3.2 Fotocatálisis heterogénea con TiO₂

La fotocatálisis heterogénea está basada en la generación de radicales hidroxilos altamente reactivos, por irradiación de luz UV y/o visible en las partículas semiconductoras de TiO₂. Cuando el TiO₂ se irradia con una onda electromagnética de alta frecuencia propicia un fenómeno fotoeléctrico de excitación, en el que la energía de los fotones ($h\nu$) es absorbida por los electrones presentes en la banda de valencia (BV) desencadenando un salto energético a una banda superior denominada banda de conducción (BC). Esta dinámica crea vacantes en los espacios antes ocupados por los electrones en la BV formándose así pares electrón-hueco. Los pares electrón hueco son capaces de producir una serie de reacciones redox. Los electrones foto-excitados que se encuentran en la BC inician etapas reductivas en donde el contaminante o agentes aceptores de electrones como el O₂ adsorbido o presente en el medio, se pueden reducir. Por su parte, los huecos fotogenerados dan inicio a etapas oxidativas en donde las moléculas orgánicas se pueden oxidar. [6,9,12-14].

El TiO₂ ha demostrado ser muy eficiente en la purificación de aguas mediante procesos de fotodegeneración de compuestos orgánicos, virus, bacterias, hongos, algas y células cancerosas [8,15].

3.3 Sensibilización de películas de TiO₂

En los procesos de fotocátalisis, el sensibilizante (usualmente compuestos cromóforos) es anclado en la superficie de partículas semiconductoras. De tal forma, las moléculas del colorante absorben la luz visible y excitan a los electrones que a su vez son inyectados en la BC del semiconductor causando una posible disminución en el *Band-Gap* [16]. Un colorante adecuado para el proceso de sensibilización debe unirse fuertemente a la superficie del semiconductor y poseer potenciales de oxido reducción favorables para la regeneración seguida de la excitación.

Los colorantes orgánicos con un alto coeficiente de absorción podrían utilizarse en películas de óxidos metálicos, lo cual sería ventajoso para el transporte de carga y la disminución del valor del *Band-gap*. Los colorantes orgánicos usados pueden ser aquellos encontrados en las plantas, frutas y otros productos naturales [9,17].

3.4 Colorantes Naturales

Un colorante natural es aquel cuyo origen es vegetal o animal y contiene grupos cromóforos, que son los que le dan color al compuesto. Los colorantes naturales se consideran en general como inocuos y sus limitaciones son menores que la de los colorantes artificiales; además tienen como desventaja notoria la complejidad con la que se encuentran en la naturaleza, ya que generalmente no están solos en su estructura [8-18].

3.5 Colorantes orgánicos extraídos de plantas

La gran gama de colores que exhiben las plantas son generados por los colorantes presentes en sus células, principalmente de hojas, flores y frutos. Con base en sus estructuras químicas estos colorantes pueden ser clasificados en cuatro familias: tetrapirroles (ej: clorofila), carotenoides (ej: caroteno), polifenólicos (ej: antocianinas y antraquinonas), y alcaloides (ej: betalainas) [19].

3.5.1 Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenolicos son descritos porque contienen múltiples funciones fenólicas y son normalmente encontrados en plantas superiores. Adicionalmente, son los responsables de generar color a las flores a causa de interacciones de tipo supramolecular. Otros factores como el apilamiento de grupos aromáticos, tautomerismo, y pH, pueden también influir sobre dicho efecto [20].

3.5.2 Colorantes antraquinónicos

Los pigmentos antraquinónicos están ampliamente difundidos en la naturaleza. En plantas, se pueden encontrar principalmente en la familias de las Rubiaceas, Leguminosas, Ramnaceas, Poligonaseas y Escrofulariaceas [21]. Las antraquinonas son compuestos aromáticos tricíclicos derivados del antraceno en donde los sustituyentes

más frecuentes son los grupos hidroxilo, metoxilo, metilo, y carboxilo. En algunas plantas pueden ser encontrados como O- y C- glucósidos con D-glucosa y L-ramnosa. Las antraquinonas son sustancias, rojas, amarillas o anaranjadas fuertemente oxidantes incluso durante el almacenamiento y secado del material vegetal [22].

3.6 Chokanari (*Picramnia sellowii*): Antecedentes

Picramnia es el género típico de la familia *Picramniaceae*, éste comprende unas 40 especies neo-tropicales, distribuidas desde La Florida hasta Brasil y Argentina. El género *Picramnia* había sido considerado como el más grande y complejo de la familia *Simaroubaceae*; sin embargo, recientemente se ha propuesto promoverlo a una nueva categoría taxonómica dadas las diferencias morfológicas y quimiotaxonómicas que presentan las especies de los géneros que la constituyen (*Picramnia* y *Alvaradoa*) con relación a las incluidas en las simarubáceas [23].

Este género comprende varias especies que han sido apreciadas y utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades curativas para contrarrestar el efecto de algunas afecciones gástricas e intestinales, como en el tratamiento de la malaria y la sífilis. Balderrama, et. al. [24], indicaron que la *Picramnia sellowii* es usada por la etnia *Moseten* en Bolivia para las enfermedades de la piel.

La Chokanari (*Picramnia Sellowii*) se caracteriza principalmente porque contiene colorantes naturales. Dentro de lo poco que se conoce en nuestro país, se menciona que los indios *Tikuna*, asentados en el Amazonas, utilizan las hojas y los tallos de dicha planta para extraer un pigmento de color violeta muy intenso y colorar sus vestimentas y artesanías [7].

3.6.1 Compuestos químicos presentes en Chokanari

Generalmente, las plantas de la familia *Simaroubaceae* contienen Quasinoídes con actividades antiplasmódica y citotóxica. En la corteza de la planta se ha encontrado metabolitos como ácido Betulínico, ácido 3-epibetulínico, crisofanol, emodina, parietina y ácido benzoico. A su vez, la *Picramnia sellowii* presenta triterpenos de ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido eiquinocístico y ácido pomólico [23]. El género *Picramnia* presenta metabolitos como ácidos grasos, triterpenos pentacíclicos y antraquinonas. Las antraquinonas como el crisofanol y la emodina pueden ser las responsables de la capacidad tintórea de la planta [25].

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Sensibilizar películas semiconductoras de TiO_2 a partir del colorante extraído de las hojas de Chokanari (*Picramnia sellowii*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer los colorantes de Chokanari (*Picramnia sellowii*) comparando los métodos Soxhlet y ultrasonido.
- Determinar el efecto sensibilizante de los colorantes de Chokanari (*Picramnia sellowii*) sobre películas de TiO_2 .
- Evaluar la capacidad de inactivación fotocatalítica de *E. coli* utilizando películas de TiO_2 sensibilizadas con el colorante de Chokanari (*Picramnia sellowii*).

5. METODOLOGÍA

El presente trabajo de grado se llevó a cabo en las instalaciones y con el apoyo logístico del Grupo de Fitoquímica (GIFUJ) del Departamento de Química de la Pontificia Universidad Javeriana.

5.1 PRIMERA PARTE: EXTRACCIÓN DE LOS COLORANTES

5.1.1 Adecuación del material vegetal

Las hojas de Chokanari (*Picramnia sellowii*) fueron suministradas por la reserva ecológica *Mogambo* ubicada en el municipio de Viotá, Departamento de Cundinamarca. Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente durante 7 días. Posteriormente, la planta se molió finamente (Ver Figura. 1).

5.1.2 Extracción de los colorantes mediante los métodos: soxhlet y ultrasonido

Mediante el método Soxhlet, la extracción se realizó con 250 mL de etanol y 30 g del material vegetal. Se realizó un calentamiento cuidadoso hasta el punto de ebullición del solvente. Este proceso se repitió continuamente hasta que cesó la extracción. Posteriormente, el extracto se concentró en rotavapor y se refrigeró en frasco ámbar para protegerlo de la luz (Ver Figura. 2-A) [18].

Mediante el método con ultrasonido, la extracción se realizó con 450 mL de Etanol y 10 g del material vegetal. El recipiente que contenía la mezcla fue sumergido en el baño ultrasónico (Branson 90W, 47kHz) haciendo repeticiones prolongadas durante 20 minutos hasta que cesó la extracción. Posteriormente, el extracto se concentró en rotavapor y se refrigeró en frasco ámbar para protegerlo de la luz (Ver Figura. 2-B) [26].

Los extractos obtenidos mediante los métodos descritos anteriormente fueron tratados con éter de petróleo (tres veces) para retirar compuestos apolares de la mezcla y con sulfato de amonio para precipitar proteínas hidrofílicas (Ver Figura. 3) [27]. Adicionalmente, sobre el extracto se realizó una prueba cualitativa para la identificación de antraquinonas (Borntrager-Kraus) [28].

5.1.3 Monitoreo de la composición del extracto por Cromatografía de Capa Delgada (CCD)

La composición del extracto se monitoreó mediante CCD utilizando como fase estacionaria sílica y como fase móvil diferentes solventes de polaridad variable. El revelado de cada placa fue realizado con vapores de I_2 . A partir de los resultados de CCD, se seleccionó el solvente que permitía la mejor separación y se realizó CCD preparativa con el fin de obtener fracciones con mayor grado de purificación [29]. Los valores de los factores de retención (R_f) fueron determinados con la ecuación 1:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} \quad (1)$$

5.1.4 Estudio de la absorción de luz mediante espectroscopía UV-Vis

Las fracciones obtenidas a partir de CCD preparativa fueron disueltas en etanol a 100 ppm y evaluadas mediante espectroscopía UV-VIS utilizando un equipo VARIAN Cary 100 ConC. Los espectros obtenidos para cada una de las fracciones fueron comparados con el de la Alizarina considerada en este trabajo como una antraquinona patrón [30].

5.2 SEGUNDA PARTE: SENSIBILIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE TiO₂

5.2.1 Películas de TiO₂

Las películas utilizadas en el presente trabajo de grado fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Dichas películas fueron preparadas por el método de sedimentación sobre sustratos de borosilicato.

5.2.2 Recubrimiento de las películas de TiO₂ con los colorantes

Las películas de TiO₂ fueron recubiertas utilizando las fracciones obtenidas por CCD preparativa mediante el método *Spin-Coating*. Se agregaron 40 µL de la fracción disuelta en etanol a 5000 rpm por 1 minuto. El secado de las películas fue realizado a temperatura ambiente y las películas fueron almacenadas en cajas de petri con protección de la luz [31].

5.2.3 Determinación del valor del *Band-Gap* (E_g) de las películas de TiO₂

Se llevaron a cabo medidas de espectroscopía UV-Vis sobre las placas del semiconductor sensibilizado y sin sensibilizar. A partir de los espectros obtenidos se determinó el valor del E_g extrapolando el valor desde la base del pico de absorción en la región UV [31].

5.3 TERCERA PARTE: INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE *E.coli*

La inactivación fotocatalítica utilizando las películas de TiO₂ fue realizada con un vial de *Escherichia coli* ACTT8739 suministrado por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

A dicho vial se le realizaron previamente 3 lavados con solución salina al 0,85% p/v y se midió su absorbancia por medio del espectrofotómetro a 540 nm para obtener una concentración inicial de 1×10^5 UFC/ml. A partir de esta suspensión, se colocó una alícuota de 5 mL en caja de petri sin tapa, mas una película de TiO₂ sensibilizada y respectivamente a los dos controles, la película sin sensibilización y la otra es la suspensión de *E. coli*.

La mezcla se dejó por 30 minutos en oscuridad y posteriormente se irradió con dos lámparas de luz visible (17 Watts) durante 6 horas. Al inicio y al finalizar el tratamiento fotocatalítico se realizaron diluciones decimales y por medio de la técnica de microgota

(Ver Figura 4), se sembraron 20 μL de muestra en agar BHI. Las cajas se incubaron por 12 horas a temperatura ambiente y se realizaron los recuentos expresando el promedio como \log_{10} de UFC/mL para determinar el % de inactivación celular [32]. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PRIMERA PARTE: EXTRACCIÓN DE LOS COLORANTES

El colorante se obtuvo a partir de las hojas de Chokanari (*Picramnia sellowii*) comparando dos métodos de extracción. El primer método empleado fue Soxhlet, observándose que al finalizar el proceso las hojas no se decoloraron totalmente lo que sugiere una extracción parcial de los colorantes. Adicionalmente, se observó que la coloración del extracto cambió de un color vinotinto a un color negro. Este cambio probablemente es causado por la temperatura y la luz, ya que estas condiciones pueden inducir cambios químicos originados por la oxidación de los compuestos presentes en el extracto. A su vez, la temperatura puede ejercer un efecto negativo sobre el material tintóreo, ya que después de 60°C hay degradación del material vegetal, además, el tiempo de extracción también puede afectar a la planta, por lo que se ha demostrado que de 4 a 6 reflujos son adecuados para extraer la mayor cantidad de colorantes en el menor tiempo posible [33].

El segundo método evaluado fue la extracción ultrasonido. Dicho método limitó la oxidación del extracto al no perder su color original durante el proceso. Adicionalmente, la extracción se logró en un menor tiempo de extracción el cual fue de 1 hora [26,34]. Considerando los resultados de los métodos de extracción, en el presente trabajo se utilizó el método de ultrasonido para la extracción de los colorantes.

Con el objetivo de determinar la posible presencia de compuestos antraquinónicos en el extracto obtenido con ultrasonido, se realizó un ensayo cualitativo de identificación de quinonas (reacción de Borntrager) que arrojó resultado positivo [28]. Esto permitió establecer que el extracto efectivamente contiene cromóforos antraquinónicos que son los causantes de la coloración de la planta.

La composición química del extracto se evaluó utilizando CCD, se evaluaron mezclas de solventes de polaridades (baja, media y alta) en relaciones 9:1, 1:9 y 5:5 de metanol, diclorometano y acetato de etilo y también se probaron estos solventes puros. El solvente que ofreció la mejor separación del extracto fue el acetato de etilo lo cual está de acuerdo con lo reportado en la literatura [35]. Por tal razón, el acetato de etilo fue seleccionado para realizar la CCD preparativa en la cual se encontraron 6 fracciones con diferentes R_f , lo cual permitió establecer que el extracto contiene diferentes compuestos coloreados (Ver Figura. 5). En el presente trabajo se evaluaron como compuestos sensibilizantes aquellos contenidos en las 6 fracciones separadas.

De acuerdo con la literatura, se ha podido establecer que uno de los métodos que ofrece mayor información respecto de los compuestos quinónicos es la espectrofotometría UV-Visible. Por tal motivo, se realizó una medición cualitativa por medio de este método para determinar las características cromofóricas de las fracciones obtenidas. Se ha reportado que el colorante extraído de Chokanari está constituido por antraquinonas [25,35]. Al respecto se conoce que los espectros UV-VIS de las antraquinonas presentan máximos de absorción en UV entre 240 y 260 nm (anillos aromáticos), entre 260 y 300 nm

(quinónico) y en la región visible entre 360 y 520 nm dependiendo del color del compuesto. En el presente trabajo, se utilizó un compuesto patrón (Alizarina) del tipo antraquinónico con el objeto de realizar una comparación con los espectros de las fracciones obtenidas [36].

Después de analizar los espectros obtenidos en la región UV, se pudo establecer que para todas las fracciones se presentan similitudes al espectro del patrón en el rango de 200 hasta 400 nm, esto sugiere preliminarmente que todas las fracciones contienen antraquinonas. Por su parte, en la región visible, los espectros de las fracciones obtenidas presentan señales de absorción en la región entre 500 y 600nm, a su vez, el patrón presenta señales entre 400 y 500nm, lo cual sugiere diferencias estructurales de las antraquinonas o también puede presentar otro tipo de compuestos diferentes a las antraquinonas que pueden estar presente en la planta en comparación con la alizarina (Ver Figura 6) [23]. En la literatura se ha reportado la presencia de antraquinonas como el crisofanol y la emodina en la especia utilizada, la confirmación de la presencia de dichos compuestos deberá ser confirmada con técnicas espectroscópicas avanzadas complementarias.

6.2 SEGUNDA PARTE: SENSIBILIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE TiO₂

Las películas de TiO₂ normalmente tienen un Band-gap de aproximadamente 3 a 3,2 (eV). La sensibilización de la superficie con compuestos cromofóricos disminuye el valor del *Band-Gap*; algunos autores han reportado disminuciones del E_g hasta 1,63 (eV) lo cual confirma la efectividad de la sensibilización [37-39].

En el presente trabajo, el valor del *Band-Gap* de la película de TiO₂ y de la película sensibilizada con la fracción 1, fueron determinados por espectroscopía UV-VIS. En la figura 7 se presenta el método empleado para su determinación. El valor del E_g obtenido para la película de TiO₂ fue de 3,14 (eV) mientras que para la película sensibilizada fue de 2,58 (eV). Este resultado claramente demuestra la sensibilización de la película y sugiere la interacción del semiconductor con el compuesto cromóforo adsorbido, lo cual puede correlacionarse con la actividad fotocatalítica de los materiales.

6.3 TERCERA PARTE: EVALUACIÓN DE LA INACTIVACIÓN FOTOCATALÍTICA DE *E. coli*

En la figura 8 se presentan los resultados de la inactivación de *E.coli* de TiO₂ (control) y de TiO₂ sensibilizado con los colorantes de Chokanari, dichos resultados están también presentados en la tabla 1.

Los resultados hacen evidente que los colorantes generaron un incremento del porcentaje de inactivación de *E.coli* luego de 6 horas de tratamiento respecto al TiO₂ sin sensibilización (control). De las fracciones obtenidas, fue la fracción 3 la que presentó el mayor porcentaje de inactivación (22%) mientras que la fracción 4 fue aquella que presentó el menor porcentaje de inactivación (7,0%). En la figura 9 se puede observar la dispersión estadística de los datos obtenidos.

El proceso de fotocatalisis es un procedimiento efectivo, ya que produce especies reactivas de oxígeno, tal como el radical hidroxilo que puede inactivar bacterias y los aniones superóxido (O_2^-) y radical hidropéroxido (OH_2), que son los encargados de provocar la peroxidación de los componentes estructurales del microorganismo [32,38,40-41].

La inactivación se pudo originar debido a la reactividad del TiO_2 y a la presencia de oxígeno en el agua causando que los componentes orgánicos de los microorganismos se expongan a las especies reactivas de oxígeno antes mencionadas lo cual puede resultar en un daño parcial sobre la permeabilidad de la membrana externa, seguido por daño en la pared y en la membrana plasmática del microorganismo. Se ha reportado que la disrupción de la membrana celular es atribuida a la peroxidación de los fosfolípidos insaturados. Subsecuentemente, la pérdida de fluidos y el incremento de la permeabilidad de los iones permite que el ataque oxidativo de los componentes celulares internos pueden resultar finalmente en la muerte celular [41].

En el presente trabajo se demuestra la efectividad de la sensibilización de las películas con los colorantes de Chokanari y la correlación entre la disminución del valor de E_g y el incremento de los porcentajes de inactivación. Cabe resaltar que la radiación empleada en los experimentos de inactivación fue visible por lo que los resultados obtenidos son aún más relevantes si se considera un futuro uso de luz UV en donde se esperarían porcentajes de inactivación más altos.

7. CONCLUSIONES

La sensibilización de las películas de TiO₂ se realizó por medio del empleo de tintes orgánicos del tipo antraquinonas los cuales fueron obtenidos del extracto de las hojas de Chokanari mediante el proceso de extracción por ultrasonido.

Las fracciones obtenidas de Chokanari contiene compuestos cromóforos probablemente de tipo antraquinonas..

El valor del *Band-Gap* de las películas de TiO₂ disminuyó en cuanto la deposición de los colorantes antraquinónicos señalando la efectividad de la sensibilización.

Se lograron porcentajes de inactivación de *E. coli* entre 18 y 22% (en el caso de las películas más activas) con las películas sensibilizadas utilizando luz visible, los cuales fueron superiores a los obtenidos con la película sin sensibilización.

El presente trabajo presenta una alternativa de alta pertinencia y aplicabilidad para el tratamiento de efluentes acuosos contaminados con agentes patógenos.

8. RECOMENDACIONES

El presente trabajo permite hacer las siguientes recomendaciones para la continuación de la investigación:

- Realizar la identificación estructural de los compuestos antraquinónicos encontrados en las fracciones mediante técnicas como RMN e IR.
- Realizar experimentos en los cuales se varíen las condiciones de desposición de los colorantes sobre las películas de TiO₂.
- Realizar una caracterización óptica y micromorfológica en detalle de las películas de TiO₂ sensibilizadas.
- Llevar a cabo experimentos de inactivación usando luz de mayor energía en flujo continuo de efluente contaminado.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Hashimoto K., Irie H., Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Japanese journal of Applied physics*. 2005; Vol. 44, Nº 12: 8269-8285.
2. Gelover, L.A. Gomez, K. Reyes, M.T. Leal. Antimicrobial nanomaterials for wáter disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*. 2006; 40, 3274–3280.
3. Garriga C. Estrategias de optimización de procesos de descontaminación de efluentes acuosos y gaseosos mediante fotocátalisis heterogénea. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería de Procesos. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España, 2007, 275 p
4. Lydakis, N., Riga, D., Katsivel, E., Mantzavinos, D., y Xekoukoulotakis, N. Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO₂ photocatalysis. *Desalination*. 2010; 250, 351-355
5. Rojas N., Sánchez A., Matiz A., Salcedo J.C, Carrascal A. Pedroza A. Evaluación de tres métodos para la inactivación de coliformes y Escherichia coli presentes en agua residual doméstica, empleada para riego. *Universitas. SCIENTIARUM*. 2010; Vol. 15, Nº 2: 139-149
6. Carp O, Huisman C.L, Reller A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in solid State Chemistry*. 2004; 32, 33 – 177.
7. Cortadi A, Andriolo L, Campagna M, Martinez M, Di sapio O, Broussalis A, Gattuso M, Gattuso S. Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de Simaroubaceae sensu lato de Argentina. Parte I. Alvaradoa subovata Cronquist, Picramnia parvifolia Engl., Picramnia sellowii Planch. y Castela coccinea Griseb. *Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 2010; 9 (1): 38-55.
8. Gómez N., Vázquez I., Pérez A., Mena G., Azamar J., Oskam G. Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials & Solar Cells*. 2010; 94, 40-44.
9. Chang H; Wu, H; Chen, T; Huang, K, Jwo, C; Lo, Y. Dye-sensitized solar cells using natural dyes extracted from Spinach and Ipomoea. *Journal of alloys and compounds*. 2010; 495, 606-610.
10. Peiró A.M. Nuevas Aportaciones al Desarrollo de Metodologías en Química Verde. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Química. Unidad de Química Física. 2001. Barcelona, España. pg. 21-48.
11. Zaleska A. Doped-TiO₂: A Review. *Recent Patents on Engineering*. 2008, 2: 157-164.
12. Konstantinou K, Albanis T. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: Kinetic and Mechanistic investigations a Review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2004, 49:1-4.
13. Pirkanniemi K, Sillanpää M. Heterogeneous water phase catalysis as environmental application: a review. *Chemosphere*. 2002, 48: 1047-1060.

14. Fujishima A, Zhang X., Tryk D. Heterogeneous photocatalysis: From water photolysis to applications in environmental cleanup. *Hydrogen Energy*. 2007, 32: 2664 – 2672.
15. Marugán J, Van Grieken R, Pablos C, Sordo C. Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Research*. 2010; 44, 789-796.
16. Han F., Subba V., Kambala R., Srinivasan M., Rajarathnam D., Naidu R. Tailored titanium dioxide photocatalysts for the degradation of organic dyes in wastewater treatment: A review. *Applied Catalysis A: General*. 2009, 359: 25–40.
17. Chatterjee D, Dasgupta S. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. *Journal of Photochemistry and Photobiology C:Photochemistry Review*. 2005; 6, 186 – 205.
18. Cano T, Cano E, Mérida M, Godínez J, De león T, Barrietos M, Ortiz C, Cano E, Labín J, García I. Evaluación de la capacidad tintórea de los tintes naturales obtenidos de los desechos agroindustriales del Coco y del Aguacate en el proceso de tinción de fibras naturales utilizados en la elaboración de artesanías. Trabajo de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ingeniería. Guatemala, 2008, 107 p
19. Schoefs, B. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1054: 217–226.
20. Handique, J., Baruah J. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers*. 2002, 52: 163–188.
21. Sadisavan, S and Thayumanavan, B. *Molecular Host Plant Resistance to Pest*. CRC press. 2003, 1 -40.
22. Matysik. G. Skalska-Kami. A., Matysik-Wozniak A. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Taylor & Francis Group. 2007, 1-36.
23. Jacobs H. Comparative Phytochemistry of Picramnia and Alvaradoa, genera of the newly established family Picramniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2003; 31, 773-783.
24. Balderrama, L; Braca, A; García, E; Melgarejo, M; Pizza, C; De tommasi, N. Triterpenes and Anthraquinones from Picramnia sellowii Planchon in Hook (Simaroubaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2001 29:331-333.
25. Cornejo, X. Picramnia tumbesina: Una nueva Picramniaceae, endémica del bosque seco tropical al occidente de Ecuador. *Acta bot. Bras.* 2006; 20 (2), 363-366.
26. Cuoco G, Mathe C, Archier Paul, Chemat F, Vieillescazes C. A multivariate study of the performance of an ultrasound-assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatography-photodiode array detection. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009, 16, 75 – 82.
27. Voet D, Voet J, Pratt C. *Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular*. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. 2009. 1264 p.

28. Valiente R., Torrenegra R. Estudio fitoquímico de raíces y frutos de *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh var. *Bicapsularis*. *Actual Biol.* 2003, 25 (79): 113-118.
29. Lamarque A, Zygadlo L, Labuckas D, López L, Torres M, Maestri D. Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica. Primera edición. Editorial Encuentro. Córdoba, Argentina. 2008, 128 p.
30. Arévalo, G. Evaluación de un método por espectroscopía UV-Visible para la detección de contaminantes orgánicos de agua. Trabajo de Grado de la Universidad de San Carlos de Guatemala. 2006. Guatemala.
31. Yao K.S., Wang D.Y., Chang C.Y., Weng K.W., Yang L.Y., Lee S.J., Cheng T.C., Hwang C.C. Photocatalytic disinfection of phytopathogenic bacteria by dye-sensitized TiO₂ thin film activated by visible light. *Surface & Coatings Technology.* 2007, 202, 1329–1332.
32. Rojas N, Sanchez A. Evaluación de la efectividad de la fotocatalisis heterogénea con TiO₂ para la inactivación de *Escherichia coli*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 2009, 39 p.
33. Martín J, Perez D, Orozco M. Evaluación de los colorantes de origen vegetal y su aplicación en el tinturado de las fibras naturales. Facultad de ciencias agropecuarias. 2007. Vol 5, N°2, 90 – 102 p.
34. Derksen G, Niederlander H, Van Beek T. Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography.* 2002, 978, 119-127.
35. Rivas M, Borroto J, Blanco M, Hernández M, Trujillo R, Laffite O. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la planta de Morida royoc L. *Centro Agrícola.* 2006. Vol. 33 N° 3, 65 -69.
36. Saavedra F., Borja N., Rocha G., Apesteguía A., Teixeira J., Revilla A. Análisis por espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller. Interacción con sales inorgánicas. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2010, Vol.76, N° 3, p.242-260
37. Mikroyannidis J., Tsagkournos D., Balraju P. Sharma G. Simple sensitizers of low band gap based on 4-nitro-a-cyanostilbene prepared from a one-step reaction for efficient dye-sensitized solar cells. *Organic Electronics.* 2010, 11, 1242–1249
38. Huang, Z., Maness, P., Blake, D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski, S.L., Jacoby, W.A. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2000; 130 (2-3): 163–170.
39. Thomas K., Prachi S, Abhishek B, Ying-Chan H, Ho K, T'suen L. Electro-optical properties of new anthracene based organic dyes for dye-sensitized solar cells. *Dyes and Pigments.* 2011, 91, 33-43
40. Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research* 2004; 38, 1069–1077.

41. . Dheaya M.A., Patrick S.M., Trudy A., Byrne A. Photocatalytic inactivation of E. coli in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ films. *Water Research*. 2009, 43, 47 – 54.

Anexo 1. Lista de Figuras



Figura 1. Aspecto del material vegetal de partida.

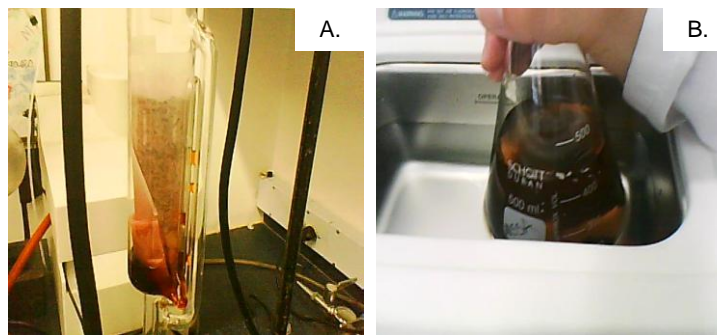


Figura 2. Métodos de extracción de los colorantes. A. Soxhlet, B. Ultrasonido.

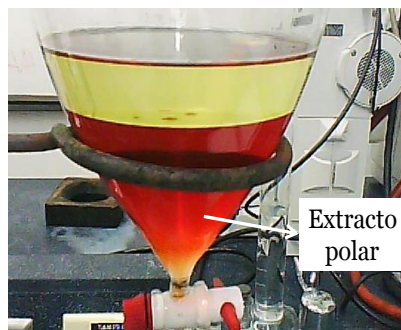


Figura 3. Aspecto del extracto etanólico que contiene los colorantes de Chokanari.

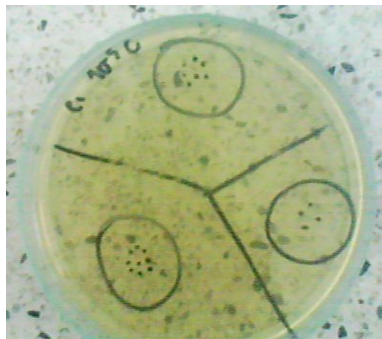


Figura 4. Técnica de microgota para los recuentos de *E. coli*.

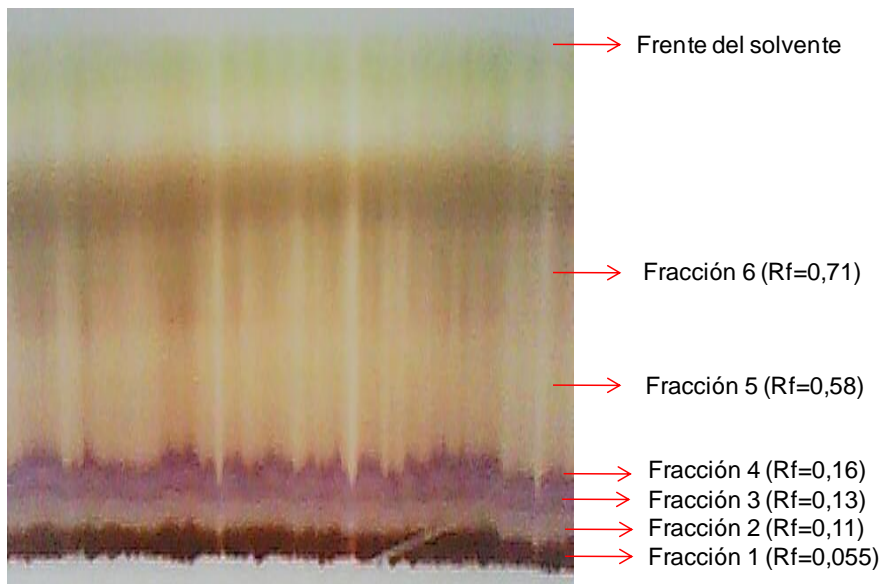


Figura 5. Cromatografía de Capa Delgada Preparativa del extracto de Chokanari.

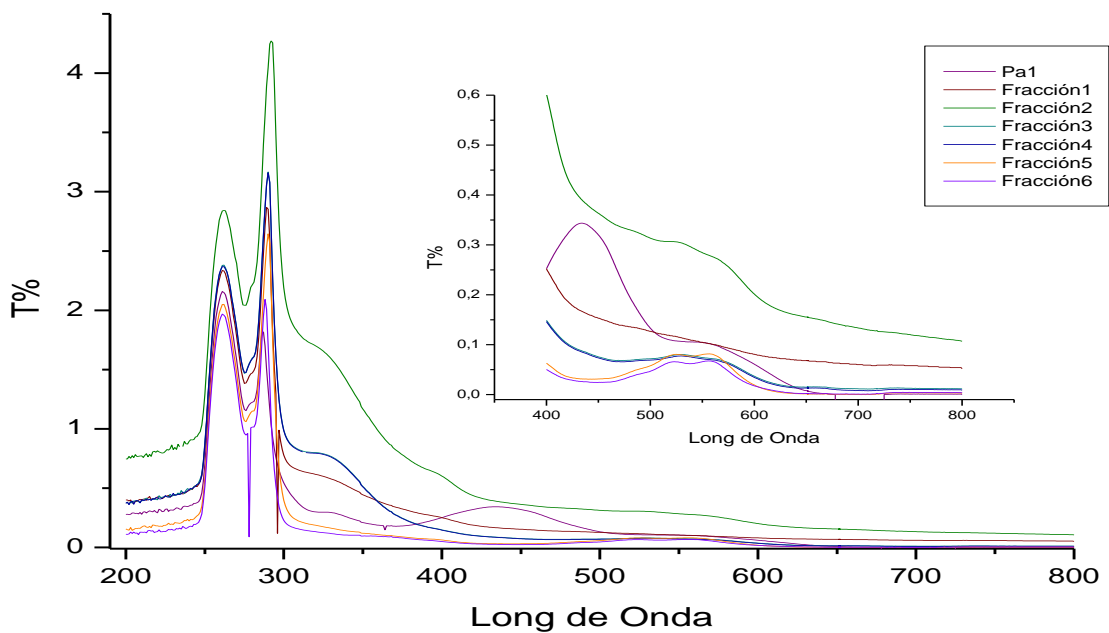


Figura 6. Espectros UV-visible del patrón (Alizarina) y de las 6 fracciones obtenidas. Se realizó una ampliación de la zona visible de los espectros

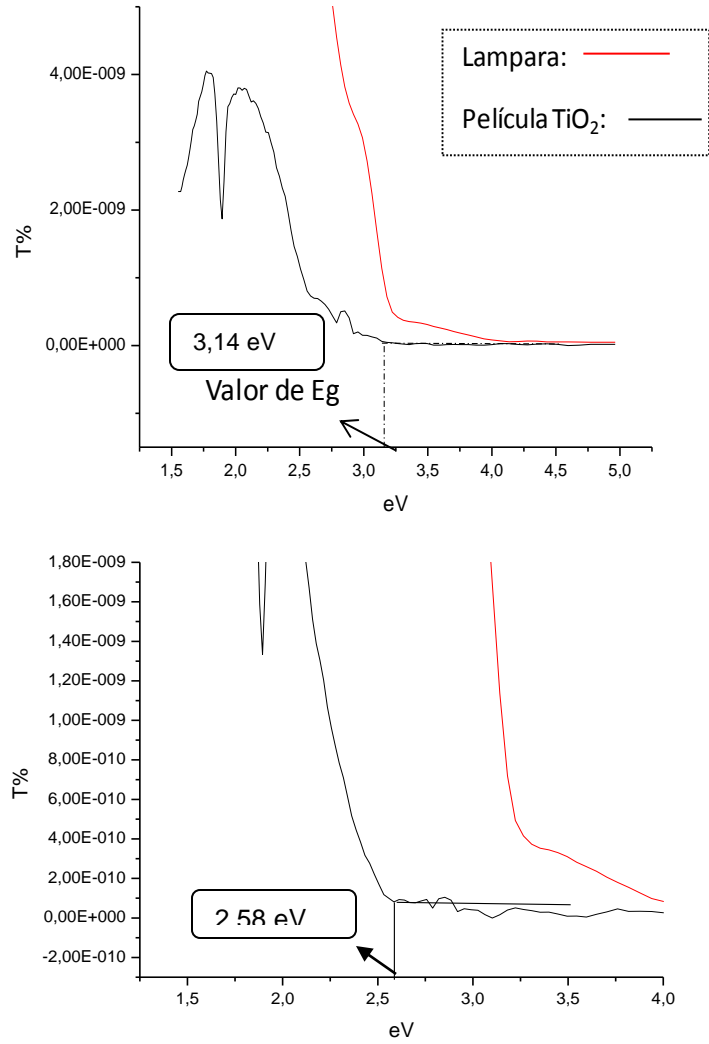


Figura 7. Determinación del E_g de la película de TiO_2 y la película de TiO_2 con el colorante por espectroscopía UV-VIS. El valor de E_g fue determinado por extrapolación en donde comienza la trasmisión de energía.

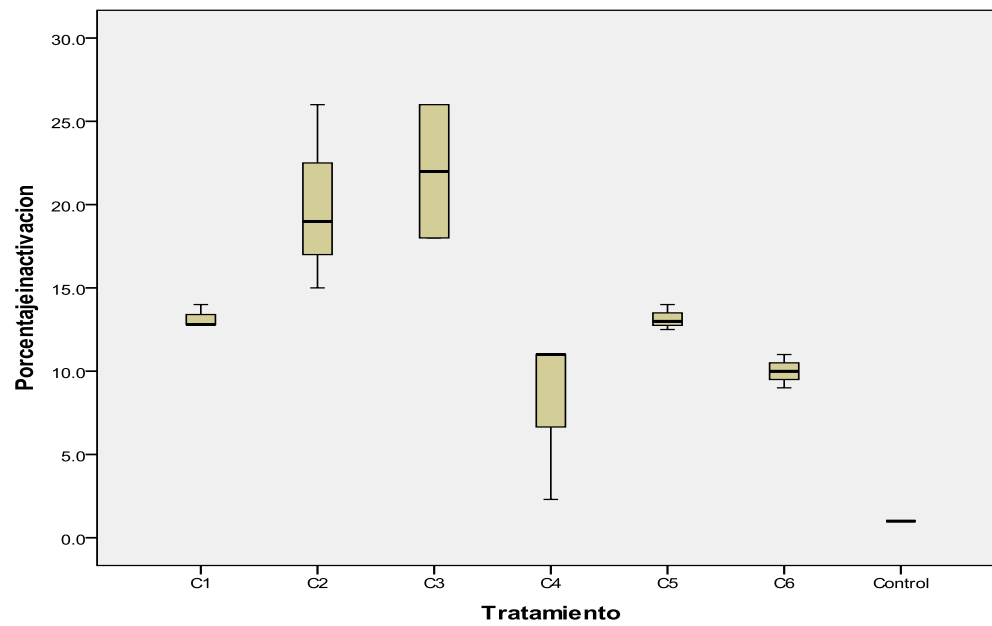


Figura 8. Porcentaje de Inactivación de *E. coli* luego de 6h de tratamiento para cada una de las películas sensibilizadas con los colorantes de Chokanari.

Anexo 2. Lista de Tabla

Colorante	Recuento inicial	Recuento final	Inactivación (%)
Fracción 1	8,6	7,5	12
Fracción 2	8,6	7,0	18
Fracción 3	8,6	6,7	22
Fracción 4	8,4	7,8	7,0
Fracción 5	8,8	7,6	13
Fracción 6	8,6	7,7	10
Control 1	8,7	8,6	1,0
Control 2	8,9	8,9	0,0

Tabla 1. Porcentaje inactivación de cada colorante frente a *E. coli*