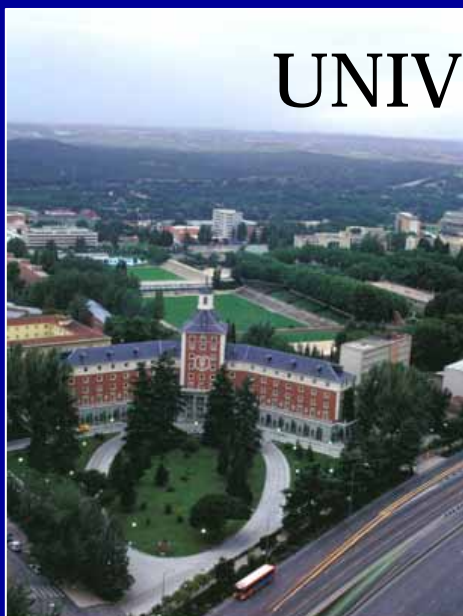




Desinfección mediante fotosensibilizadores: principios básicos

Prof. Dr. Guillermo Orellana

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID





Any distribution, extracting or copying of this presentation or the information it contains is forbidden. If you wish to use it, or you need additional information, please contact me at the address below.

Cualquier distribución, extracción o copia de la misma o de la información contenida, está prohibida. Si usted desea utilizar de alguna forma su contenido, o tiene alguna duda sobre el mismo, por favor póngase en contacto conmigo en la dirección que aparece más abajo.

Dr. Guillermo ORELLANA

Professor of Chemistry at UCM
Department of Organic Chemistry, *Chairman*;
Laboratory of Applied Photochemistry, *Head*;
Faculty of Chemistry,
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
E-28040 Madrid
Spain

Phone: +34-91 394 4220
Fax: +34-91 394 4103
e-mail: orellana@quim.ucm.es
web: <http://www.ucm.es/info/gsolfa/>

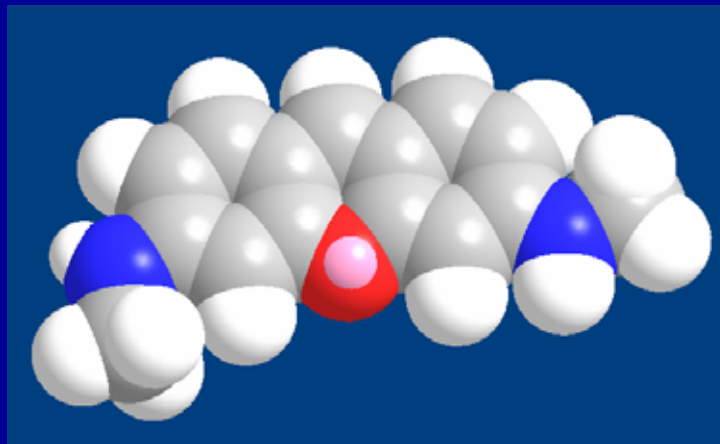




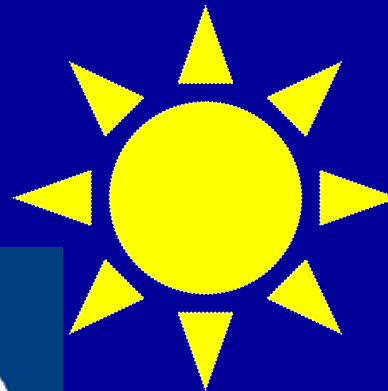
Índice

- Introducción
- Efecto del oxígeno singlete sobre los organismos celulares
- Terapias fotodinámicas (PDT)
- Desinfección de aguas con oxígeno singlete
- Conclusiones

El descubrimiento de Raab y von Tappeiner



Rojo acridina

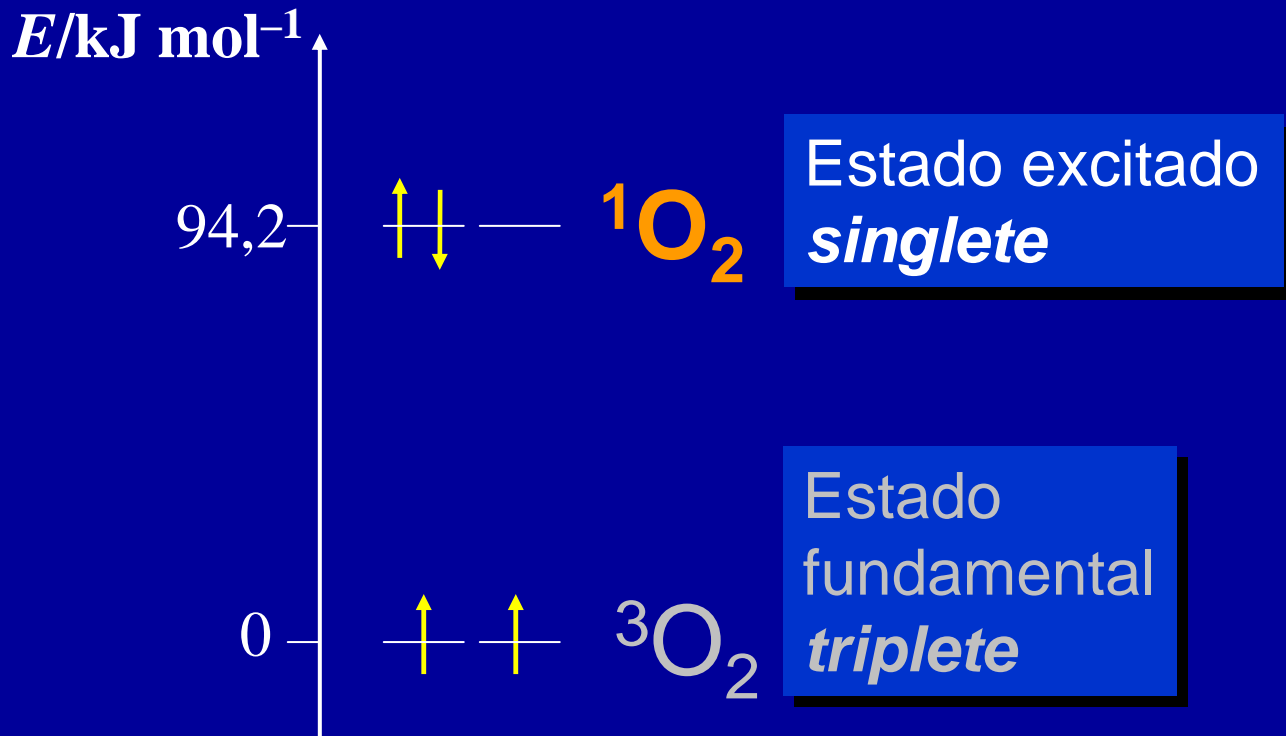


Infusorio

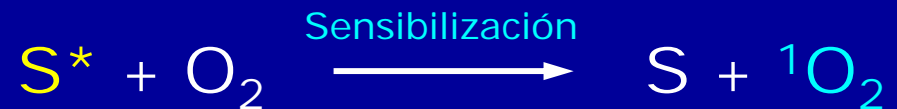
O. Raab, *Z. Biol.* **1900**, 39, 524

H. Von Tappeiner, *Muench. Med. Wochenschr.* **1900**, 47, 5

Oxígeno molecular singlete (1O_2)



τ_{Δ} (agua) = 4 μ s	$k_{r,max} / M^{-1} s^{-1}$
✓ Proteínas	6×10^7
✓ Lípidos	1×10^5
✓ DNA	4×10^4



La molécula de O_2 es muy pequeña
 \Rightarrow difusión rápida

FOTOINACTIVACIÓN MEDIADA POR 1O_2



BACTERIAS

Sarcina lutea
Deinococcus radiodurans
Enterococcus faecalis

Gram +

Escherichia coli
Salmonella typhimurium

Gram -



VIRUS Y BACTERIOFAGOS

HIV, Herpes, Bacteriofago T4, etc.



HONGOS Y LEVADURAS



Saccharomyces cerevisiae



Conidias de
Neurospora crassa



ORGANISMOS ACUATICOS



Ptychodiscus brevis



Paramecium aurelia



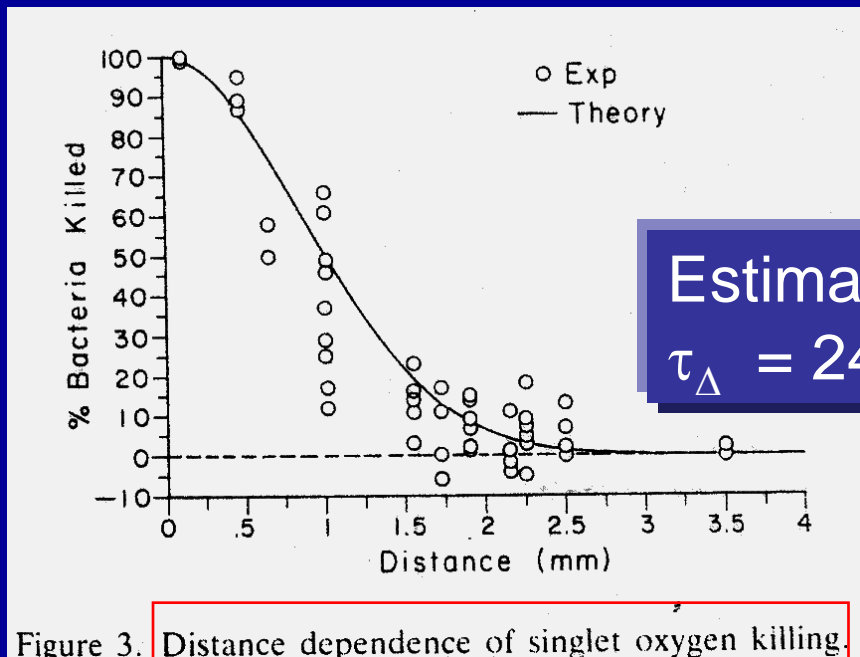
HELMINTOS

Ascaris, Taenia

E.M. Tuite and J.M. Kelly, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, 21, 103.

M. Jemli et al. *J. Environ. Monit.* **2002**, 4, 511.

CITOTOXICIDAD DE 1O_2 : BACTERIAS



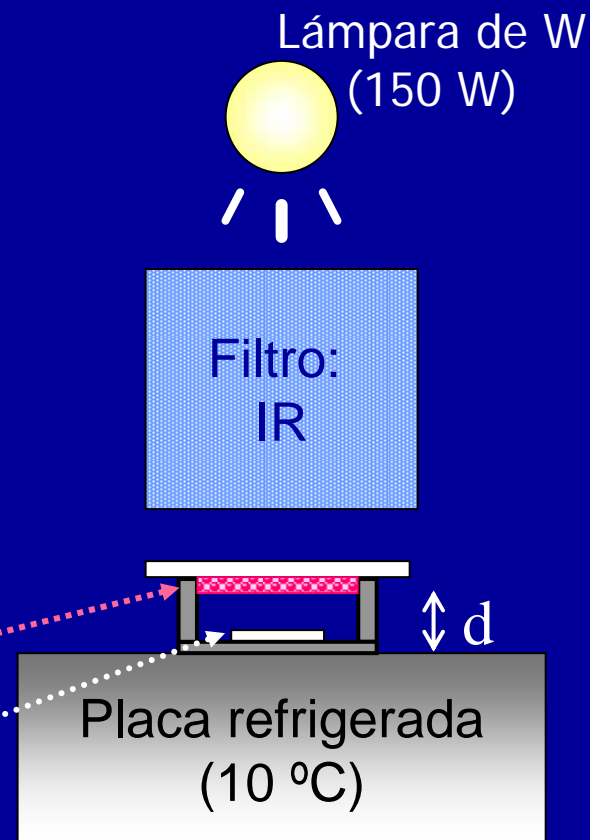
Estimado:
 $\tau_{\Delta} = 24 \pm 6 \text{ ms}$

Figure 3. Distance dependence of singlet oxygen killing.



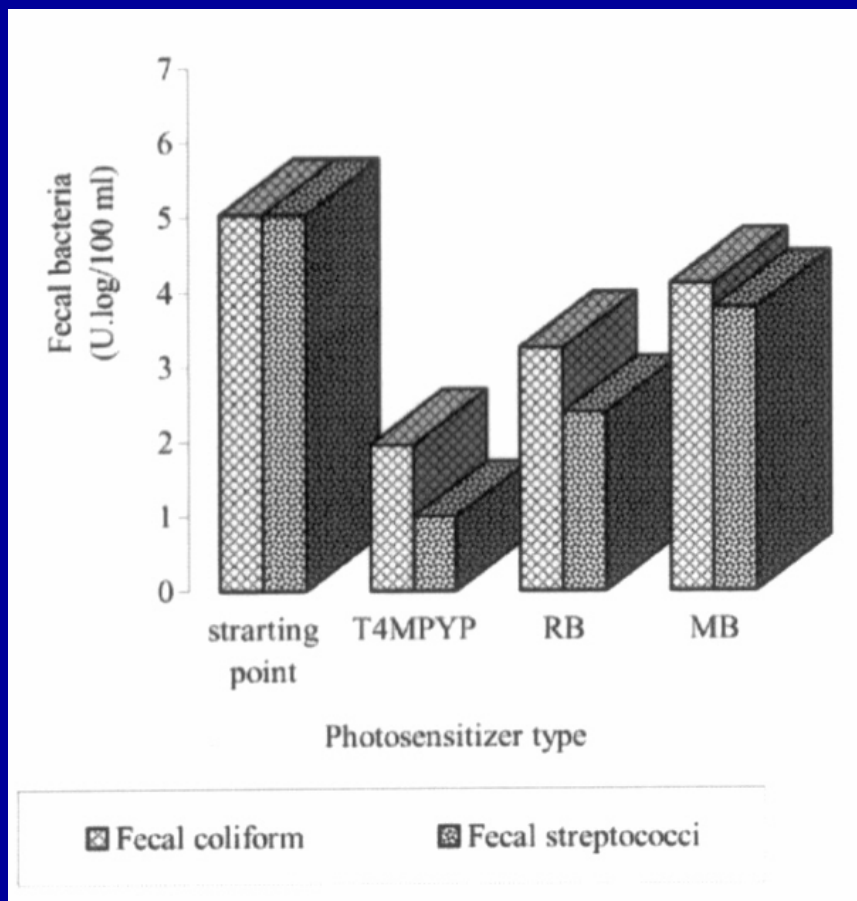
Fotosensibilizador: **Rosa de Bengala**

Bacteria: tipo Gram(-)

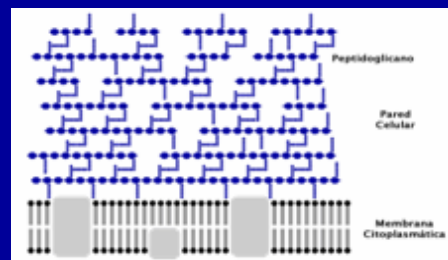


T.A. Dahl, W.R. Midden y P. Hartman, *Photochem. Photobiol.* **1987**, 46, 345.

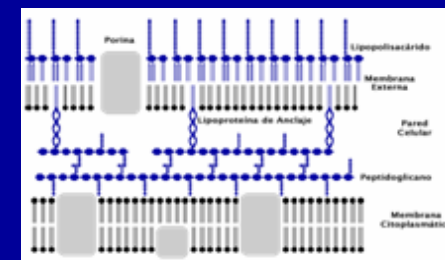
CITOTOXICIDAD DE 1O_2 : BACTERIAS



Bacterias Gram – más resistentes a la fotodegradación que bacterias Gram +



Gram +



Gram –

M. Jemli et al. *J. Environ. Monit.*, 2002, 4, 511.



CITOTOXICIDAD DE 1O_2 : BACTERIAS

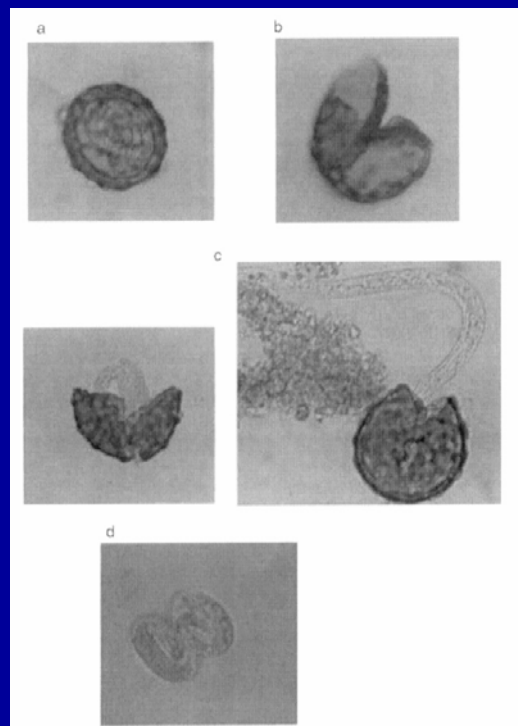
Supervivencia de diferentes cepas*

Species	Relevant phenotype	% survival
<i>Escherichia coli</i>		82 ± 6
	Deficient DNA repair	88 ± 5
	Hypersensitive to various agents	67 ± 7
<i>Salmonella typhimurium</i>		52 ± 6
	Deficient DNA repair	51 ± 4
	Incomplete LPS barrier	24 ± 3
	Superproduction of His	90 ± 6

* Conditions: 10^2 CFU/filter; d = 0,65 mm; t = 10 min

CITOTOXICIDAD DE 1O_2 : HELMINTOS

La porfirina catiónica meso-sustituida ($T_4MP_Y P$) es un eficiente fotosensibilizador de huevos de helmintos



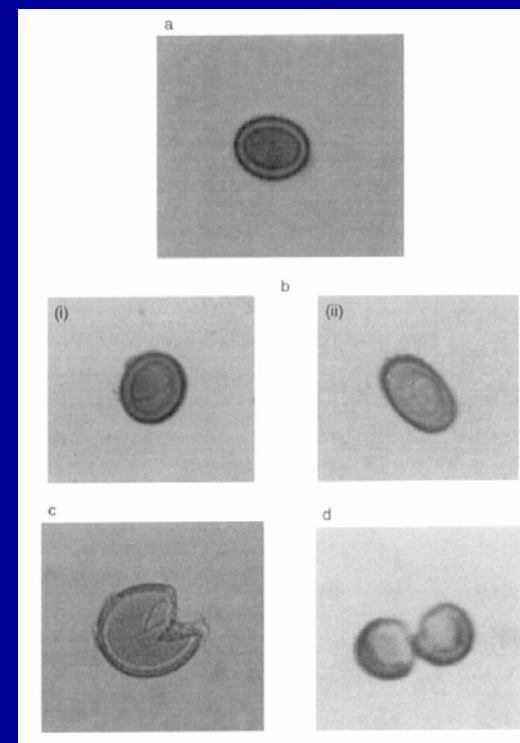
Fotodestrucción de huevo
de *Ascaris*

Condiciones:

$[T_4MP_Y P] = 10 \mu M - 30 \mu M$

Iluminación: $> 0.1 W/cm^2$

Duración: 60 min



Fotodestrucción de huevo
de *Taenia*

Z. Alouini et al. *J. Environ. Monit.*, 2001, 3, 548.

EMISIÓN DEL $^1\text{O}_2$ EN EL INTERIOR DE LAS NEURONAS

TÉCNICA DE IMAGEN DIRECTA

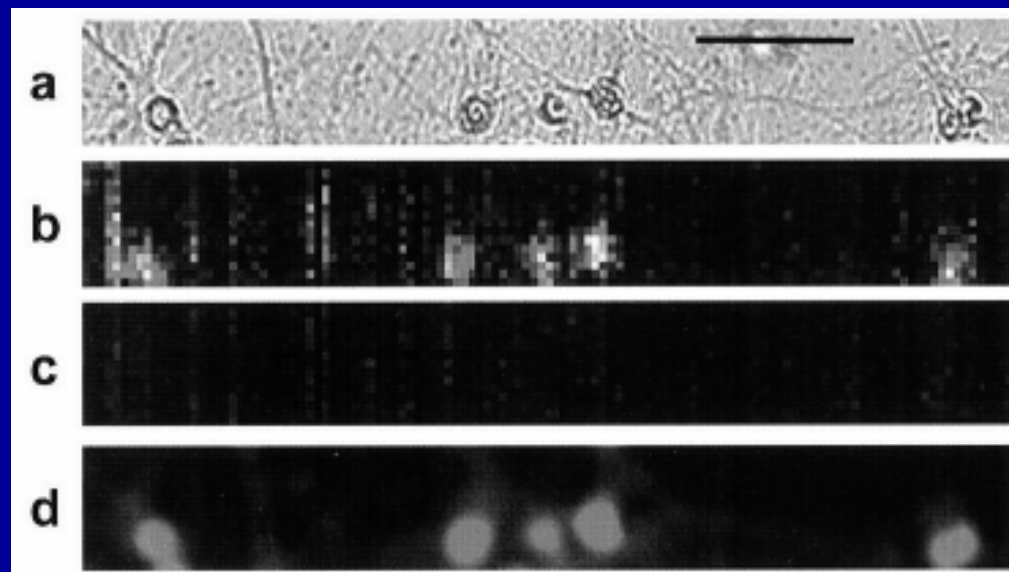
VIS

$\lambda = 1270 \text{ nm}$ →

$^1\text{O}_2$

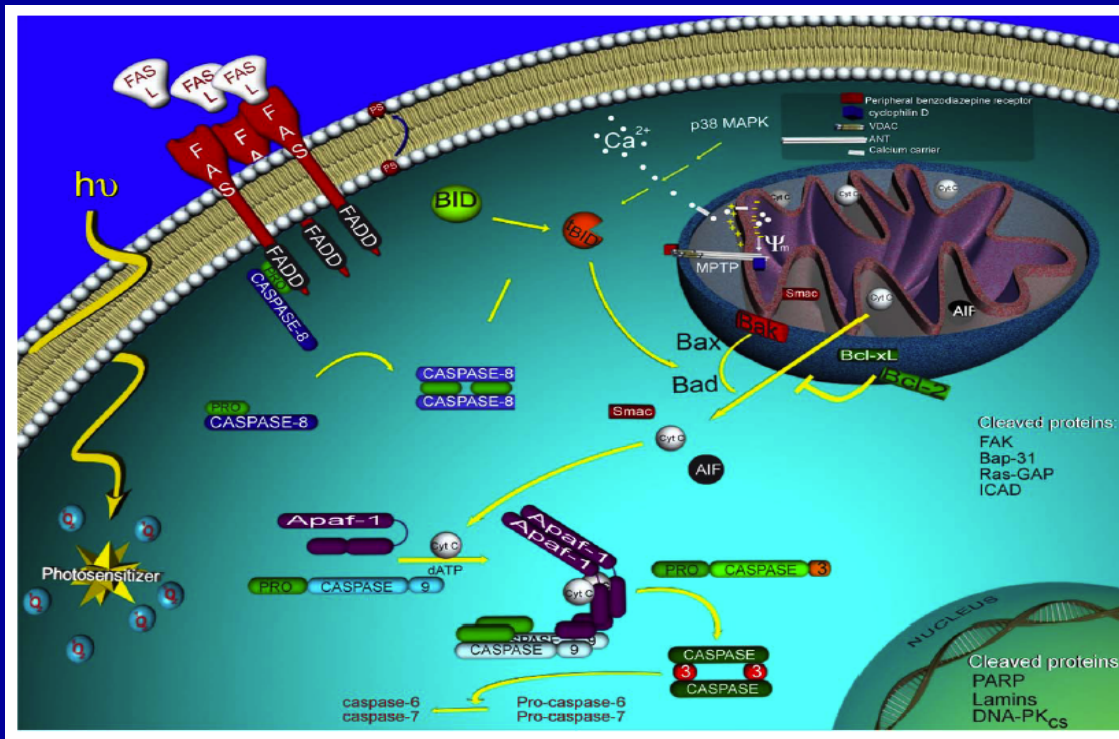
$\lambda = 1200 \text{ nm}$

$\lambda = 670 \text{ nm}$ → Fotosensibilizador
(TMPyP)



Zebger et al. *Photochem. Photobiol.* **2004**, 79, 319.

MUERTE CELULAR MEDIADA POR OXIGENO SINGLETE



- Fosfolipasas
- Ceramida
- Ca²⁺ citosol
- Oxido nitrico sintasa (NOS)
- Fosforilación proteínas
- Factores de transcripcion
- Regulación expresión génica



APOPTOSIS

R.D. Almeida et al. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1704, 59.

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE 1O_2 : APLICACIONES

TERAPIA FOTODINÁMICA (PDT)



Oncología (e.g. Photofrin[®])

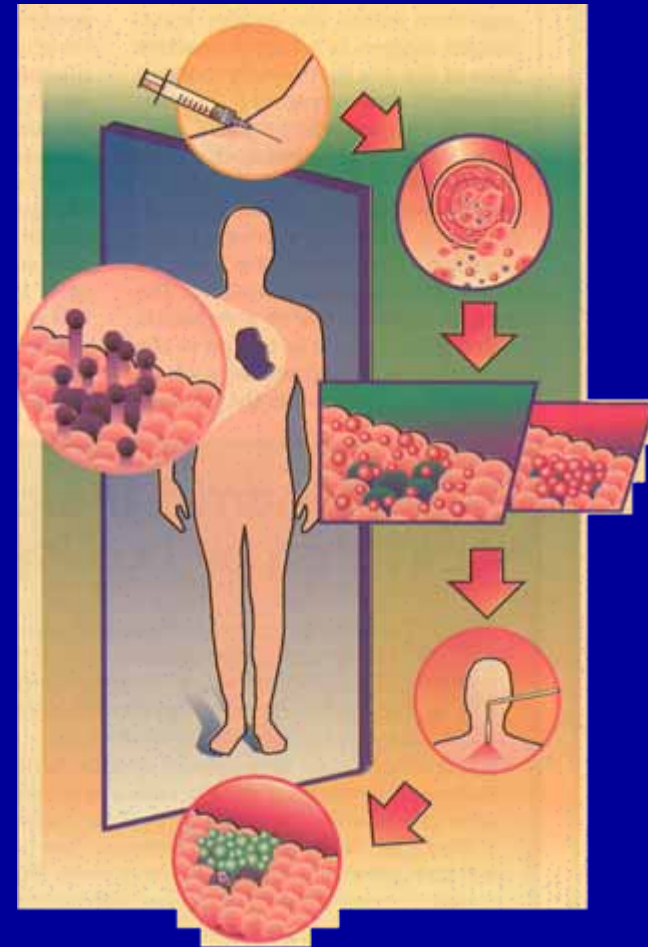


Control de infecciones tópicas
(virus, bacterias resistentes a antibióticos)



Esterilización de sangre
contaminada*

* R.C. Allen, Patente PCT 9715661 a Eoe, Inc., USA.





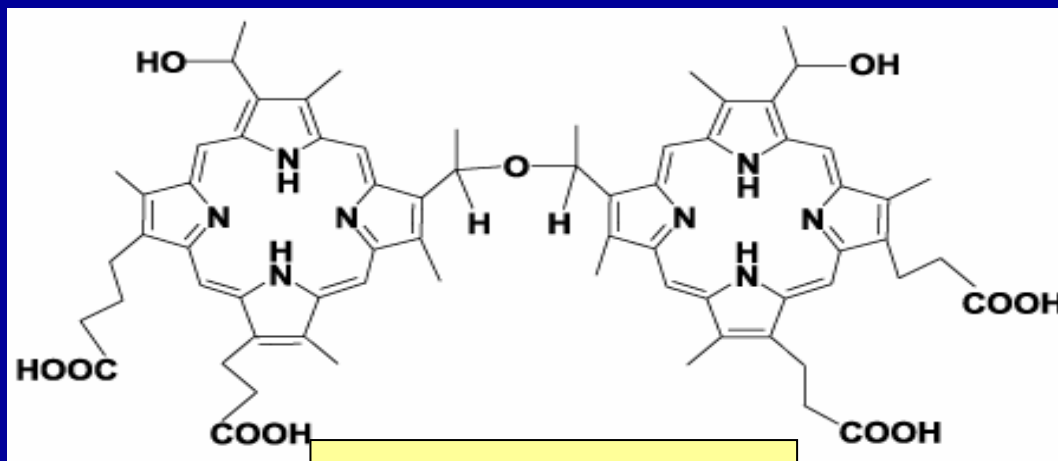
ETAPAS TERAPIA FOTODINÁMICA

- Administración del fármaco (via tópica o intravenosa).
- Tiempo de espera para la retención fármaco en tejido diana.
- Irradiación con láser de la zona a tratar.
- Destrucción celular por $^1\text{O}_2$.
- Periodo de eliminación del fármaco (reacciones de fotosensibilidad).

PROPIEDADES FOTOSENSIBILIZADOR IDEAL

- Baja toxicidad.
- Alto rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete.
- Absorción de luz a $\lambda > 600$ nm.
- Propiedades farmacocinéticas (alta selectividad, alta solubilidad en agua, fácil eliminación).

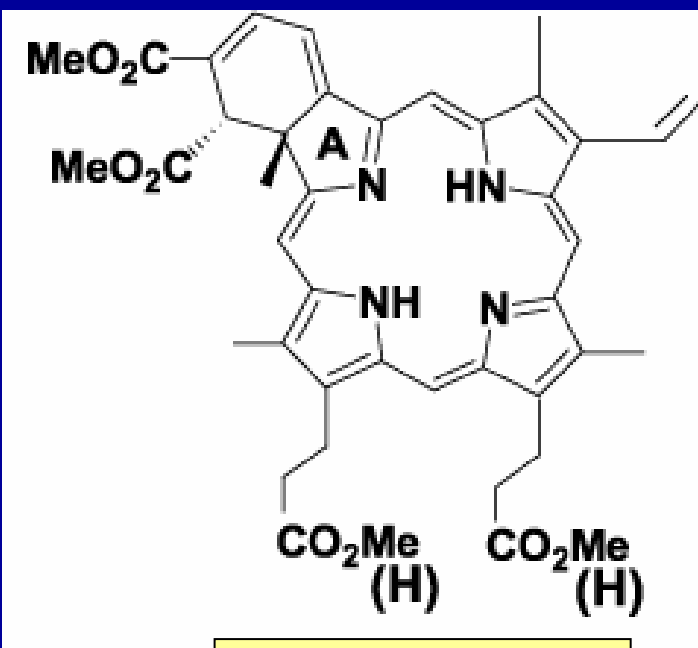
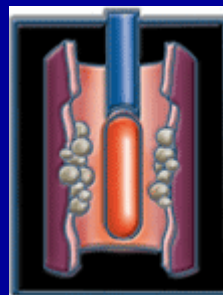
FÁRMACOS USADOS EN TERAPIA FOTODINÁMICA



Photofrin®

 $\lambda_{exc.} = 630 \text{ nm}$

Profundidad 5 mm

Visudyne®
(BPDMA) $\lambda_{exc.} = 690 \text{ nm}$



TECNOLOGÍAS PARA LA DESINFECCIÓN DE AGUAS

Gran escala

- Cloro (gas)
- Cloramina
- Hipoclorito sódico
- Dióxido de cloro

Media escala

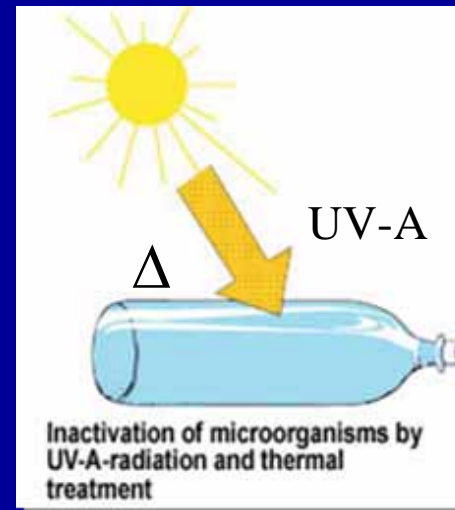
- Ozono
- Luz UV

Pequeña escala

- Ebullición
- Iodo
- Fotoquímica

El método SODIS

SODIS usa **radiación solar** para destruir *microorganismos patógenos* que causan infecciones a través del agua.



www.sodis.ch

Limitaciones del método SODIS

- ☑ SODIS no mejora la **calidad del agua** si tiene contaminantes químicos
- ☑ SODIS requiere **agua relativamente limpia** (turbidez menor de 30 NTU)
- ☑ SODIS requiere **condiciones soleadas de tiempo atmosférico**
- ☑ SODIS no es útil para tratar **grandes volúmenes** de agua

FOTOSENSIBILIZACIÓN DE $^1\text{O}_2$: APLICACIONES

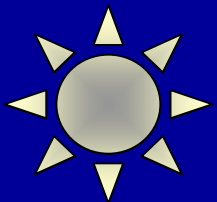
DESINFECCIÓN DE AGUA

FASE HOMOGÉNEA

FOTOSENSIBILIZADOR
en disolución

FASE HETEROGÉNEA

FOTOSENSIBILIZADOR
inmovilizado en un
SOPORTE



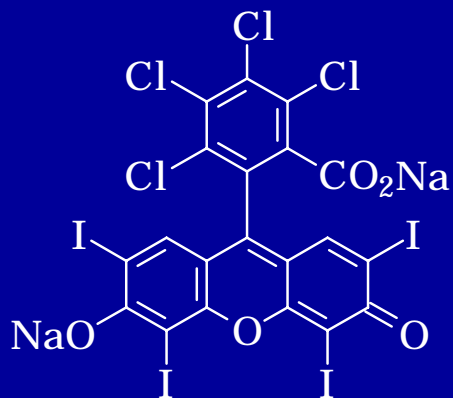
PLANTAS
PILOTO

ENSAYOS EN
LABORATORIO

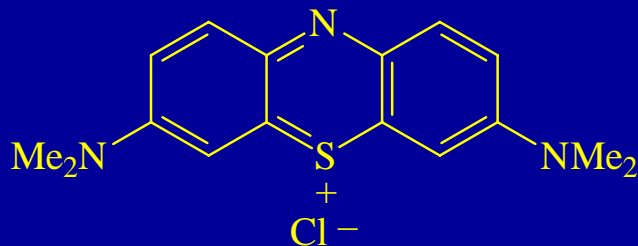
- ▶ Producción eficiente de $^1\text{O}_2$
- ▶ Inactivación microorganismos

- Proyectos U.E.:
**SOLWATER
AQUACAT**
- Otros (EPA/USA)

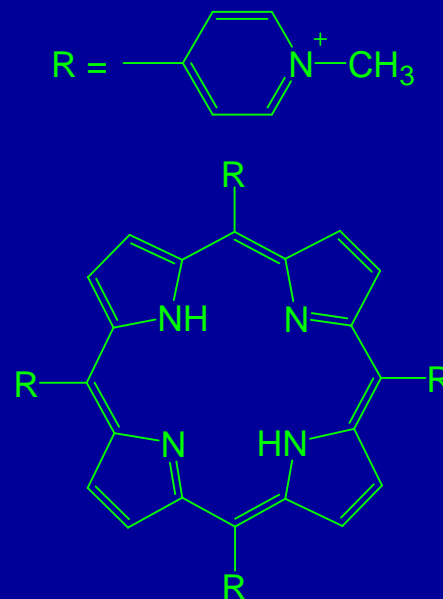
TIPOS DE FOTOSENSIBILIZADORES



Rosa de Bengala



Azul de metileno

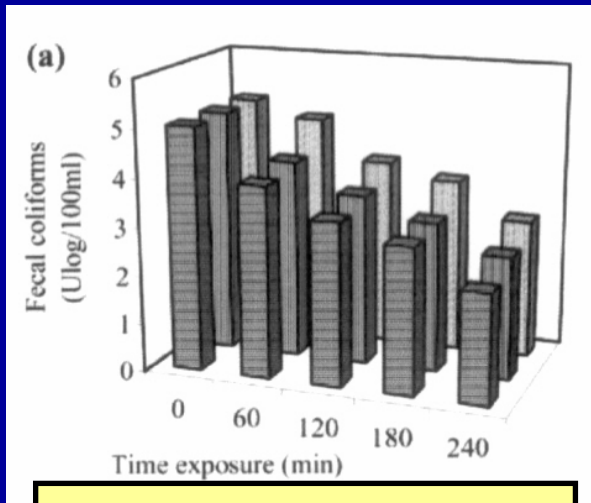


T₄MP_YP

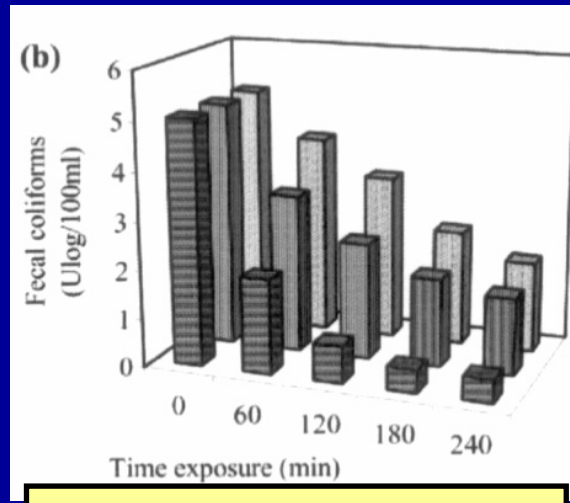
TIPOS DE FOTOSENSIBILIZADORES (2)

Inactivación de coliformes fecales

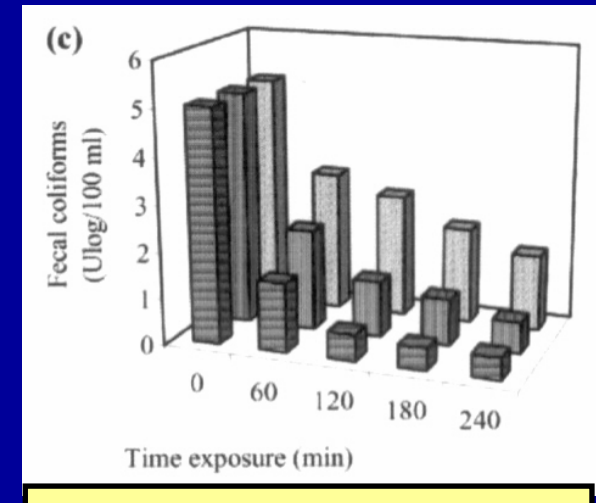
- T₄MP_YP
- Azul de metileno
- Rosa de Bengala



[sensibilizador] = 1 µM



[sensibilizador] = 5 µM



[sensibilizador] = 10 µM

Irradiación solar

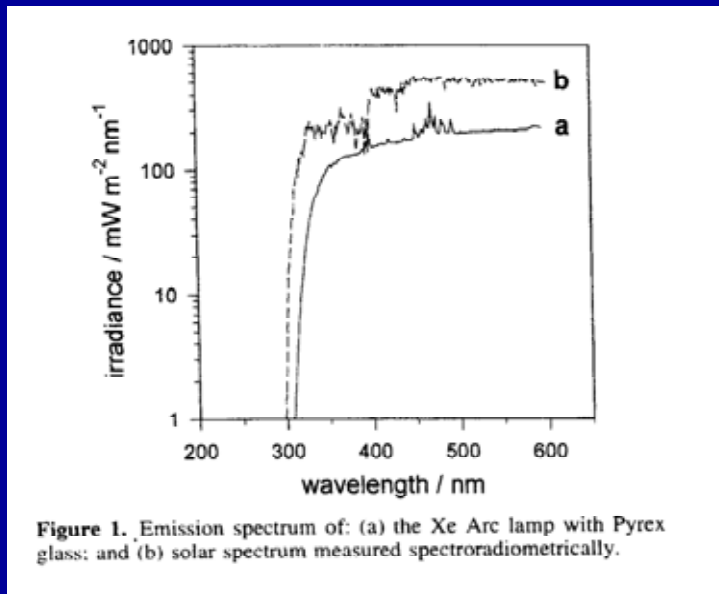
M. Jemli et al. *J. Environ. Monit.* **2002**, 4, 511.

Fotoinactivación mediada por 1O_2 : fase homogénea

[Rosa de Bengala] = 2 ppm

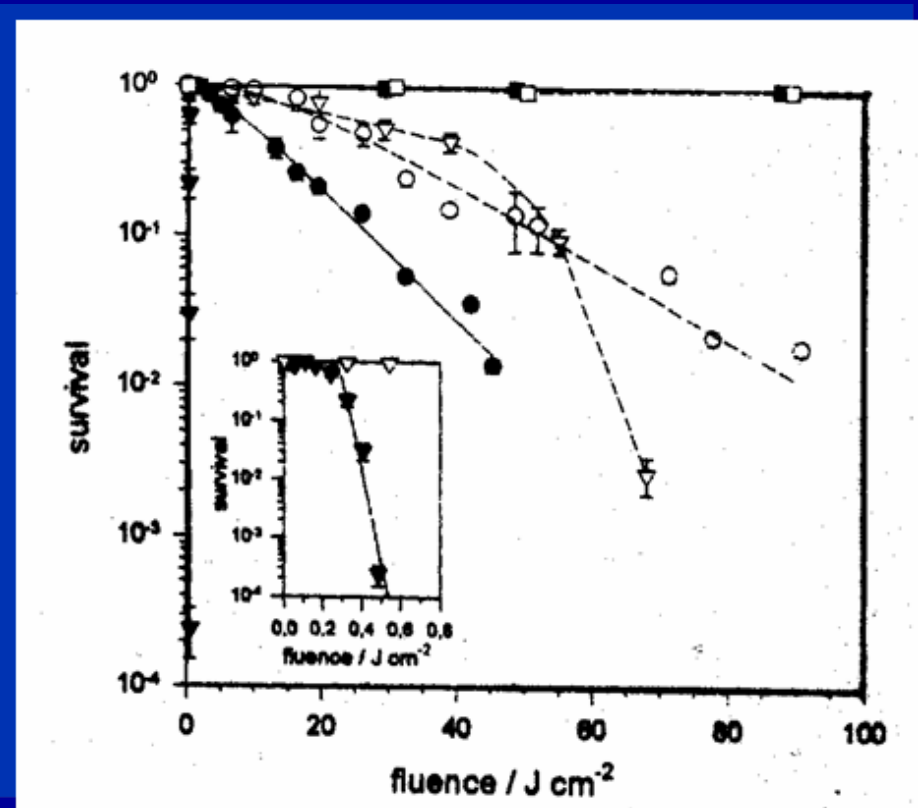
[bacteria] = 10^7 CFU/mL

Lampara Xe (1000 W)
(+ Pyrex)



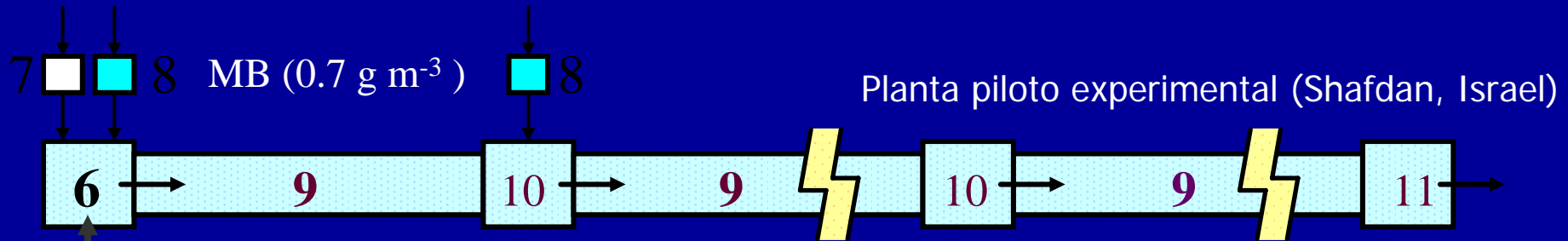
● *E. coli*

▼ *D. Radiodurans*



M. Schäfer et al. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 514

Fotoinactivación mediada por 1O_2 : fase homogénea



1. Bomba, 50 m³/h

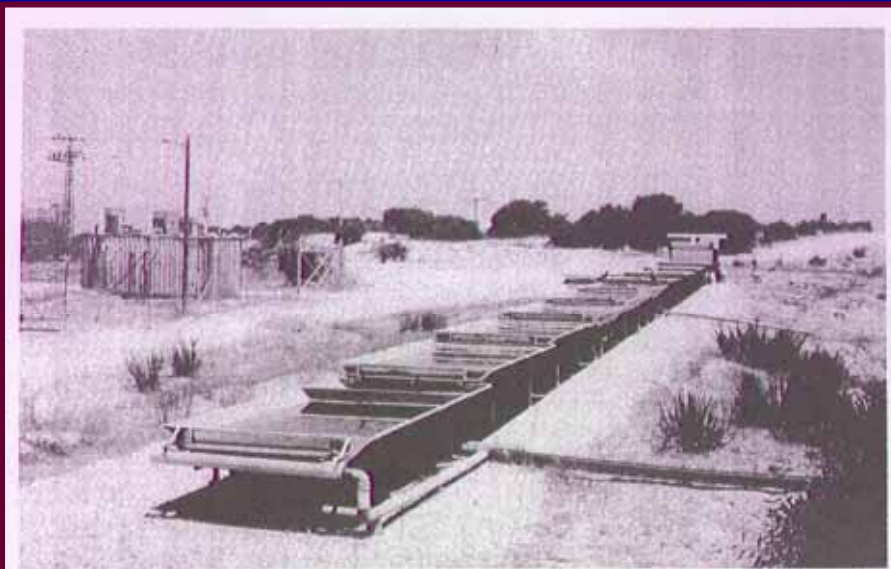


Fig. 1 Sunlight desinfection of domestic effluents.

Condiciones:

Iluminación: 0.28 - 0.84 kW/m²

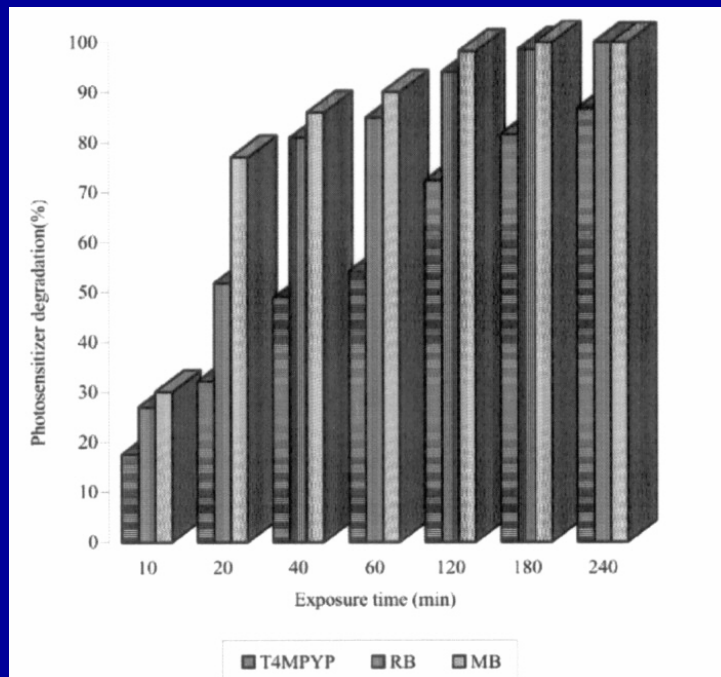
Duración: 35 min

Desinfección:




- ✓ Coliformes y *E. coli*
 - ✓ *Enterococcus fecalis*
 - ✓ Poliovirus
- (Efecto post-tratamiento > 7 días)

A. Acher et al. In *Proceedings of the Eighth International Symposium on Solar Thermal Concentrating Technology*, Vol. 3, pp. 1403 - 1413 (1997), Müller Verlag

FOTOESTABILIDAD DE SENSIBILIZADORES



iii tras 4 horas de irradiación solar la degradación de los tres fotosensibilizadores es casi del 100% !!!

-  T₄MP_YP
-  Azul de metileno
-  Rosa de Bengala

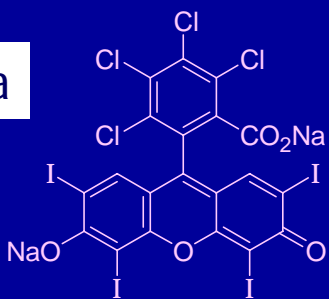
M. Jemli et al. *J. Environ. Monit.*, 2002, 4, 511.

Fotosensibilizadores de 1O_2

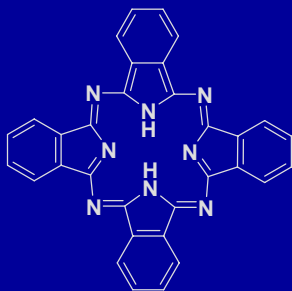
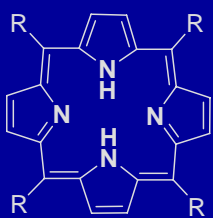
Azul de metileno

 $\lambda_{\max}^{\text{abs}} = 665 \text{ nm}$ $\Phi_{\Delta} = 0,2 - 0,95 \text{ (pH = 5 - 9)}$ 

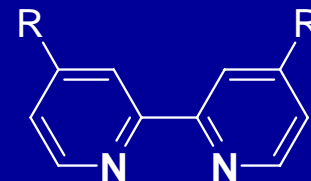
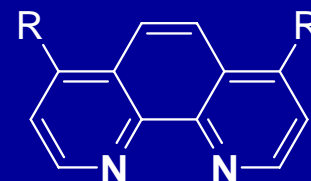
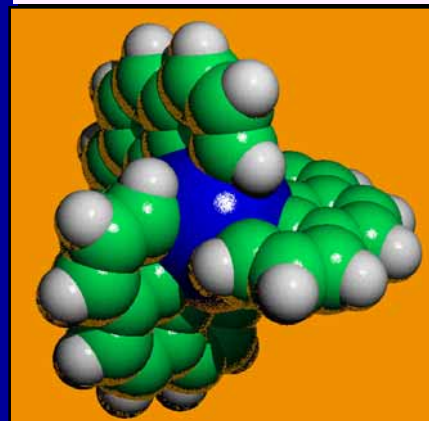
Rosa de Bengala

 $\lambda_{\max}^{\text{abs}} = 548 \text{ nm}$ $\Phi_{\Delta} = 0,75$ 

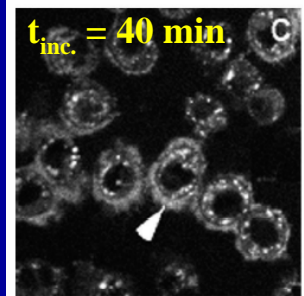
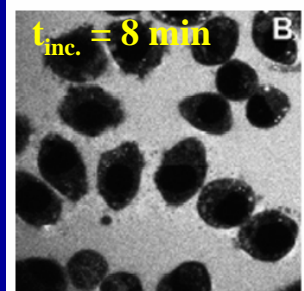
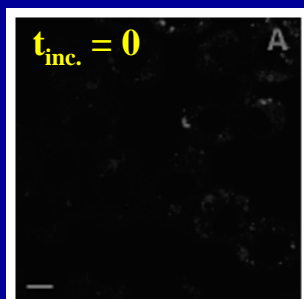
Porfirinas y ftalocianinas



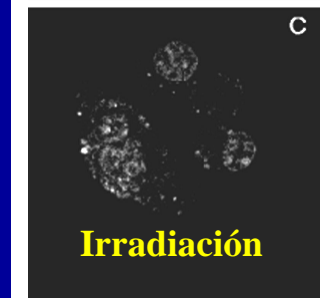
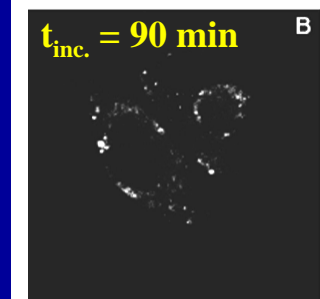
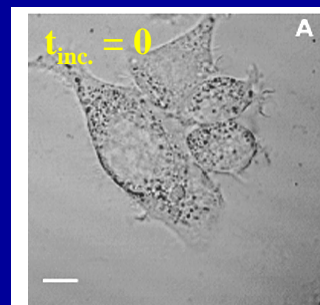
Complejos de Ru(II) con ligandos polipiridilicos

 $\lambda_{\max}^{\text{abs}} = 400 - 500 \text{ nm}$ $\Phi_{\Delta} = 0,1 - 1$

FOTOSENSIBILIZADORES METALO-ORGÁNICOS



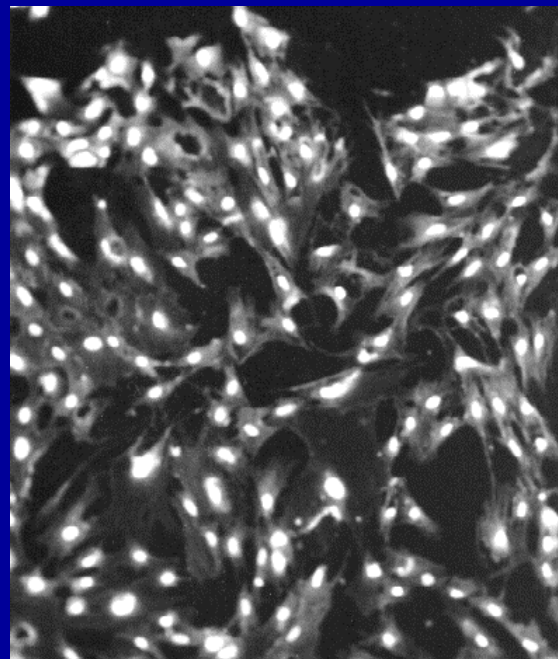
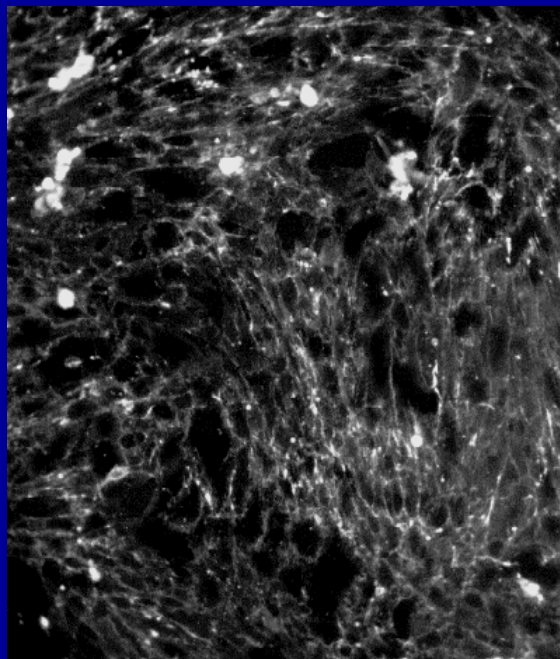
Macrófagos incubados con
fotosensibilizador en oscuridad



Macrófagos incubados con
fotosensibilizador (2 mM)

J. Dobrucki. *J. Photochem. and Photobiol. : B.* **2001**, 65, 136.

FOTOSENSIBILIZADORES METALO-ORGÁNICOS

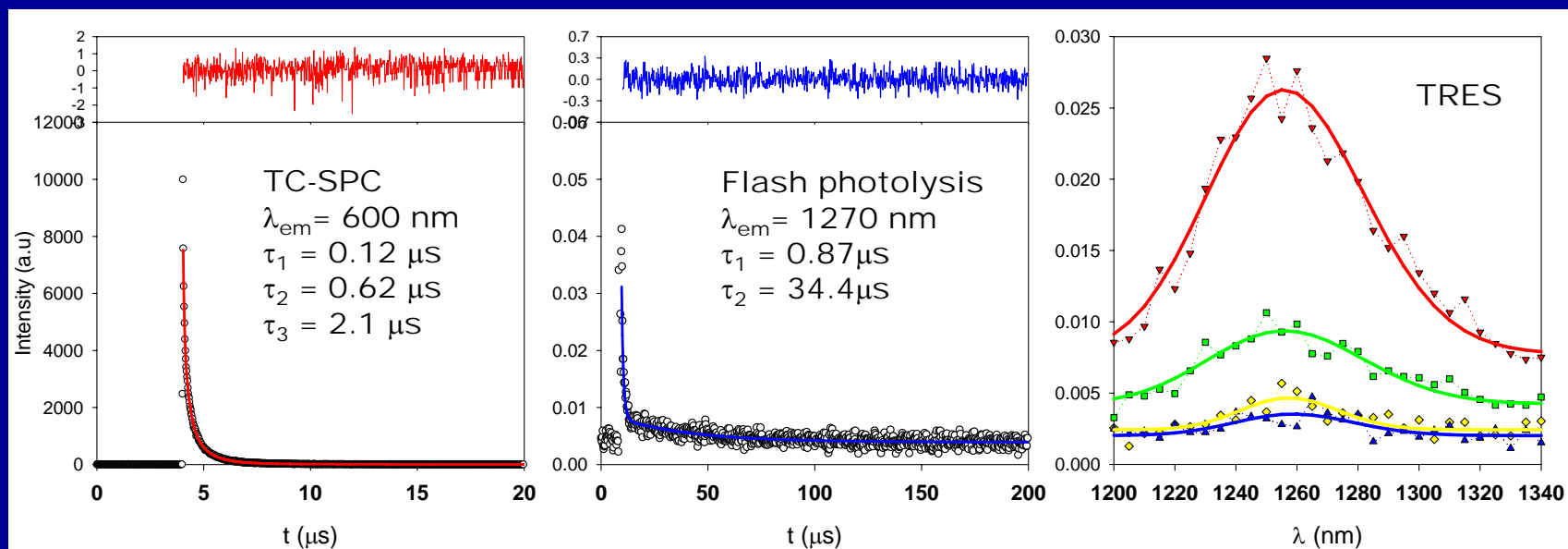


Los sensibilizadores catiónicos de Ru(II) no penetran la membrana celular (intacta).

G. Orellana et al. *Photochem. Photobiol* **2000**, 72, 28-34;
G. Orellana et al. *Span. Patent* 2151420

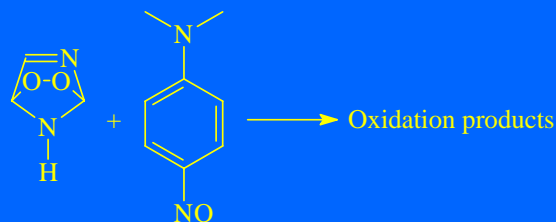
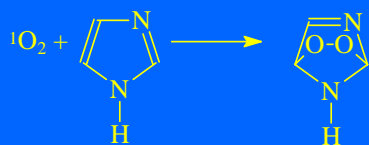
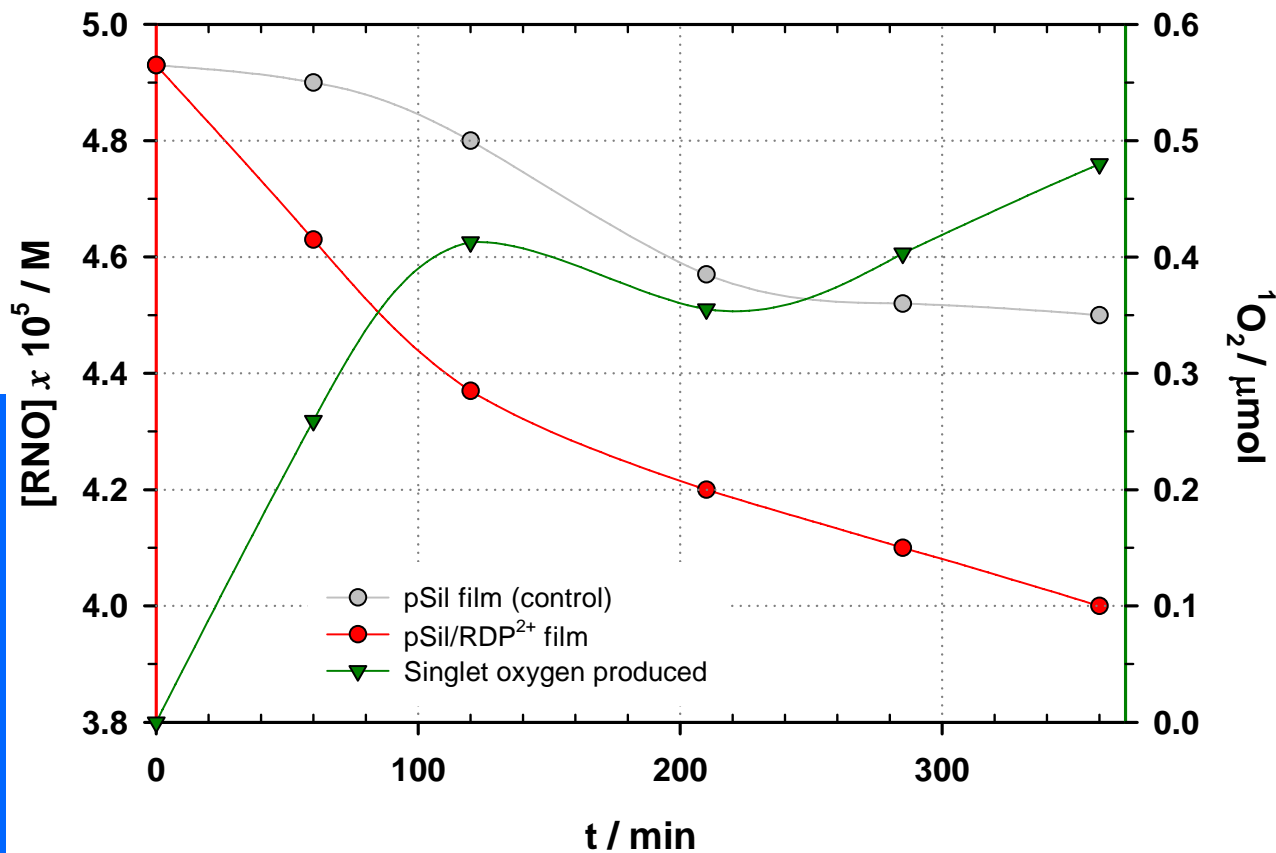
Caracterización de la producción de 1O_2 por fotosensibilizadores de Ru(II) inmovilizados en agua equilibrada con aire (1/2)

Emisión del oxígeno singlete en el infrarrojo próximo
RD3²⁺/p-SiI/water/air

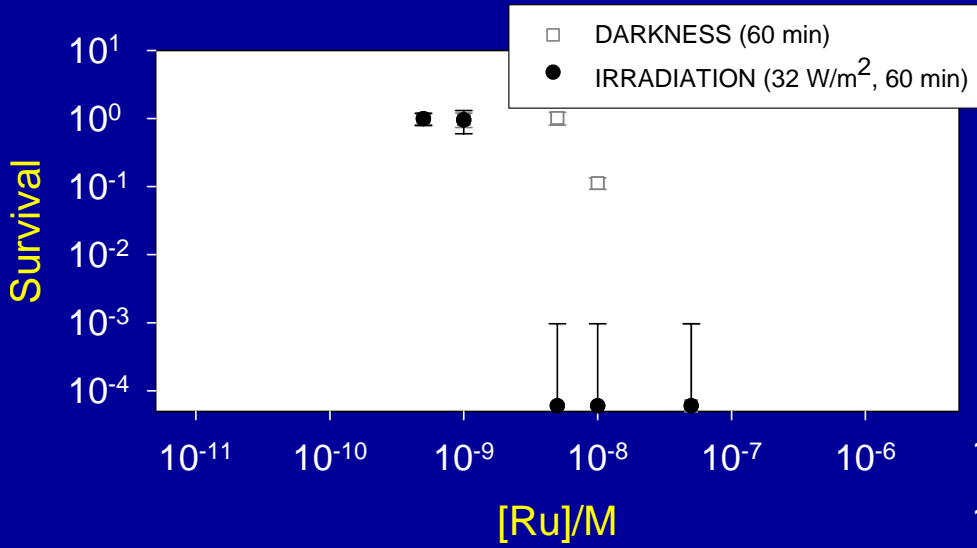


G. Orellana y col., *Solar Energy* **2005** (en prensa; [doi: 10.1016/j.solener.2005.04.027](https://doi.org/10.1016/j.solener.2005.04.027))

Caracterización de la producción de 1O_2 por fotosensibilizadores de Ru(II) inmovilizados en agua equilibrada con aire (2/2)

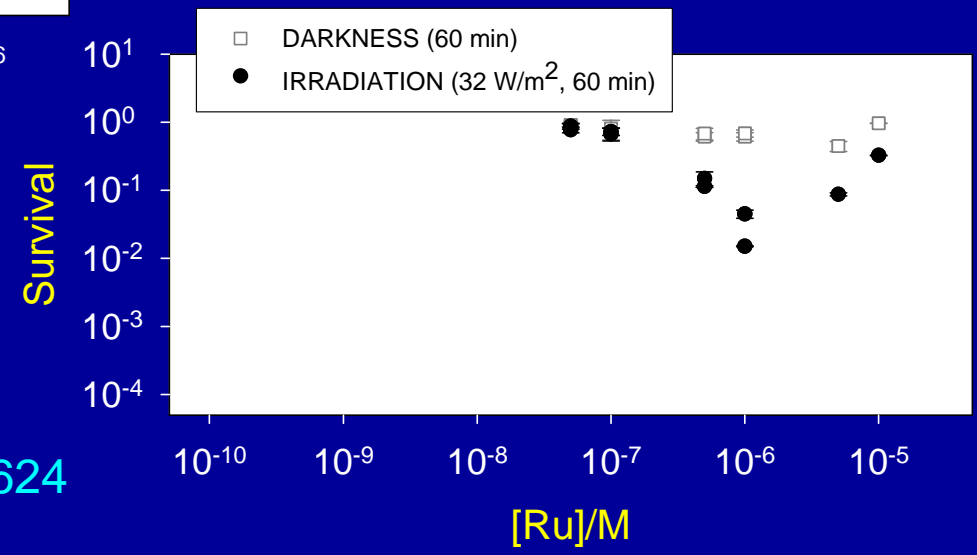


Toxicidad de los fotosensibilizadores (1/2)



E. faecalis CECT5143

Toxicidad del RDP²⁺

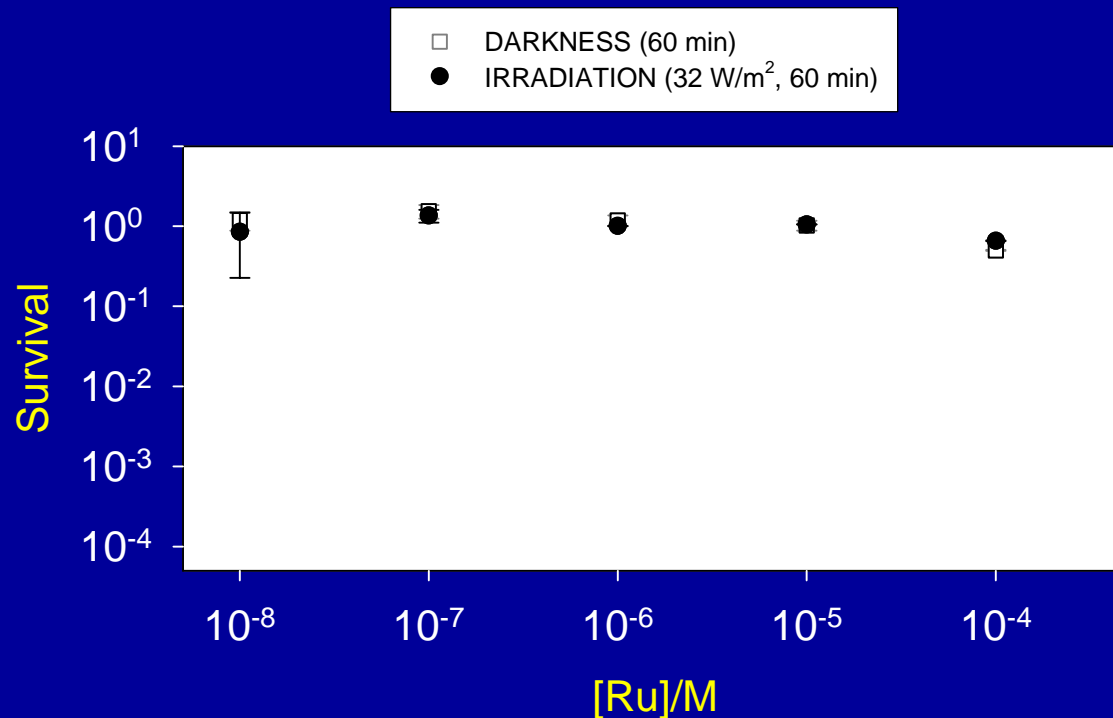


E. coli CECT4624

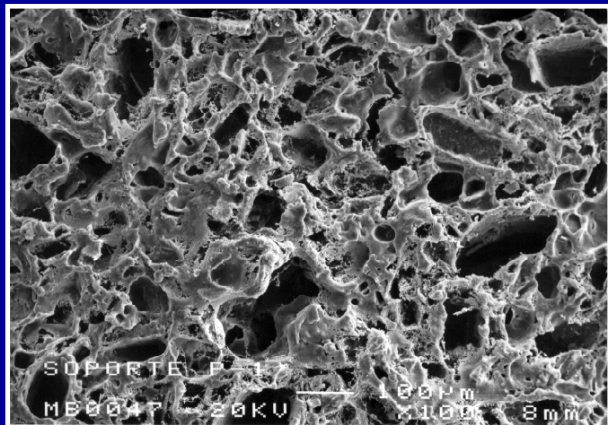
Toxicidad de los fotosensibilizadores (2/2)

... con **RSD⁴⁻** NO se observó toxicidad

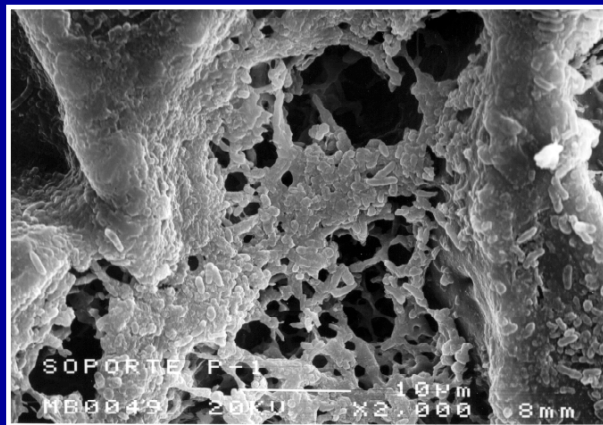
E. faecalis CECT5143



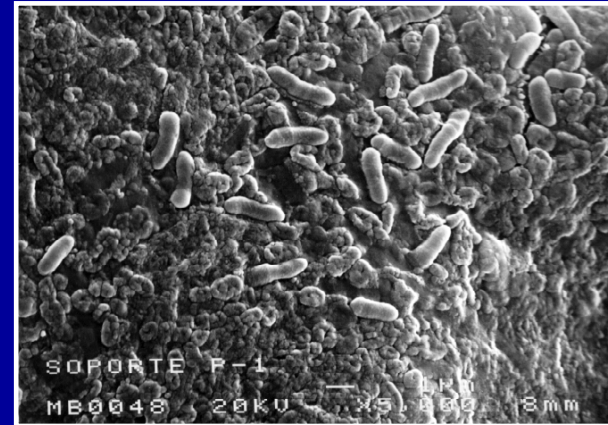
Bacterias sobre silicona porosa



100X

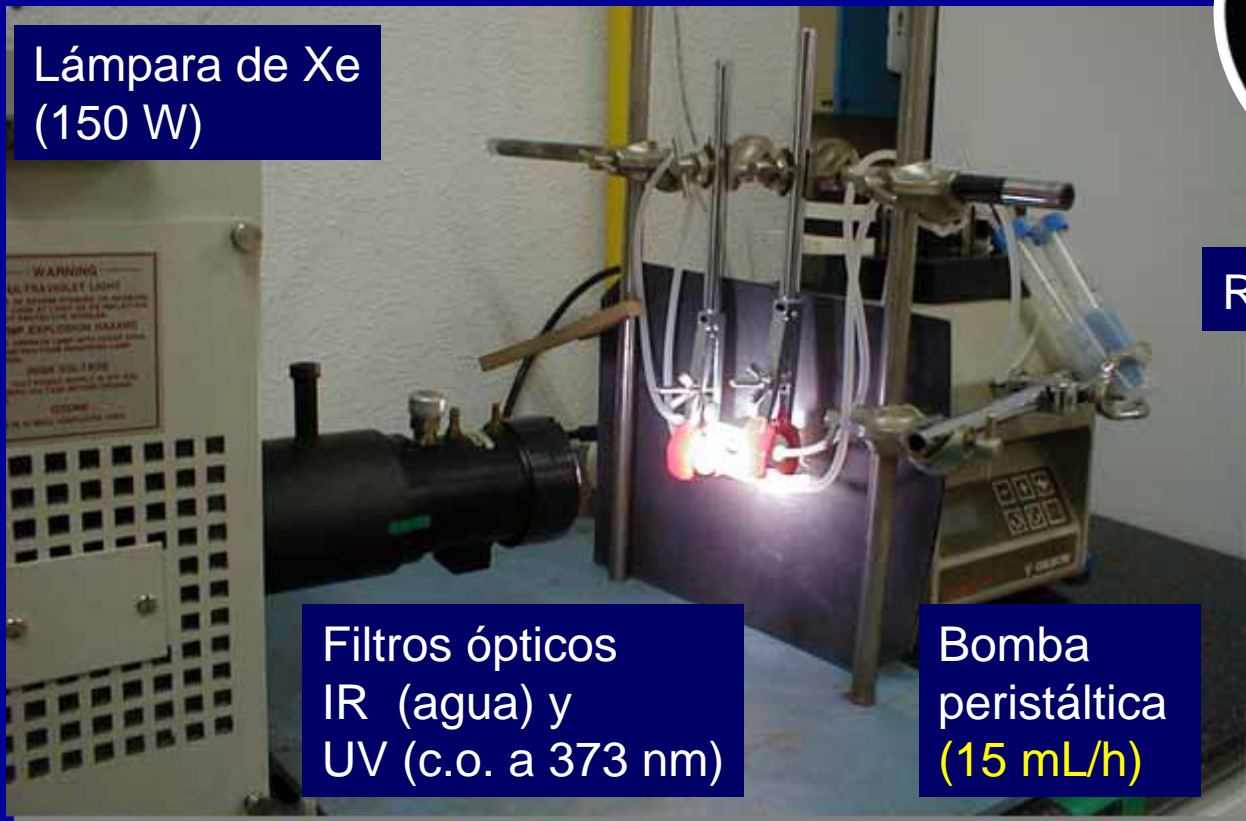


2000X



5000X

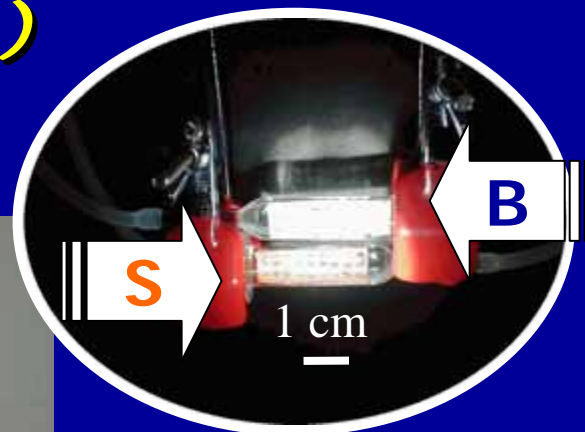
Microrreactor de laboratorio (simulador solar)



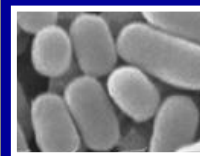
Lámpara de Xe
(150 W)

Filtros ópticos
IR (agua) y
UV (c.o. a 373 nm)

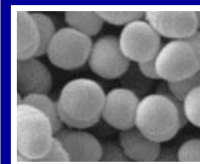
Bomba
peristáltica
(15 mL/h)



Reservorios (9 mL cada uno)



Escherichia coli (-)
(CECT 4624)



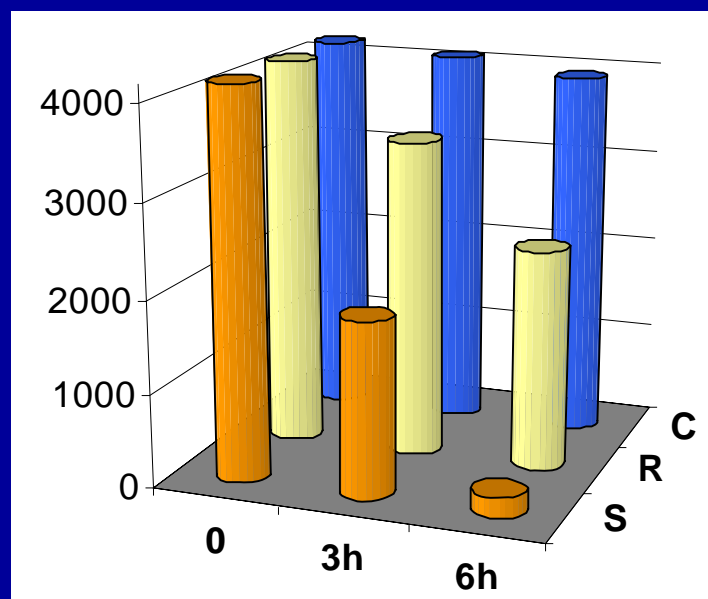
Enterococcus faecalis (+)
(CECT 5143)

10^{-2} & 10^{-4} CFU/mL

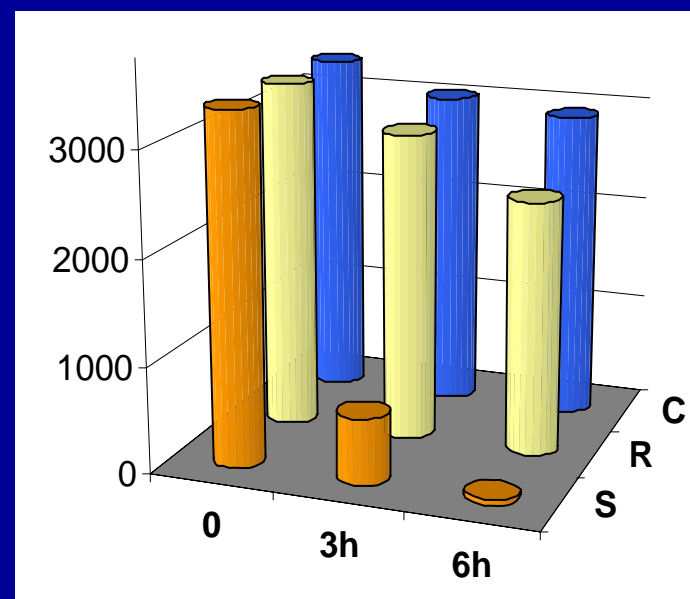
Resultados del microrreactor de laboratorio

C = Control (estático y en oscuridad); R = Referencia; S = Muestra

E. coli



E. faecalis



Velocidad de desinfección con $^1\text{O}_2$: $\approx 10^3$ bacteria h^{-1} ($\approx 10^5$ bacteria $\text{h}^{-1} \text{L}^{-1}$)

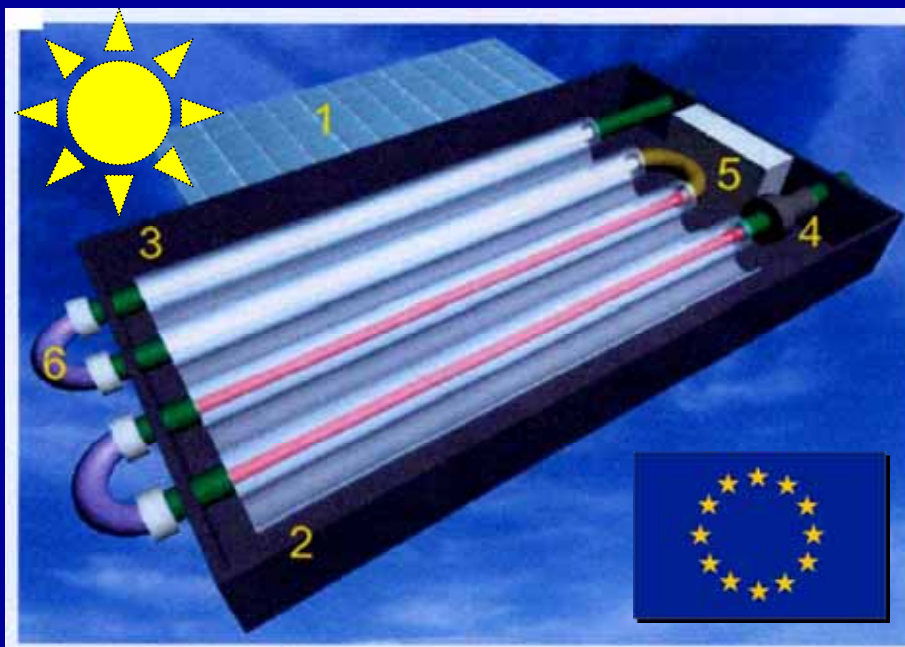
G. Orellana and co-workers, *Span. Patent* 2 226 576

G. Orellana and co-workers, *Solar Energy J.* 2005 (en prensa)

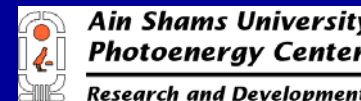


Desinfección de agua mediante fotoquímica solar para comunidades rurales aisladas

El concepto Solwater-Aquacat

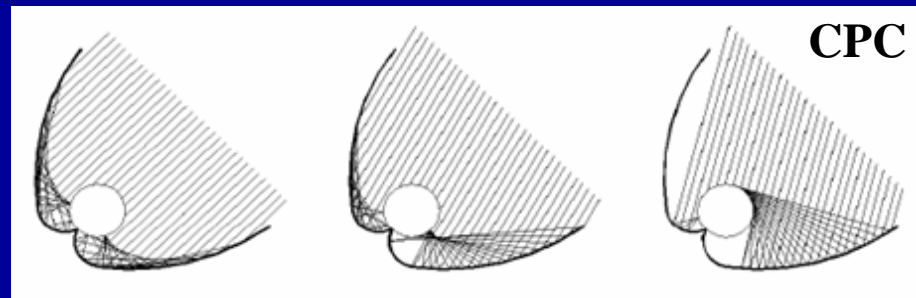


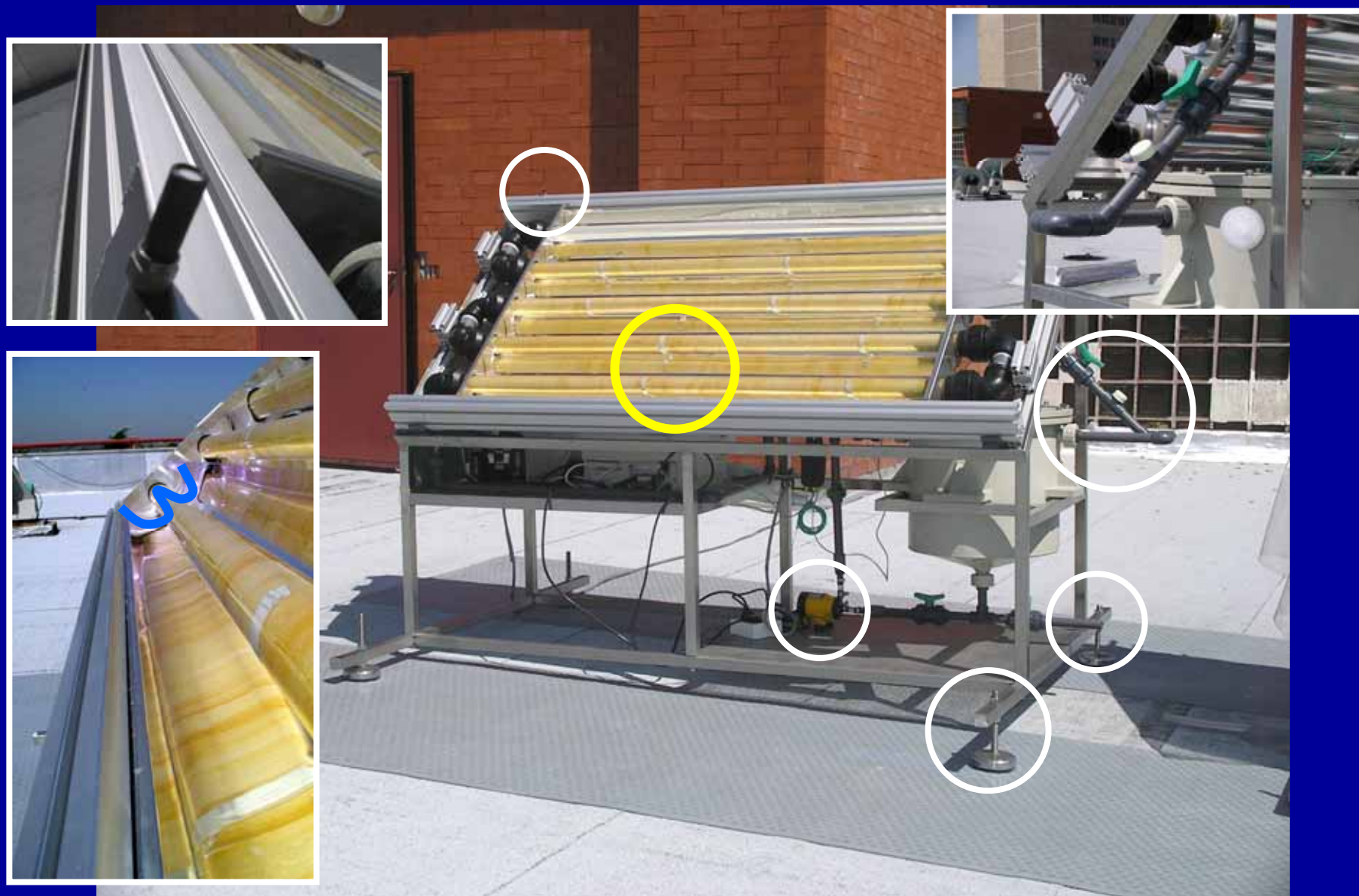
1. Photovoltaic panel
2. Ru(II) photo-reactors
3. Supported TiO₂ photo-reactors
4. Pump
5. Electrical box
6. Easily opening to photo-reactors exchange





Reactor de demostración para desinfección solar

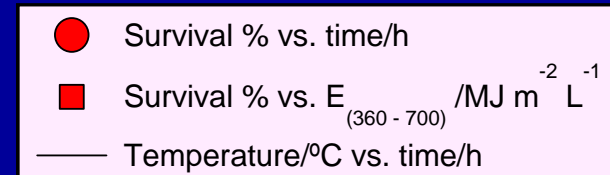






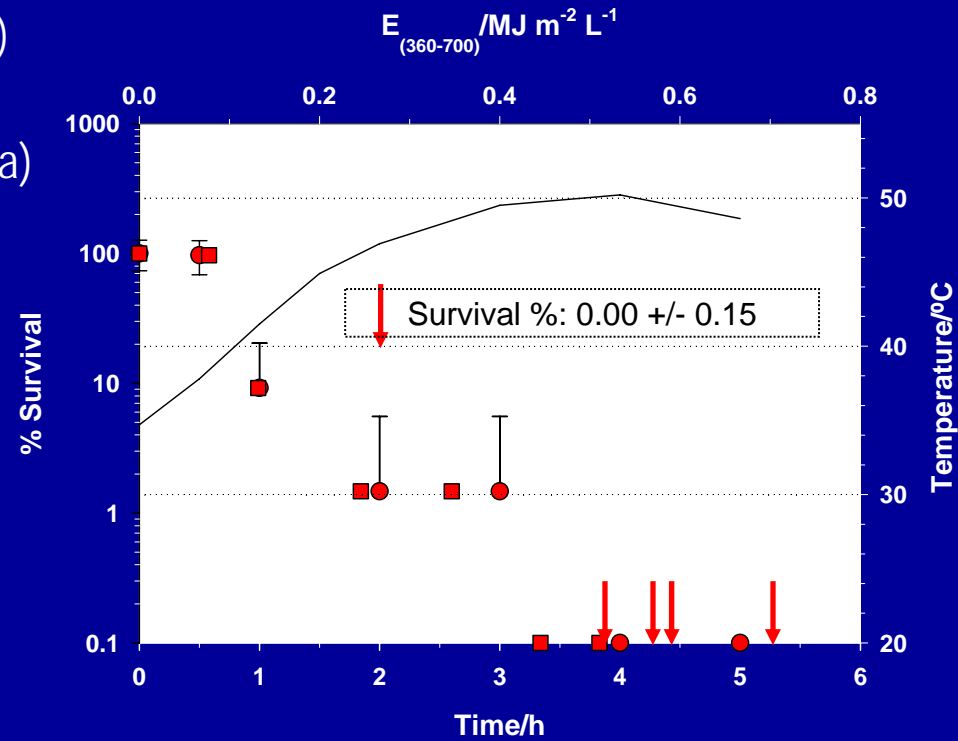
Experimentos de desinfección con reactores solares

- Test de control (sin p-Sil y sin RDP²⁺)
- Ensayo de referencia (con p-Sil y sin RDP²⁺)
- Test de desinfección (con p-Sil aynd con RDP²⁺)



- Volumen de agua: 10 L (coaxial); 17.5 L (aletas)
- Caudal de agua: 2 L min⁻¹
- Tubos con sensibilizador: 4/5 (coaxial); 5/7 (aleta)
- Réplicas: cada dato es un promedio de 3 tests
- Medida de T en continuo

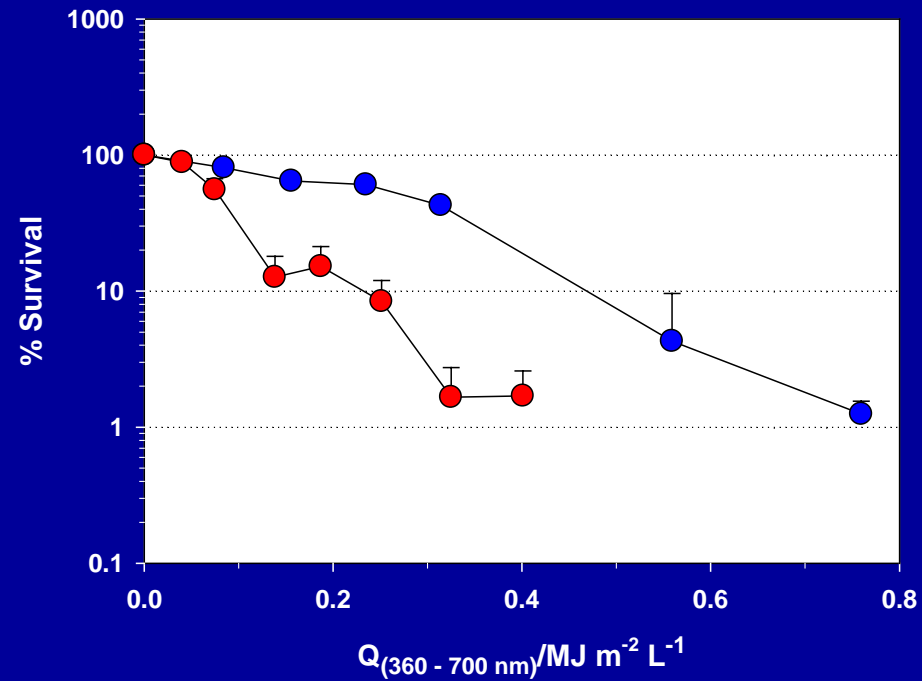
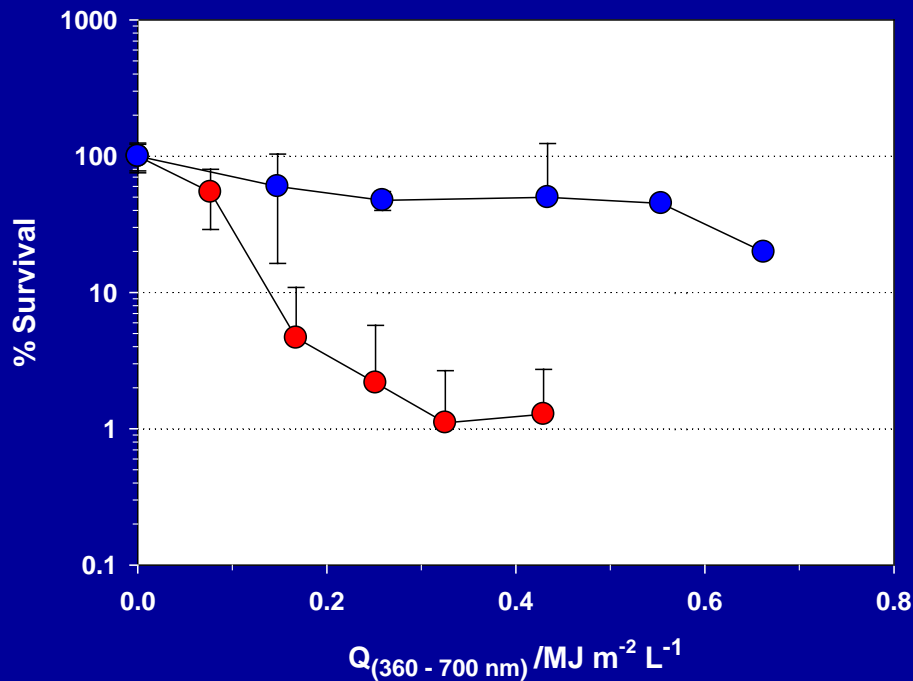
AQUAVIVA	
Residuo seco	56 mg/L
Calcio	9.8 mg/L
Magnesio	3.4 mg/L
Sodio	6.6 mg/L
Potasio	0.4 mg/L
Bicarbonato	31 mg/L
Chlouro	6.2 mg/L



Coaxial- vs. aletas (*E. coli*)

$C_0: 10^2$ CFU/mL

$C_0: 10^4$ CFU/mL

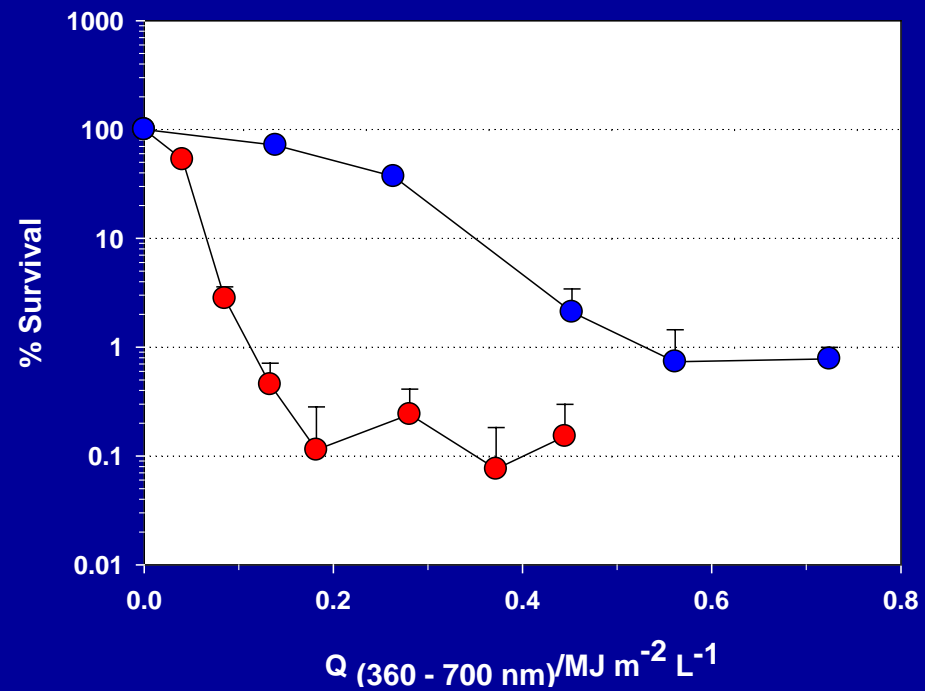
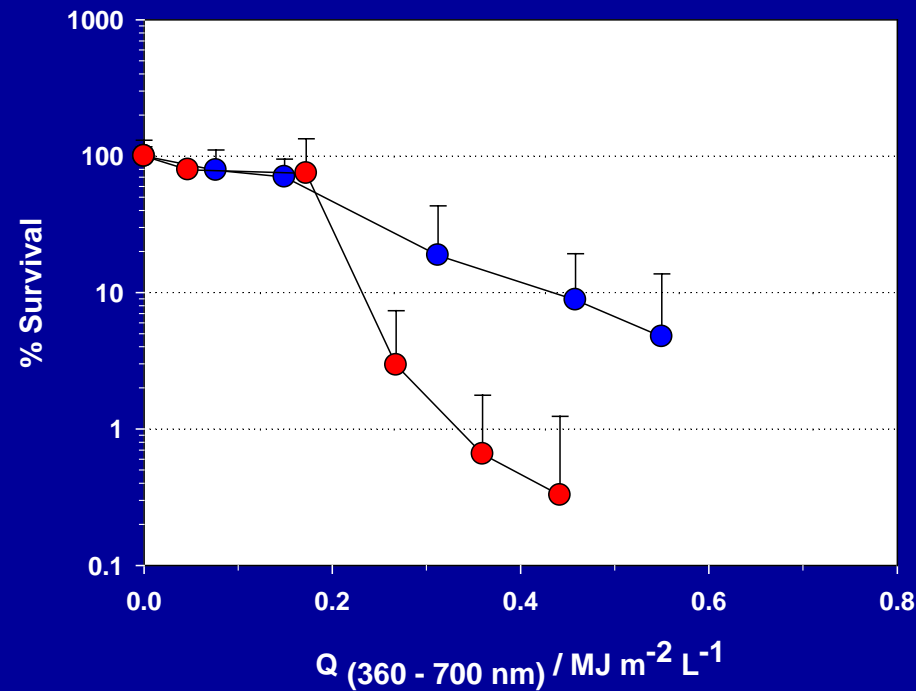


- Fin-type Reactor with p-Sil and with RDP²⁺
- Coaxial-type Reactor with p-Sil and RDP²⁺

Coaxial- vs. aletas (*E. faecalis*)

$C_0: 10^2$ CFU/mL

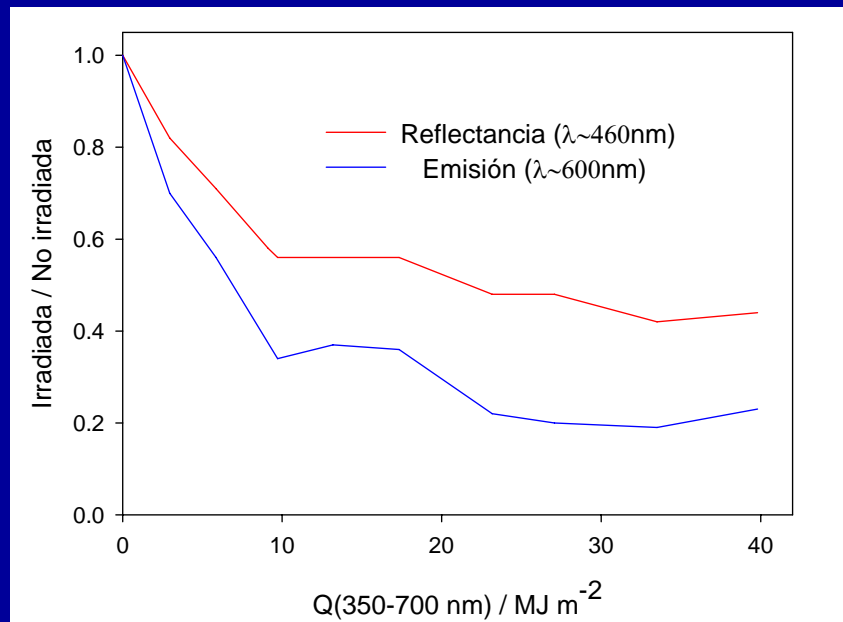
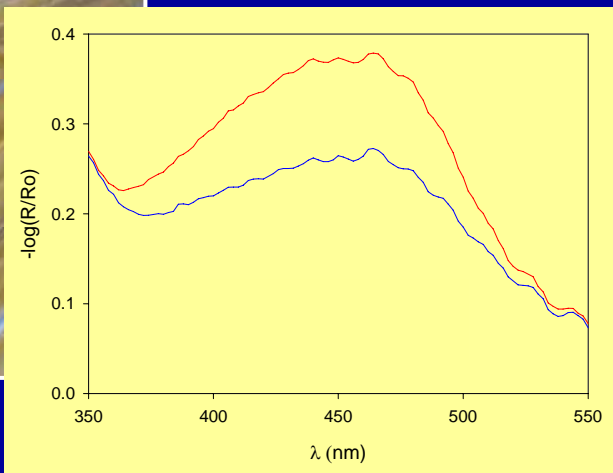
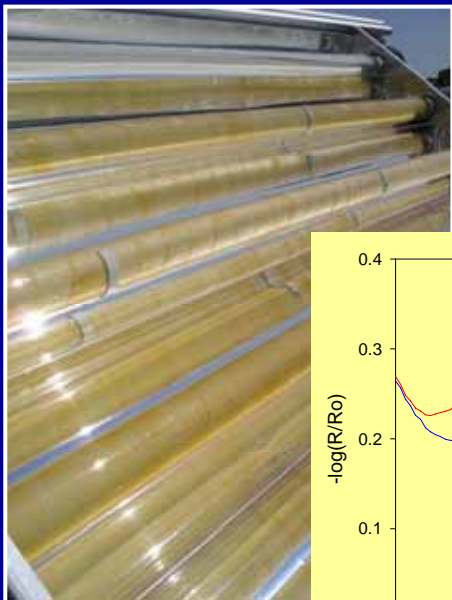
$C_0: 10^4$ CFU/mL



- Fin-type Reactor with p-Sil and with RDP²⁺
- Coaxial-type Reactor with p-Sil and RDP²⁺

G. Orellana and co-workers, *Appl. Cat B: Environm.* **2005** (submitted)

Fotodegradación del sensibilizador



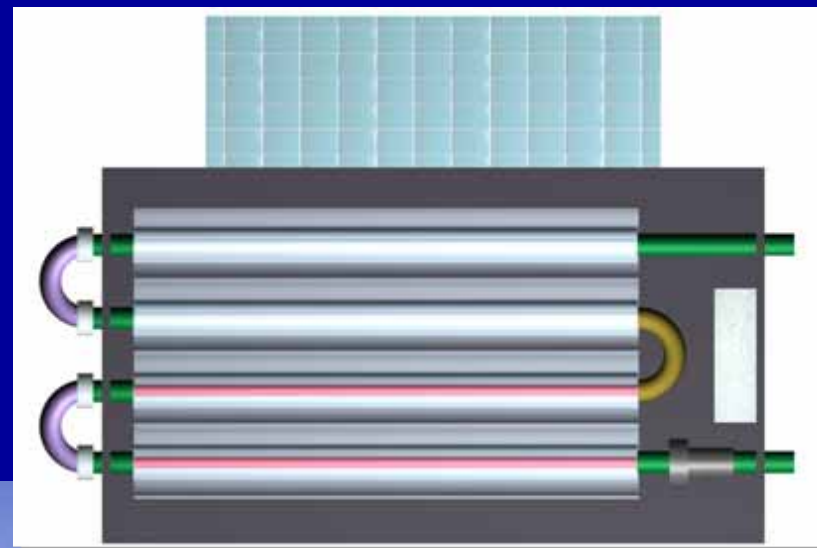
$P_{O_2}^T$

	0 (0 h)	45 (~50 h)	75 (~100 h)	120 (~120 h)
Air	0.80	0.75	0.71	0.63
O₂	0.91	0.82	0.81	0.72

Ensayos in situ (Argentina)



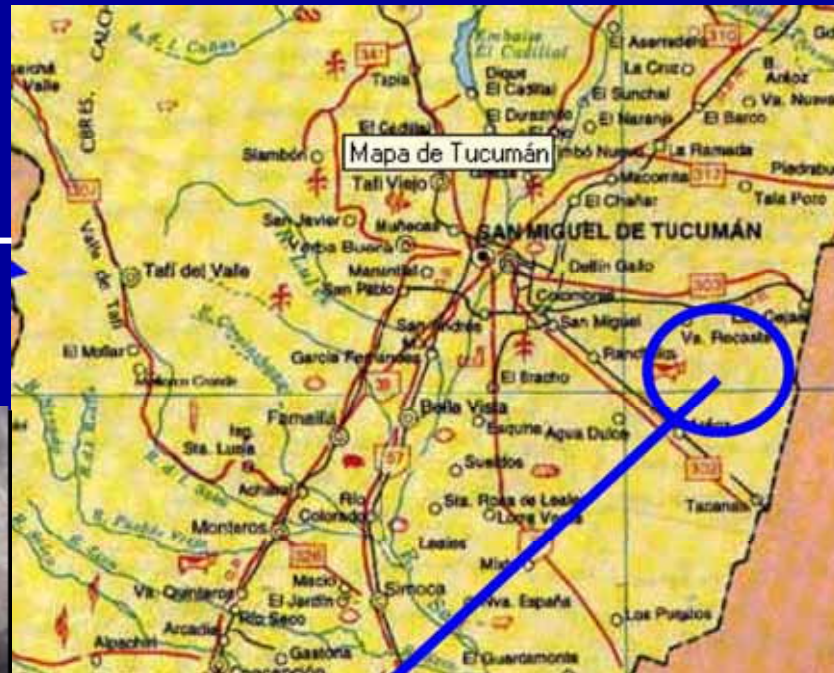
Tucumán, ARG



(M. Blesa et al.)

Ensayos in situ (Argentina)

50 Km



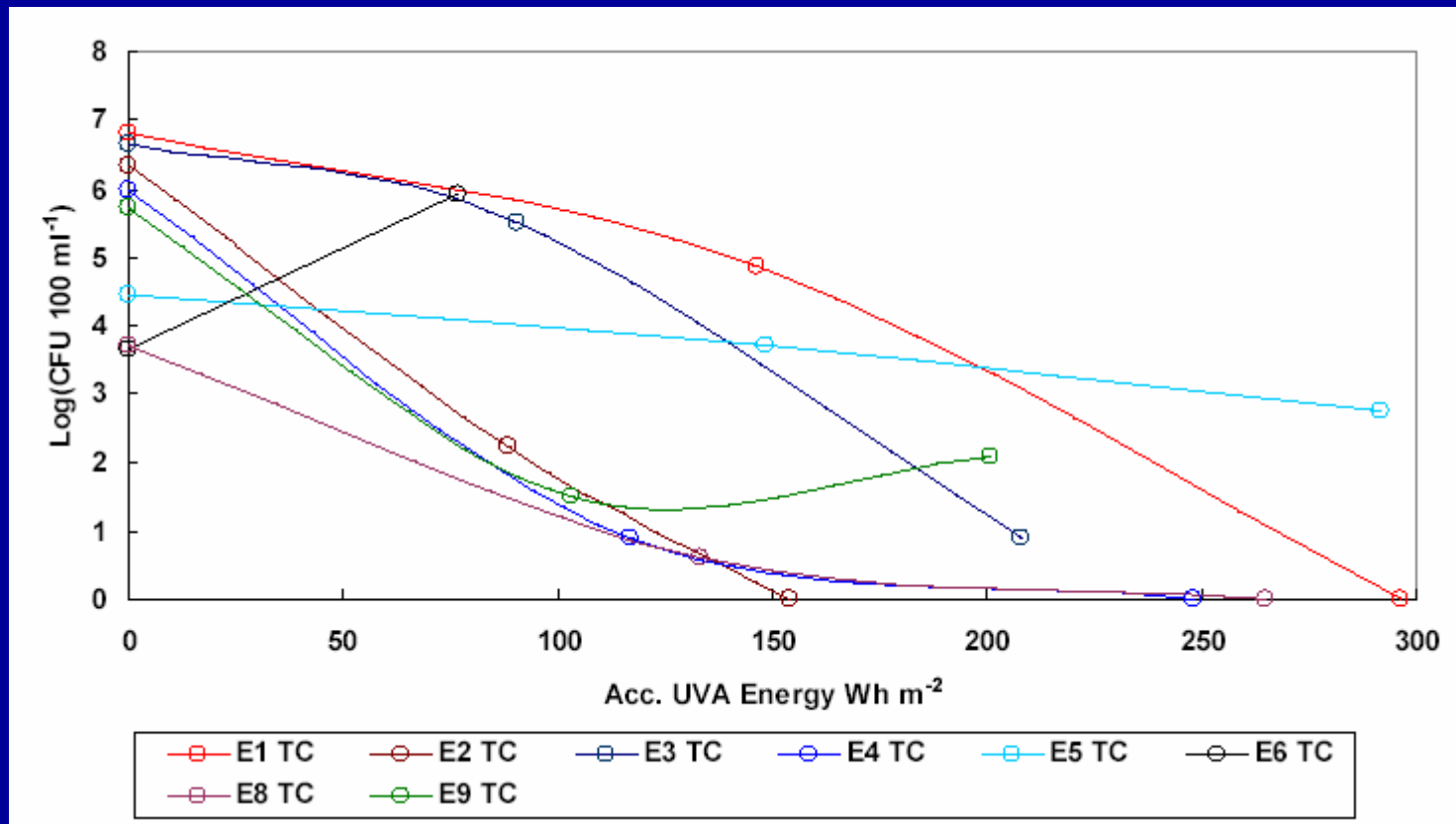
Los Pereyra, granja de la familia Amaya



(M. Blesa et al.)

Ensayos in situ (Argentina)

Coliformes totales vs. energía UV-A acumulada



(M. Blesa et al.)



CONCLUSIONES

- Se ha demostrado la viabilidad de la desinfección bacteriana (2-3 ordenes de magnitud en la reducción de bacterias) en **agua** con **sensibilizadores** de **Ru(II)** soportados en **polímeros** (silicona porosa) y **luz solar** utilizando *E. Coli* y *E. Faecalis* a niveles 10^2 - 10^4 CFU/mL.
- La **desinfección** de agua sólo se consigue cuando la dosis de luz excede $0.8 \text{ MJ m}^{-2} \text{ L}^{-1}$.
- El colector solar de **aletas** parece ser más eficiente para la inactivación bacteriana que el de disposición **coaxial**.
- La combinación de fotocátalisis con **TiO₂** soportado sobre papel y la fotosensibilización de **¹O₂** permite realizar la **desinfección** de bacterias coliformes y fecales en aguas naturales sin que se observe *recrecimiento bacteriano tras 24-48 h.*



Agradecimientos

- Prof. D. García Fresnadillo
- Dr. M. E. Jiménez-Hernández, Dr. P. Ramiro, Dr. D. E. Wetzler
- M. L. Contreras, F. Manjón, F. Méndez, J. Navalón, O. Seco and L. Villén
- Y. Almonacid

- **Ministerio español de Ciencia y Tecnología**

(PPQ2000-0778-C02-01)

- **Comunidad Autónoma de Madrid (CAM)**

(07M/0082/2000)

- **Carburos Metálicos-Air Products**

- **Unión Europea**

(V FP-INCO ICA4-CT-2001-10022 and ICA3-CT-2002-10028)

<http://www.psa.es/webeng/solwater/index.html>



The UCM Laboratory of Applied Photochemistry

Synthesis of photosensitizing dyes



Characterization of photosensitizers

1O_2 disinfection

Microbiology

