

## Desinfección mediante fotosensibilizadores: principios básicos

Guillermo Orellana, Laura Villén y M. Emilia Jiménez-Hernández

Laboratorio de Fotoquímica Aplicada, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, España. Correo electrónico: orellana@quim.ucm.es.

### 1. Introducción

La tecnología tradicional de *fotocatálisis* se basa en la interacción de la luz ultravioleta (UV-A) con semiconductores para producir especies fuertemente oxidantes a partir del agua adsorbida ( $\text{OH}\cdot$ ), las cuales son capaces de degradar la práctica totalidad de posibles contaminantes presentes en agua (pudiendo, en muchos casos, llegar a la mineralización total, ver Capítulo 10) e inactivar bacterias [<sup>1,2,3</sup>]. Además, están los procesos (también de naturaleza fotocatalítica) denominados *fotosensibilización* de «tipo II» o acción fotodinámica (ver Capítulo 14), usando sensibilizadores cuya iluminación con luz UV o visible genera oxígeno molecular *singlete* ( $^1\text{O}_2$ ) por transferencia de energía desde el estado electrónico excitado del fotosensibilizador. Esta especie reactiva del oxígeno se conoce por su eficiencia en la inactivación bacteriana [<sup>4,5,6</sup>].

Así por ejemplo, cuando se irradian con luz visible diversos colorantes como el azul de metileno, el rosa bengala, muchas porfirinas y ftalocianinas muestran efectos citotóxicos mediados por  $^1\text{O}_2$  sobre gran variedad de patógenos, incluidas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras y micoplasmas (ver sección 2). Los estudios sobre fotosensibilizadores de oxígeno *singlete* han estado dirigidos principalmente a su aplicación en terapias fotodinámicas (PDT, ver sección 3), aunque más recientemente también se ha propuesto su uso en el control de infecciones, tales como el tratamiento de llagas, [7] para esterilización de sangre contaminada [8] o en el tratamiento de infecciones periodontales [9]. Algunas ftalocianinas de aluminio o zinc han resultado ser eficaces agentes fotoantimicrobianos y fotoantivirales por iluminación con luz roja [<sup>10,11</sup>]. Este capítulo se centra, fundamentalmente, en las aplicaciones del  $^1\text{O}_2$  para desinfección de agua (sección 4).

### 2. Efecto del oxígeno *singlete* sobre los organismos celulares

El término *oxígeno singlete* se refiere habitualmente sólo al estado  $^1\Delta_g$ . La transferencia de energía entre el estado triplete del sensibilizador (alcanzado

eficientemente por absorción de un fotón) y el  $O_2$  origina un estado electrónico excitado en este último, controlado por la velocidad de difusión. Con un tiempo de vida de 3-5  $\mu s$  *en agua* a temperatura ambiente, la difusión del  $^1O_2$  está muy restringida desde el lugar de su generación hasta sus potenciales dianas, con un recorrido libre medio de aproximadamente 0,1  $\mu m$  [12]. No obstante, en fase gas, el tiempo de vida del  $^1O_2$  es muy superior (hasta 15 min!\*). Este tema se vio en más detalle en el Capítulo 14. El oxígeno singlete frecuentemente es el responsable de los efectos tóxicos en los sistemas vivos producidos por fotosensibilización bajo condiciones aeróbicas. Se han encontrado grupos capaces de reaccionar con  $^1O_2$  en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos [13]. Prácticamente todos los tipos celulares estudiados hasta la fecha, desde procariontes hasta células de mamíferos, sufren daños irreversibles por exposición al  $^1O_2$  que conducen a la muerte celular [10,12,14,15,16,17]. Este efecto citotóxico permite la aplicación de la producción de oxígeno singlete mediante fotosensibilización en diferentes campos, desde las terapias fotodinámicas (PDT), [18] que hoy en día han adquirido importancia en Medicina, hasta las nuevas tecnologías para la desinfección de agua.

En seres humanos, las células fagocíticas generan oxígeno singlete como mecanismo de defensa contra la invasión microbiana, y esta especie reactiva también se ha detectado como producto secundario en algunas reacciones enzimáticas [19].

Los experimentos fotodinámicos en *bacterias* han revelado que la envoltura celular parece ser el componente atacado por el oxígeno singlete y la eficacia de la desinfección depende principalmente de la estructura de la membrana [12]. Ensayos con colorantes en fase heterogénea, separados físicamente de las bacterias objetivo por una delgada capa de aire, han puesto de manifiesto que el sensibilizador no necesita estar unido ni penetrar en la membrana para inactivar las células de forma eficaz [6]. Se ha demostrado que las reacciones del oxígeno singlete están involucradas en la fotomodificación de otras membranas como las de los glóbulos rojos, mitocondrias, microsomas y liposomas [20]. Se han encontrado grupos sensibles al oxígeno singlete no sólo en las membranas lipídicas, sino también en proteínas y ácidos nucleicos [21,22,23].

Así, por ejemplo, tras una irradiación de 5 min con luz de 675 nm en presencia de una concentración 1  $\mu M$  de fotosensibilizador, tiene lugar una disminución de hasta 4-5 órdenes de magnitud en la supervivencia del *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram-positiva), tanto en una cepa salvaje como en una cepa resistente a meticilina [24].

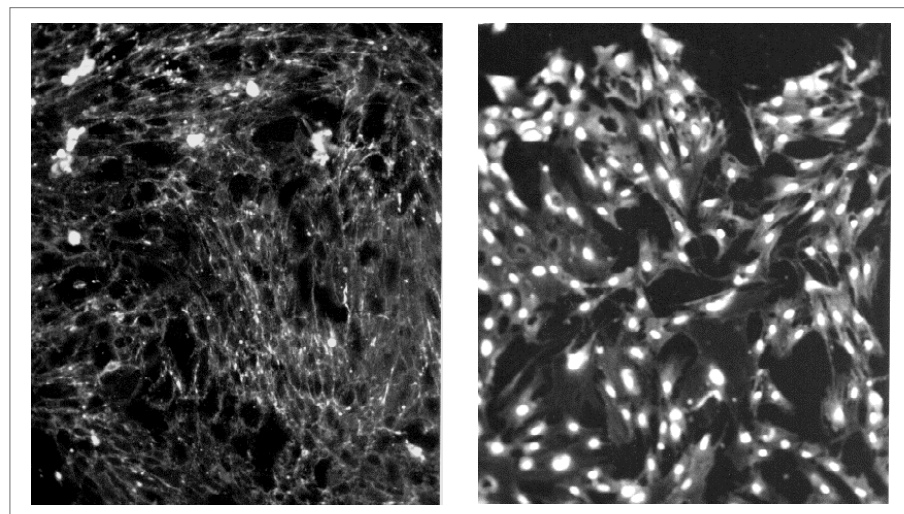
Se han observado diferencias entre la capacidad de desactivación de bacterias Gram(+) y Gram(-) por ciertos fotosensibilizadores, siendo este segundo tipo bacteriano habitualmente más resistente a la inactivación por oxígeno singlete [25,26]. Algunos autores sugieren que la cubierta de lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram(-) puede ofrecer alguna protección frente a los efectos letales de ciertos agentes exógenos, de forma que permitiría a estas bacterias sobrevivir en los que, de otra manera, se considerarían ambientes hostiles. Los LPS son una barrera física y química a través de la cual el  $^1O_2$  y los radicales hidroxilo generados en el exterior celular deben penetrar para interactuar con sus dianas, como son por ejemplo ciertos componentes de la membrana y algunos componentes citoplasmáticos [5].

\* En la práctica, cuando el  $^1O_2$  se genera en aire por fotosensibilizadores inmovilizados, su tiempo de vida rara vez excede de 1 milisegundo debido a la desactivación por el soporte del sensibilizador.

La fotólisis del DNA mediada por  $^1\text{O}_2$  ha recibido una considerable atención. No hay prueba alguna de que el ataque de esta especie reactiva produzca ruptura *directa* del polinucleótido. No obstante, diferentes estudios han demostrado que la reacción del oxígeno singlete con nucleósidos y DNA tiene lugar selectivamente sobre las guaninas, formando 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) como producto principal de la oxidación primaria. Se ha verificado recientemente que, aunque la 8-oxoGua no es un sitio lábil a los álcalis en sí misma, los productos secundarios de la oxidación de este compuesto en los polinucleotidos pueden conducir a roturas de la hebra por tratamiento con piperidina [27]. Estos sitios lábiles al álcali representan en torno a un 30% de las lesiones, frente a menos del 5% correspondiente a las rupturas inmediatas de la hebra [28]. Empleando diversas técnicas de generación de oxígeno singlete (entre otras la difusión desde un fotosensibilizador inmovilizado en una superficie y separado de una disolución de DNA mediante un espacio de aire), se comprobó que es capaz de producir cortes de cadena sencilla en el biopolímero, aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que tienen lugar.

Algunos fotosensibilizadores de  $^1\text{O}_2$  de la familia de los complejos de Ru(II) con un ligando dibenzo[h,j]dipirido[3,2-a:2,3-c]fenazina (ddz) se han utilizado como indicadores de viabilidad celular, por el considerable incremento que experimenta su luminiscencia al intercalarse en el DNA [29, 30]. Además, los complejos  $\text{Ru}[(\text{bpy})_2(\text{ddz})]^{2+}$  y  $\text{Ru}[(\text{phen})_2(\text{ddz})]^{2+}$  (bpy y phen son las abreviaturas de 2,2'-bipiridina y 1,10-fenantrolina, respectivamente) fotosensibilizan la ruptura de las hebras del DNA (in vitro), en disolución acuosa equilibrada al aire con bajo rendimiento (0,03–0,04), que se incrementa hasta 0,1 cuando estos complejos están unidos al DNA doble helicoidal. El factor que determina la eficacia de la ruptura de las cadenas del polinucleótido es la afinidad y modo de interacción del complejo de Ru(II) con el DNA independientemente de su eficiencia en la producción de oxígeno singlete.

**Figura 1.** Microfotografía de fluorescencia de células de Kupfer de ratón incubadas durante 5 min con  $\text{Ru}[(\text{bpy})_2(\text{ddz})]^{2+}$  en la oscuridad (izquierda), y tras iluminación con luz azul (láser de He-Cd, 442 nm) (derecha). La aparición del fotosensibilizador en el núcleo celular tras la irradiación denota la muerte celular por la necrosis que sigue a la destrucción de la membrana celular por el  $^1\text{O}_2$  [30].



Aunque estos sensibilizadores metal-orgánicos no son capaces de penetrar la membrana de células viables, [29] poseen una elevada afinidad por las mismas (como se comprobó con liposomas). Así, cuando se incuban hepatocitos y células sinusoidales hepáticas con el complejo  $\text{Ru}[(\text{bpy})_2(\text{ddz})]^{2+}$  a valores de concentración inferiores a  $50 \mu\text{M}$  y se someten a iluminación visible (442 nm) empleando un láser de He-Cd (34,2 mW), se producen lesiones en la membrana plasmática inducidas por el  $^1\text{O}_2$  que conducen a la muerte celular (figura 1) [30]. En cambio, cuando se incuban macrófagos con  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  o  $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ , es necesaria una concentración de fotosensibilizador de 2 mM y una prolongada iluminación con un láser de 475 nm para detectar daños en la membrana [31].

Se están realizando grandes esfuerzos en la comunidad investigadora para elucidar el papel del  $^1\text{O}_2$  en la muerte celular. Muy recientemente Ogilby y col. han podido detectar por vez primera la débil emisión infrarroja a 1280 nm característica del  $^1\text{O}_2$  en el *interior* de neuronas, mediante la aplicación de técnicas de imagen directa. Las neuronas habían sido incubadas previamente con el fotosensibilizador 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)-21H,23H-porfina (TMPyP) [32].

El mecanismo de la fotosensibilización bioquímica y el daño celular están profundamente influidos por el entorno en el que se encuentre el fotosensibilizador. Esto cobra importancia cuando se considera la naturaleza reductora del interior celular. El ambiente puede producir procesos de transferencia de carga en vez de procesos de transferencia de energía. Un ejemplo de la dependencia del microambiente en el mecanismo es el caso del fotosensibilizador cercosporina, el cual produce abundante  $^1\text{O}_2$  extracelularmente. Sin embargo, la presencia de agentes reductores celulares, disminuye considerablemente la producción de oxígeno singlete, mientras simultáneamente se incrementa la reducción de  $\text{O}_2$  [33].

La muerte celular por  $^1\text{O}_2$  puede ocurrir por apoptosis o por necrosis, dependiendo del fotosensibilizador utilizado, la dosis del mismo, el modo de interacción con el microorganismo y el genotipo celular. Algunos de los fotosensibilizadores usados en terapias fotodinámicas (*vide infra*) se acumulan en la mitocondria y esto puede explicar su eficiencia para inducir muerte celular por apoptosis, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha observado que las células sometidas a la acción de fotosensibilizadores pueden experimentar activación de fosfolipasas, alteraciones en el metabolismo de la ceramida, aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol, estimulación de la actividad enzimática de la óxido nítrico- sintasa (NOS), alteraciones en la fosforilación de proteínas y en la actividad de factores de transcripción, así como en la regulación de expresión génica [34].

### 3. Terapia fotodinámicas (PDT)

La terapia fotodinámica (PDT) está emergiendo como una prometedora técnica para el tratamiento de ciertos cánceres, infecciones localizadas y enfermedades como la degeneración macular, el acné y otras alteraciones de la piel [35]. Requiere la presencia simultánea de tres componentes: un agente fotosensibilizador, luz y oxígeno, debido a que el oxígeno singlete es el principal agente citotóxico producido durante PDT (aunque no el único) [36]. El tema es suficientemente extenso para no poder tratarse con detalle en este capítulo.

Las etapas claves involucradas en cualquier PDT son (i) la administración del fármaco (generalmente por vía intravenosa o tópica), (ii) el transcurso de un tiempo de espera para la retención (preferencial) del fármaco por el tejido tumoral; (iii) la irradiación, por lo general con láser, del tumor o afección cutánea; (iv) la destrucción de las células cancerosas por generación de  $^1\text{O}_2$  y (v) un periodo de ausencia de exposición del individuo tratado a la luz solar hasta eliminación del fármaco fotoactivo del organismo.

La importancia de la oxigenación de tejidos en PDT ha sido observada por muchos investigadores [37,38]. Henderson y col. demostraron que el consumo de oxígeno depende del flujo fotónico incidente, de forma que la destrucción celular se ve aumentada por el uso de bajos flujos [39]. Además debido a que éstos no agotan la reserva de oxígeno en los tejidos, permiten exponer mayores porciones del tumor a oxígeno singlete durante mayor periodo de tiempo. El daño en tejidos sanos también se reduce, posiblemente porque los tejidos sanos pueden reparar estos pequeños daños más eficientemente, evitando una gran respuesta inflamatoria.

Las propiedades de un fotosensibilizador ideal para PDT son baja toxicidad, alto rendimiento cuántico de producción de  $^1\text{O}_2$ , capacidad de absorber luz de longitudes de onda de más de 600 nm (máxima penetración en los tejidos) y dotado de propiedades farmacocinéticas tales como una alta selectividad por tejido diana, solubilidad en agua y una eliminación en un tiempo razonable del organismo y rápidamente de la piel para evitar reacciones de fotosensibilidad.

Actualmente los fotosensibilizadores más usados en PDT *in vivo* son porfirinas, clorinas y bacterioclorinas. Sin embargo también se están utilizando otras clases de porfirinoides, como las ftalocianinas, purpurinas y texapirinas, así como el azul de metileno. Todos estos compuestos son eficaces generadores de  $^1\text{O}_2$  [18,40]. El ácido  $\gamma$ -aminolevulínico es un precursor de fotosensibilizadores endógenos (hematoporfirinas), que se aplica de forma tópica esperando después el tiempo suficiente para que las células lo metabolicen antes de proceder a la iluminación de la zona afectada.

El fotosensibilizador más estudiado y usado hasta la fecha, y uno de los pocos aprobados por las autoridades es, sin duda, el Photofrin® (QLT PhotoTherapeutics, Vancouver, Canadá). Está aceptado por la FDA norteamericana y en muchos otros países para el tratamiento de cánceres de pulmón, esófago, vesícula, gástricos y uterinos. En realidad, no es un compuesto puro sino que se trata de una mezcla compleja de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros de hasta 8 ó 9 unidades de porfirina unidas. Su máximo de absorción está a 630 nm, con lo que puede activarse en el tejido hasta una profundidad de 5 mm. Además no parece tener límite acumulativo, al contrario de lo que sucede con quimioterapia y radioterapia. A las dosis usadas no es cancerígeno ni mutagénico [41]. Se acumula en la piel, por lo que quemaduras solares o fotorreacciones pueden ser las posibles complicaciones. Estos efectos secundarios pueden minimizarse evitando la exposición a la luz solar o luz de alta intensidad durante al menos 6 semanas después del tratamiento.

Continuamente se están preparando e investigando nuevos fotosensibilizadores con el fin de obtener una mejor actividad fotodinámica. Se estudian nuevos cromóforos que absorban a mayores longitudes de onda buscando una mejor penetración de la luz en los tejidos.

Estudios *in vitro* han demostrado que los fotosensibilizadores *catiónicos* se localizan selectivamente en las mitocondrias, las cuales se ha observado que son dianas de la terapia fotodinámica (muerte celular por apoptosis). Otros no son capaces de penetrar la membrana plasmática, produciendo la muerte celular por necrosis. El mecanismo concreto de la acción fotodinámica también depende de la dosis fotónica y del genotipo celular [34]. En general, la mayoría de los fotosensibilizadores catiónicos se eliminan rápidamente de los tejidos. La mayoría de los compuestos *aniónicos* parecen ser fotosensibilizadores poco eficientes. Normalmente su actividad fotodinámica disminuye al incrementar el número de cargas negativas del cromóforo.

#### 4. Desinfección de aguas

La disponibilidad de agua potable es un serio problema en muchos lugares del mundo. Una posibilidad para adaptarse a los bajos recursos de agua es la purificación de aguas fecales para su reutilización. Además, los tratamientos de desinfección de aguas deben incluirse en los sistemas de distribución de agua potable a partir de fuentes naturales de agua.

La desinfección es una etapa del proceso del tratamiento de aguas consistente en tratamientos químicos, cuyo objetivo es la inactivación de microorganismos patógenos para minimizar el riesgo de enfermedades. En los primeros 75 años del siglo XX, la clarificación química, la filtración y la cloración han sido los únicos procesos utilizados para el tratamiento de aguas municipales. Sin embargo, en los últimos 30 años, se ha observado un cambio drástico en la aproximación de la industria al tratamiento del agua y se han comenzado a considerar seriamente otras tecnologías alternativas para la desinfección de las aguas [42]. A pesar del creciente desarrollo y aplicación de la tecnología de *filtración* con membranas (micro-, ultra, y nano- filtración y ósmosis inversa, ver Capítulo 4), el principal obstáculo para la implementación a gran escala de esta tecnología es su alto coste. Por otro lado, aunque la *cloración* es efectiva para la inactivación de bacterias y virus, la formación durante la desinfección de productos potencialmente tóxicos y cancerígenos (DBPs, *disinfection by-products*) es un aspecto preocupante. Además, la fabricación de cloro y sus derivados, así como su almacenaje, transporte y uso plantea una amenaza continua para los productores, los operarios y para el medio ambiente. De la misma manera el *ozono* ( $O_3$ ), uno de los oxidantes más poderosos que se conocen dentro de los desinfectantes químicos, escapa del agua durante las operaciones de tratamiento, amenazando la salud de los operarios y del medio ambiente a concentraciones tan bajas como  $0,3 \text{ g m}^{-3}$ . Además, el ozono no puede almacenarse, su producción requiere elevada energía y puede oxidar iones bromuro del agua a ion bromato, que es tóxico. Estos temas fueron tratados en más detalle en el Capítulo 4.

Se están investigando nuevas técnicas de desinfección de aguas con el fin de sustituir dichos procesos químicos por otros más ecológicos. Por ejemplo la irradiación con *luz ultravioleta* (UV-C, 250-270 nm) es una tecnología rentable para el tratamiento de aguas pre-purificadas. Las desventajas principales de este método son su carencia de poder oxidante (y de ahí, su incapacidad para el control simultáneo de color, gusto y olor, como hacen el cloro y el ozono), la cantidad limitada de datos disponibles sobre las dosis requeridas para la destrucción de ciertos microorganismos

y la imposibilidad de funcionamiento con la luz natural. Para superar estas limitaciones, se están desarrollando actualmente procedimientos basados en *fotocatálisis* con dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ), semiconductor capaz de absorber luz ultravioleta hasta 400 nm que produce el potente radical oxidante  $\text{OH}^\bullet$  (ver Capítulos 9 y 10).

La combinación de luz solar y un fotocatalizador y/o un fotosensibilizador puede ser una opción prometedora para áreas con infraestructura insuficiente pero con bastantes horas de radiación solar anual. La purificación y desinfección de aguas con  $\text{TiO}_2$  se tratan ampliamente en otros capítulos de este libro, por lo que no serán objeto de esta sección.

En los procesos de purificación de aguas, colorantes como el rosa bengala, el azul de metileno o las ftalocianinas son capaces de generar oxígeno molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) por transferencia de energía con excelentes rendimientos cuánticos (ver Capítulo 14) [43]. Más recientemente se ha descrito que los complejos de coordinación de rutenio(II) con ligandos poliazaheterocíclicos quelatantes son capaces de generar oxígeno singlete mediante reacciones fotoquímicas de sensibilización con alta eficiencia [44, 45]. Como se discute en el Capítulo 14, en comparación con los fotosensibilizadores puramente orgánicos, los complejos de Ru(II) presentan una considerable foto y termoestabilidad, así como la posibilidad de *sintonizar* sus propiedades espectroscópicas y fotofísicas mediante la selección de los ligandos heterocíclicos adecuados.

Las porfirinas también representan una clase de fotosensibilizadores potencialmente útiles en este campo. En un estudio comparativo de la capacidad de inactivación de coliformes fecales por diferentes fotosensibilizadores en fase homogénea, se observó que la (4-*N*-metil-piridil)porfirina era más eficaz que el azul de metileno y rosa bengala, tanto a altas como a bajas concentraciones. Además, fue el sensibilizador más fotoestable tras someter una disolución a 240 minutos de iluminación solar [25].

La mayoría de los procesos de desinfección de agua descritos en la bibliografía utilizan fotosensibilizadores de oxígeno singlete *disueltos* en el medio acuoso (es decir, en fase homogénea). En experimentos con Rosa Bengala, la bacteria Gram-positiva *Deinococcus radiodurans* resultó ser 100 veces más sensible al tratamiento fotodinámico que la *Escherichia coli* (Gram-negativa) [46, 47]. Este resultado es opuesto al que se obtiene por inactivación bacteriana mediante radiación ionizante, lo que ha llevado a descartar un mecanismo de acción fotodinámica directa del  $^1\text{O}_2$  sobre el DNA ya que la *D. radiodurans* posee un eficaz sistema de reparación del mismo. La inactivación fue más eficiente al incrementar la temperatura y al variar el pH (4,5 o 9,6 en comparación con la supervivencia a pH 7,0), aunque la producción de oxígeno singlete es la misma bajo las distintas condiciones experimentales. La envoltura celular parece ser la diana del  $^1\text{O}_2$  cuando se utiliza dicho fotosensibilizador. Junto al rosa bengala, otros compuestos orgánicos (eritrosina, amarillo de eosina, naranja de acridina y tetrasulfonato de ftalocianina) resultan efectivos contra *E. coli* a través de una acción fotodinámica [48].

La desinfección de aguas usando azul de metileno ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 665 \text{ nm}$ ) disuelto, se ha desarrollado con éxito a escala de laboratorio y en una planta piloto experimental [49, 50]. Tras 35 min de irradiación solar ( $0,84 \text{ kW m}^{-2}$ ) de efluentes suplementados

con *E. coli* se midió una disminución de la población microbiana de 4 a 5 órdenes de magnitud [51, 52]. Asimismo, muestras de agua contaminadas con poliovirus bacteriófagos resistentes a la cloración se han esterilizado por iluminación en presencia de azul de metileno [53]. El tiempo de desinfección se redujo drásticamente a 3 s cuando se suministró luz solar concentrada por un campo de espejos cóncavos controlados por ordenador ( $150 \text{ kW m}^{-2}$ ). Instalaciones piloto (Tel-Aviv, Israel) fueron capaces de purificar 50 y  $0,15 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  de agua (usando radiación solar directa o concentrada, respectivamente). Cuando el uso de los efluentes desinfectados requiere eliminar el colorante, los autores proponen un filtro de arena, pero nada indican de la fotoestabilidad del sensibilizador en dichas condiciones.

El uso de un fotosensibilizador *inmovilizado* (desinfección en fase heterogénea) evitaría la necesidad de recuperar o eliminar el colorante disuelto del agua tratada. Algunos investigadores han propuesto diversos soportes sólidos, procesos de inmovilización y fotosensibilizadores, la mayoría con aplicaciones sintéticas en disolventes no acuosos pero no diseñados específicamente para la desinfección. Las investigaciones pioneras en inactivación fotodinámica de *E. coli* en fase heterogénea se basaron en rosa bengala unido covalentemente a microesferas de poliestireno poroso [6]. Ese mismo colorante fotosensibiliza de manera eficiente la producción de  $^1\text{O}_2$  cuando se usa como soporte sólido partículas de gel de sílice depositadas sobre una placa de vidrio [54]. El rendimiento fue de  $5 \times 10^{12}$  moléculas de  $^1\text{O}_2$  generado (y disuelto en agua) por segundo por  $\text{cm}^2$  de superficie de placa, calculado a partir de la reacción de decoloración de la *N,N*-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) por el  $^1\text{O}_2$ /imidazol para monitorizar su producción [55].

El fotosensibilizador soportado (*N*-isopropilacrilamida)-co-(cloruro de vinilbencil rosa bengala) muestra un rendimiento cuántico de formación de  $^1\text{O}_2$  en metanol próximo al del Rosa Bengala libre [56]. Sin embargo, usando una disolución acuosa del polímero, la eficiencia de formación de  $^1\text{O}_2$  es mucho menor. Aunque el polímero se disuelve fácilmente en agua a temperatura ambiente, precipita por un incremento de temperatura de la disolución a partir de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Este proceso facilita la eliminación del polímero de la mezcla de reacción.

También se ha generado  $^1\text{O}_2$  en medio heterogéneo por incorporación de porfirinas en poli(dimetilsiloxano) [57]. Este material fue elegido por su transparencia, hidrofobicidad y gran permeabilidad al oxígeno molecular.

La inactivación de *E. coli* también se logra utilizando diversos sensibilizadores no polares insolubles en agua, de la familia de las porfirinas y metaloporfirinas, adsorbidos sobre gel de sílice. Así, se ha descrito una correlación entre la producción de  $^1\text{O}_2$  y la actividad antibacteriana de las sustancias adsorbidas expuestas a la luz [58]. A escala de laboratorio también se consigue desinfección (*D. radiodurans* como organismo modelo) con sensibilizadores en fase heterogénea preparados a partir de porfirinas dotadas de grupos pirimidinio unidos a poli(metacrilato de metilo) [59, 60]. Este polímero también se ha empleado para la preparación de películas (0,1 mm) con  $\alpha$ -tertienilo, un sensibilizador del UV-A que se encuentra en las raíces de caléndula [61]. También se ha demostrado que la inactivación de *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) y *Sarcina lutea* (Gram-positiva) por un sensibilizador inmovilizado, crece linealmente con la concentración de oxígeno singlete [62].



Se ha propuesto incluso un prototipo de reactor para experimentos en el exterior basados en un fotosensibilizador inmovilizado (rosa bengala), con objeto de evaluar la viabilidad de la tecnología solar para el tratamiento de aguas evitando la necesidad de recuperar el fotosensibilizador disuelto en el agua tratada [63].

Uno de los problemas que surgen al usar fotosensibilizadores soportados es la dificultad de medir el *rendimiento cuántico* de producción de  $^1\text{O}_2$  del material por las técnicas habituales de monitorización directa de dicha especie a través de su luminiscencia a 1.270 nm. Un nuevo material de referencia para este propósito ha sido desarrollado por Orellana y col. [64]. No obstante, siempre existen los métodos de cuantificación por captura del  $^1\text{O}_2$  o decoloración de indicadores, [55] cuyo principal inconveniente es la naturaleza de la interacción del atrapador con el material sensibilizador y la dificultad de encontrar sistemas que funcionen en medio acuoso.

El objetivo principal del trabajo del Laboratorio de Fotoquímica Aplicada de la UCM, en el marco de los proyectos *SOLWATER* y *AQUACAT*, financiados por la Unión Europea, es el desarrollo de un sistema de desinfección de agua basado en la producción de oxígeno singlete por fotosensibilización bajo irradiación con luz visible, mediante la optimización de una pareja soporte-fotosensibilizador capaz de trabajar eficientemente y con suficiente resistencia en un colector solar. Se espera poder purificar un volumen de agua suficiente (50–100 L) para uso doméstico diario en pequeñas comunidades rurales aisladas de países en desarrollo.

Como se discute en el Capítulo 14, un soporte polimérico adecuado para desinfección por  $^1\text{O}_2$  debe reunir las siguientes condiciones: i) compatibilidad con el sensibilizador para permitir una fuerte inmovilización por interacciones iónicas, polares y/o lipofílicas, o por interacción covalente; ii) una geometría y características reológicas adecuadas; iii) resistencia mecánica y fotoestabilidad; iv) alta permeabilidad al oxígeno molecular, para favorecer la colisión con el sensibilizador fotoexcitado; (v) carencia de grupos funcionales que favorezcan la desactivación del oxígeno singlete; (vi) estructura porosa y biocompatibilidad para aumentar la proximidad entre el microorganismo y el fotosensibilizador y (vii) bajo coste.

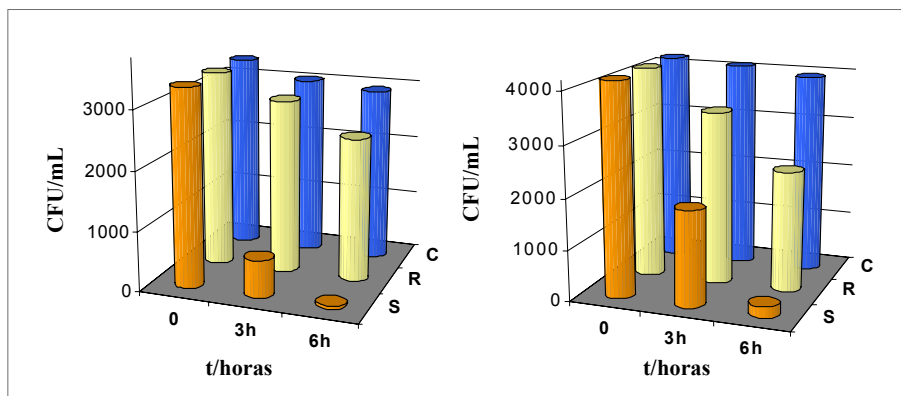
Teniendo en cuenta estos requerimientos y tras diferentes estudios Orellana y col. han diseñado y preparado un sistema de fotosensibilización consistente en un complejo de rutenio con ligandos quelatantes poliazaheterocíclicos (ver Capítulo 14) inmovilizado en un polidimetilsiloxano poroso (abreviadamente pSil) [65]. El complejo seleccionado es el tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) ( $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ ), [45] sensibilizador de  $^1\text{O}_2$  de elevado rendimiento cuántico, altamente hidrofóbico y adecuado para la inmovilización en un soporte polimérico lipofílico. El procedimiento de unión consigue una carga de  $2 \text{ g m}^{-2}$ , habiendo determinado una constante de desactivación del fotosensibilizador excitado (soportado) por el  $\text{O}_2$  de  $2,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y un tiempo de vida del oxígeno singlete generado en este material igual a  $32 \mu\text{s}$  [66].

Estudios preliminares del  $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$  en fase homogénea, usando suspensiones bacterianas de *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* como modelos, han proporcionado resultados muy satisfactorios. Se observó una disminución de 5 órdenes de magnitud en la viabilidad de una suspensión de *E. faecalis* utilizando una concentración 5 nM de fotosensibilizador y tras 4 h de irradiación visible con un simulador solar (lámpara de Xe de 150 W). En el caso de una suspensión de *E. coli*

se requirió una concentración de fotosensibilizador 50 nM y 6 h de irradiación para observar una disminución equivalente de la viabilidad bacteriana [67].

Para estudiar a escala de laboratorio la validez de esta tecnología, usando la combinación de fotosensibilizador/soporte descrita anteriormente, se diseñó un dispositivo experimental con el simulador solar [68]. Este sistema consiste en un microrreactor de vidrio por el que circula la suspensión bacteriana, y en cuyo interior se coloca una tira del soporte teñido con fotosensibilizador. Se observó así una desinfección notable con el sistema  $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}/\text{pSi}$ , con tasas de inactivación bacteriana superiores a  $1,1 \times 10^5$  UFC  $\text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$  para *E. coli* y  $0,7 \times 10^5$  UFC  $\text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$  para *E. faecalis*. La figura 2 muestra un típico ensayo de desinfección de agua realizado con el sistema experimental de laboratorio, sobre muestras de agua contaminada con las bacterias modelo. Menos de un 1% de la población bacteriana inicial sobrevive al tratamiento fotocatalítico a una dosis de  $0,6 \text{ MJ m}^{-2}$  de radiación acumulada, mientras que la inactivación fue inapreciable en los experimentos control. La imprescindible interacción de los microorganismos con el material fotosensibilizador, para que se produzca la acción fotodinámica en agua, queda demostrada por la disminución del recuento de colonias cuando la suspensión bacteriana se hace circular a través de un microrreactor que contiene el soporte poroso sin teñir. No se ha detectado en ningún caso lavado del complejo fotosensibilizador durante los experimentos que pudiera falsear los resultados en medio heterogéneo.

**Figura 2.** Típicos ensayos de inactivación de *E. faecalis* (izquierda) y *E. coli* (derecha) en un simulador solar de laboratorio usando el colorante  $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$  inmovilizado en silicona porosa (S), en ausencia de fotosensibilizador soportado (R, referencia) y en ausencia de fotosensibilizador soportado y en la oscuridad (C, control).

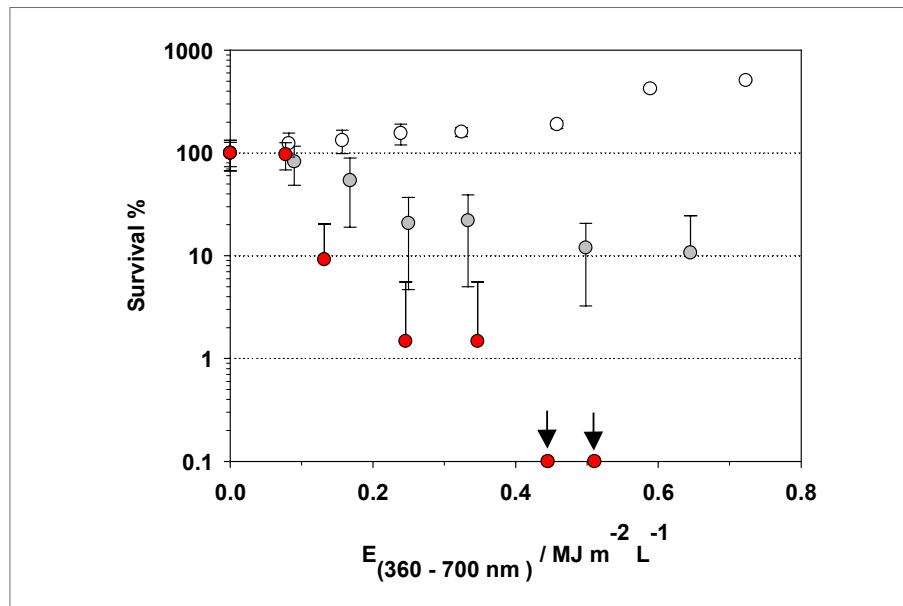


Basándonos en los resultados de los ensayos de desinfección realizados en el laboratorio, se ha realizado el escalado a un fotorreactor solar piloto y actualmente se está estudiando su viabilidad para la desinfección diaria de 10-20 litros de agua. Los experimentos se llevan a cabo con dos tipos de reactores solares CPC (colector parabólico compuesto) de  $1 \text{ m}^2$  de superficie, desarrollados y fabricados por la empresa portuguesa AoSol (Portugal) (figura 3). Como se discute en los Capítulos 7 y 8, el CPC es una tecnología óptica eficiente para la recogida de radiación solar (directa y difusa) y su focalización hacia una tubería transparente por la que circula el agua a tratar. Este tipo de reactores se ha ensayado con éxito para la desinfección de aguas usando suspensiones de  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador [69].

**Figura 3.** Reactor solar del Laboratorio de Fotoquímica Aplicada de la UCM para desinfección diaria de agua mediante generación de oxígeno singlete por un fotosensibilizador inmovilizado en una tira de silicona porosa. El colector solar, de 1 m<sup>2</sup> de superficie, ha sido desarrollado y fabricado por AoSol (Portugal). El material fotosensibilizador está colocado sobre un soporte coaxial a cada tubo de vidrio.



**Figura 4.** Ensayo típico de desinfección solar diaria de agua contaminada con *E. coli* ( $c_0 = 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup>) en un fotorreactor CPC provisto de material [Ru(dip)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>/pSil (gris oscuro). Se muestra también los ensayos análogos realizados en ausencia de fotosensibilizador y soporte (blanco) y en presencia de soporte exclusivamente (gris claro). Las flechas indican desinfección del agua (supervivencia igual a  $0,00 \pm 0,15\%$ ).



La figura 4 muestra los resultados de desinfección de 10 L de agua contaminada con *E. coli* obtenidos con el reactor solar de la figura 3. Se puede observar que, en presencia del fotosensibilizador inmovilizado sobre el soporte de silicona porosa, la desinfección se alcanza a valores de radiación solar acumulada de, aproximadamente,  $0,5 \text{ MJ m}^{-2} \text{ L}^{-1}$  de (4 h de irradiación solar en Madrid,  $40^\circ\text{N}$ , en un día despejado). Sin embargo, en ausencia del material fotosensibilizador, la concentración bacteriana permanece estable o aumenta ligeramente (temperatura del agua  $27\text{--}40^\circ\text{C}$ ). La disminución de la población de *E. Coli* en suspensión, en presencia únicamente del soporte poroso, señala la retención de las bacterias por el mismo, imprescindible para una eficaz desinfección por el efímero  $^1\text{O}_2$  fotogenerado.

Se han realizado otras investigaciones relacionadas con los procesos de desinfección mediados por  $^1\text{O}_2$  generado por fotosensibilizadores inmovilizados, si bien no aplicados directamente a la purificación de aguas. Por ejemplo, se han propuesto superficies bactericidas preparadas por incorporación del colorante adecuado en un polímero termoplástico translúcido, para uso doméstico, médico o industrial en los que sea deseable controlar la población microbiana [70,71]. Así, películas de celulosa impregnadas con porfirinas o ftalocianinas (en particular el tetra-*p*-tosilato de 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metilpiridinio)porfirina) demostraron actividad fotobactericida frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*. La película mantuvo sus propiedades mecánicas y bactericidas tras 50 h de irradiación con una lámpara de arco de Xe. Se prepararon películas similares con actividad biocida a partir de poli(dimetilsiloxano) y tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II) como colorante fotoactivo [72]. Otros sistemas heterogéneos de generación de  $^1\text{O}_2$ , optimizados para desinfección de sangre, consisten en porfirinas unidas a una sustancia microporosa. El tamaño de poro ( $0,1\text{--}1,0 \mu\text{M}$  para virus o  $1\text{--}3 \mu\text{M}$  para desactivación bacteriana) se selecciona para permitir la entrada de partículas patógenas pero no de las células sanguíneas.

### Conclusiones

La generación de oxígeno molecular singlete, a partir del oxígeno disuelto en el agua o presente en la atmósfera, colorantes fotosensibilizadores inmovilizados y luz solar es un poderoso método para inactivar muy variados tipos de microorganismos. Aunque la producción de oxígeno singlete en medio homogéneo está resuelta hoy en día de manera eficaz, la utilización práctica del procedimiento exige el desarrollo de sensibilizadores con alta fotoestabilidad, además de soportes que favorezcan la producción de dicha especie reactiva del oxígeno y la interacción con los microorganismos. Los efectos post-tratamiento y el eventual recrecimiento de los mismos tras su inactivación aún están en gran medida, por determinar.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer la financiación de la investigación del LFA-UCM al Ministerio español de Educación y Ciencia (proyecto PPQ2000-0778-C02), a la Comunidad de Madrid (ref. 07M/0082/2000) y a la empresa Carburos Metálicos, S.A. (Madrid), así como a la Unión Europea (contratos ICA4-CT-2002-10001, *SOLWATER* y ICA3-CT-2002-10028, *AQUACAT*).

## Referencias

- [1] J. Wist, J. Sanabria, C. Dierolf, W. Torres y C. Pulgarin, Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **147**, 241-246, (2002).
- [2] M.R. Hoffmann, S.T. Martin, W.Y. Choi y D.W. Bahnemann, Environmental applications of semiconductor photocatalysis, *Chem. Rev.*, **95**, 69-96, (1995).
- [3] J.R. Guimaraes, J. Ibáñez, M.I. Litter y R. Pizarro, Desinfección de agua, en *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*, Segunda edición, editores B. Sánchez Cabrero y M.A. Blesa, Editorial CIEMAT, Madrid. ISBN 84-7834-489-6, Capítulo 15, 375-388 (2004).
- [4] A.J. Acher, E. Fischer, R. Zellinger y Y. Manor, Photochemical disinfection of effluents—pilot plant studies, *Water Res.*, **24**, 837-843, (1990).
- [5] T.A. Dahl, W.R. Midden y P.E. Hartman, Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria, *Photochem. Photobiol.*, **46**, 345-352, (1987).
- [6] S.A. Bezman, P.A. Burtis, T.P.J. Izod y M.A. Thayer, Photodynamic inactivation of *E. coli* by Rose Bengal immobilized on polystyrene beads, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 325-329, (1978).
- [7] M.R. Hamblin y B. Ortel, Future directions in PDT. Photosensitizer targeting y new disease indications, in *Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology* (editado por P.G. Calzavara-Pinton, R.M. Szeimies y B. Ortel), Elsevier, Amsterdam, 339-366, (2001).
- [8] L.L. Tranny, J.W.M. Lagerberg, T.M.A.R. Dubbelman, H.J. Schuitmaker y A. Brand, Positively charged porphyrins: a new series of photosensitizers for sterilization of RBCs, *Transfusion*, **44**, 1186-1196, (2004).
- [9] M. Wilson, Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries y periodontal diseases, *J. Appl. Bacteriol.*, **78**, 299-306, (1993).
- [10] M. Soncin, C. Fabris, A. Buseti, D. Dei, D. Nistri, G. Roncucci y G. Jori, Approaches to selectivity in the Zn-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, 815-819 y referencias ahí citadas, (2002).
- [11] E. San Román, Immobilized phthalocyanines as red-light photosensitizers, *J. Photochem. Photobiol. A*, **102**, 109-112, (1996).
- [12] T.A. Dahl, Examining the role of singlet oxygen in photosensitized cytotoxicity, en *Aquatic and Surface Photochemistry*, editado por G.R. Melz, R.G. Zepp y D.G. Crosby, CRC Press, Boca Raton, Florida, 241-258, (1994).
- [13] I. Kruk, Environmental toxicology and chemistry of oxygen species, en *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2, Part 1, editado por O. Hutzinger, 89-138, Springer, Berlin-Heidelberg, (1998).
- [14] T.A. Dahl, Direct exposure of mammalian cells to pure exogenous singlet oxygen ( $^1D_g O_2$ ), *Photochem. Photobiol.*, **57**, 248-254, (1993).
- [15] T. Nagano, T. Tanaka, H. Mizuki y M. Hirobe, Toxicity of singlet oxygen generated thermolytically in *Escherichia coli*, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 883-887, (1994).
- [16] E. Ben-Hur, N.E. Geacintov, B. Studamire, M.E. Kenney y B. Horowitz, The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.*, **61**, 190-195, (1995).
- [17] M. Shimizu-Takahama, T. Egashira y U. Takahama, Inhibition of respiration and loss of membrane integrity by singlet oxygen generated by a photosensitized reaction in *Neurospora crassa* conidia, *Photochem. Photobiol.*, **33**, 689-694, (1981).
- [18] I.J. MacDonald y T.J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **5**, 105-129, (2001).
- [19] E. Cadenas y H. Sies, Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems, *Meth. Enzymol.*, **105**, 221-231, (1984).
- [20] D.P. Valenzeno, Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanism, *Photochem. Photobiol.*, **46**, 147-160, (1987).
- [21] H. Sies y C.F.M. Menck, Singlet oxygen induced DNA damage, *Mutation Res.*, **275**, 367-375, (1992).
- [22] A. Hergueta-Bravo, M.E. Jiménez-Hernández, E. Oliveros, F. Montero y G. Orellana, Singlet oxygen-mediated DNA photocleavage with Ru(II) polypyridyl complexes, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 4010-4017, (2002).
- [23] B. Epe, J. Hegler y D. Wild, Singlet oxygen as an ultimately reactive species in *Salmonella typhimurium* DNA damage induced by methylene blue/visible light, *Carcinogenesis*, **10**, 2019-2024, (1989).
- [24] M.A. Griffiths, B.W. Wren y M. Wilson, Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminum disulfonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent, *J. Antimicrob. Chemother.*, **40**, 873-876, (1997).

- [25] M. Jemli, Z. Alouini, S. Sabbahi y M. Gueddari, Destruction faecal bacteria in wastewater by three photosensitizers, *J. Environ. Monitoring*, **4**, 511-516, (2002).
- [26] D.A. Phoenix, Z. Sayed, S. Hussain, F. Harris y M. Wainwright, The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **39**, 17-22, (2003).
- [27] C.J. Burrows y J.G. Muller, Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chem. Rev.*, **98**, 1109-1151, (1998).
- [28] C. Sheu y C.S. Foote, Reactivity towards singlet oxygen of a 7,8-Dihydro-8-oxoguanosine («8-hydroxyguanosine») formed by photooxidation of a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6439-6442, (1995).
- [29] M. E. Jiménez-Hernández, G. Orellana, F. Montero y M. Teresa Portolés, A ruthenium probe for cell viability measurement using flow cytometry, confocal microscopy and time-resolved luminescence, *Photochem. Photobiol.*, **72**, 28-34, (2002).
- [30] M.E. Jiménez-Hernández, Complejos luminiscentes de Ru(II) con dibenzo-dipiridofenazina: interacción con DNA, determinación de la viabilidad celular y fotosensibilización de oxígeno singlete, Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, (2001).
- [31] J.W. Dobrucki, Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> with animals and plant cells in vitro. Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **65**, 136-144, (2001).
- [32] I. Zebger, J.W. Snyder, L.K. Andersen, L. Poulsen, Z. Gao, J.D.C. Lambert, U. Kristiansen, P.R. Ogilby, Direct optical detection of singlet oxygen from a single cell, *Photochem. Photobiol.*, **79**, 319-322, (2004).
- [33] P.E. Hartman, W.J. Dixon, T.A. Dahl y M.E. Daub, Multiple modes of photodynamic action by cercosporin, *Photochem. Photobiol.*, **47**, 699-703, (1988).
- [34] R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1704**, 59-86 y referencias ahí citadas, (2004).
- [35] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, The history of photodetection and photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 656-669, (2001).
- [36] P.N. Prasad, Introduction to Biophotonics, Wiley, New York, 433-463, (2003).
- [37] H.I. Pass, Photodynamic therapy in oncology, *J. Natl. Cancer. Inst.*, **86**, 443-456, (1993).
- [38] B. W. Henderson, V.H. Fingar, Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic therapy in mouse tumor, *Cancer Res.*, **47**, 3110-3114, (1987).
- [39] T.M. Sitnik, B.W. Henderson, The effect of the fluence rate on tumor and normal tissue response to photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **67**, 462-466, (1998).
- [40] (a) R. Bonnett. Photosensitizer of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **19-33**, (1995). (b) M. Wainwright, Non-porphyrin photosensitizers in Biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, **351-359**, (1996).
- [41] H.H. Evans, M.F. Horng, M. Ricanati, J.T. Deahl y N.L. Oleinick, Mutagenicity of photodynamic therapy as compared to UVC and ionising radiation in human and murine lymphoblast cell lines, *Photochem. Photobiol.*, **66**, 690-696, (1997).
- [42] I. Najm y R.R. Trussel, New y emerging drinking water treatment technologies, in *Identifying future dinking water contaminants*, National Academy Press, 220-246, (1999).
- [43] F. Wilkinson, W.P. Helman y A.B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **22**, 113-262, (1993).
- [44] X. Zhang y M.A.J. Rodgers, Energy and electron transfer reactions of the MLCT state of ruthenium tris(bipyridyl) with molecular oxygen: A laser flash photolysis study, *J. Phys. Chem.*, **99**, 12797-12803, (1995).
- [45] D. García-Fresnadillo, Y. Georgiadou, G. Orellana, A.M. Braun y E. Oliveros, Singlet-oxygen (<sup>1</sup>D<sub>g</sub>) production by ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water, *Helv. Chim. Acta*, **79**, 1222-1238, (1996).
- [46] M. Schafer, C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. Milow, K.-H. Funken y J. Ortner, Systematic study of parameters influencing the action of Rose Bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet-oxygen production, *Photochem. Photobiol.*, **71**, 514-523, (2000).
- [47] M. Schäfer, C. Schmitz y G. Horneck, High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen, *Int. J. Radiat. Biol.*, **74**, 249-253, (1998).
- [48] D.F. Martin y M.J. Perez-Cruet, Preparation of sterile seawater through photodynamic action. Preliminary screening studies, *Florida Scient.*, **50**, 168-176, (1987).

- [49] T.N. Eisenberg, E.J. Middlebrooks y V.D. Adams, Sensitized photooxidation for wastewater disinfection and detoxification, *Water Sci. Tech.*, **19**, 1255-1258, (1987).
- [50] A.T. Cooper y D.Y. Goswami, Evaluation of methylene blue and rose bengal for dye sensitized solar water treatment, *J. Solar Eng.*, **124**, 305-310, (2002).
- [51] A.J. Acher y B.J. Juven, Destruction of coliforms in water and sewage water by dye-sensitized photooxidation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1019-1022, (1977).
- [52] A.J. Acher, E. Fischer, R. Turnheim y Y. Manor, Ecologically friendly wastewater disinfection techniques, *Water Res.*, **31**, 1398-1404, (1997).
- [53] A.J. Acher, Sunlight photooxidation of organic pollutants in wastewater, *Water Sci. Tech.*, **17**, 623-632, (1984).
- [54] C.M. Krishna, Y. Lion y P. Riesz, A study of  $^1\text{O}_2$  production by immobilized sensitizer outside the solution – measurement of  $^1\text{O}_2$  generation, *Photochem. Photobiol.*, **45**, 1-6, (1987).
- [55] I. Kraljic y S. Mohsni, A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 557-581, (1978).
- [56] M. Nowakowska, M. Kepczynski, y M. Dabrowska, Synthesis and photochemical properties of poly[(N-isopropylacrylamide)-co-(vinylbenzyl chloride)] containing covalently bound rose bengal chromophores, *Macromol. Chem. Phys.*, **202**, 1679-1688, (2001).
- [57] F. M. P. R. van Laar, F. Holsteyns, I. F. J. Vankelecom, S. Smeets, W. Dehaen y P.A. Jacobs, Singlet oxygen generation using polydimethylsiloxane occluded dyes, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **144**, 141-151, (2001).
- [58] J. Mosinger, K. Losinska, T. Abrhamova, S. Veiserova, Z. Micka, I. Nemcova y B. Mosinger, Determination of singlet oxygen production and antibacterial effect of nonpolar porphyrins in heterogeneous systems, *Anal. Lett.*, **33**, 1091-1104, (2000).
- [59] D. Faust, K.-H. Funken, G. Horneck, B. Milow, J. Ortner, M. Sattlegger, M. Schäfer y C. Schmitz, Immobilized photosensitizers for solar photochemical applications, *Solar Energy*, **65**, 71-74, (1999).
- [60] K.-H. Funken, D Faust, J. Ortner y C. Sattler, Polymer-bound metalized or metal-free phthalocyanines, their manufacture and use in disinfection and water purification, *Eur. Patent EP984041*.
- [61] Q. Lin, T. Tsuchido y M. Takano, Photodynamic inactivation of bacteria on immobilized a-terthienyl film, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 585-590, (1991).
- [62] W.R. Midden y T.A. Dahl, Biological inactivation by singlet oxygen: distinguishing  $\text{O}_2(^1\text{Dg})$  and  $\text{O}_2(^1\text{Sg}^+)$ , *Biochim. Biophys. Acta*, **1117**, 216-222, (1992).
- [63] B. Braun, J. Ortner, K.H. Funken, M. Schäfer, C. Schmitz y G. Horneck, Dye-sensitized solar detoxification and disinfection of contaminated water, en *Proc. 8<sup>th</sup> Intl. Symp. on Solar Thermal Concentrating Technology*, Köln, 6-11 October 1996, Vol. 3 (editado por M. Becker y M. Böhmer), Müller Verlag, Heidelberg, Alemania, 1391-1401, (1997).
- [64] D.E. Wetzler, D. Garcia-Fresnadillo, G. Orellana, An useful reference system for photosensitized  $^1\text{O}_2$  production measurements in solid media, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (enviado 2005).
- [65] G. Orellana, M.E. Jiménez-Hernández y D. García-Fresnadillo, Material fotocatalítico y método para la desinfección de agua, *Span. Patent P200302136*.
- [66] L. Villén, F. Manjón, D. García-Fresnadillo y G. Orellana, Solar photoreactor for water disinfection by sensitized singlet oxygen production in heterogeneous medium, *Appl. Catal. B* (enviado 2005).
- [67] M.E. Jiménez-Hernández, L. Villén y G. Orellana, Efficient photodynamic inactivation of bacteria by Ru(II) sensitizers, *Appl. Environ. Microbiol.*, (enviado 2005).
- [68] M.E. Jiménez-Hernández, F. Manjón, D. García-Fresnadillo y G. Orellana, Solar water disinfection by singlet oxygen photogenerated with polymer-supported Ru(II) sensitizers, *Solar Energy* (en prensa, 2005).
- [69] O.A. McLoughlin, P. Fernandez Ibañez, W. Gernjak, S. Malato Rodríguez y L.W. Gill, Photocatalytic disinfection of water using low cost compound parabolic collectors, *Solar Energy*, **77**, 625-633, (2004).
- [70] R. Bonnett, R.L. Evans y A.B.B. Galia, Immobilized photosensitizers: photosensitizer films with microbiocidal effects, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **3191** (Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities III), 79-88, (1997).
- [71] R. Bonnett, D.G. Buckley, A.B.B. Galia y B. Saville, Polymer compositions for autosterilizing articles, *PCT Patent WO9300815*.
- [72] R. Danz, B. Elling y A. Buechtemann, Photobiologically active coatings and their use, *Ger. Patent DE19935179*.

