



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO MIXTO DE TECNOLOGÍA
QUÍMICA (UPV-CSIC)

TESIS DOCTORAL:

Síntesis y caracterización de nuevos fotocatalizadores
heterogéneos para degradación de contaminantes y/o desinfección
en medio acuoso

JENNY FLORES GARCIA

DIRECTORES:

Dra. Ma. Luisa Marín García

Dr. Francisco Bosca Mayans

Dra. Ma. Del Pilar Moya Sanz

Valencia, noviembre, 2023

AGRADECIMIENTOS

La culminación de esta tesis no fue tarea de una sola persona, por lo cual en estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que estuvieron involucradas en este proyecto.

A mis directores de tesis Ma. Luisa Marín García, Francisco Bosca Mayans y Ma. Del Pilar Moya por la ayuda y comprensión en periodos difíciles durante mi doctorado, por el lugar de trabajo y culminación de esta tesis doctoral.

Quiero agradecer especialmente a mis padres por el apoyo incondicional en cada una de mis decisiones en la vida y por ayudarme a llegar hasta este punto de mi vida que sin su apoyo no hubiera sido posible.

También quiero agradecer profundamente a las personas que fueron parte importante de este periodo y que se convirtieron en personas importantes en mi vida, empezando con Luciana porque fue una de las personas que me brindo una bonita amistad, comprensión, una familia, ayuda y apoyo incondicional durante y después de mi último periodo en Valencia y que siempre me alentó a seguir adelante. A Fabiana y Andrea, que, aunque no hablábamos el mismo idioma en un inicio, me demostraron siempre su calidez y su sincera amistad, gracias por todos esos bonitos recuerdos. A Rocío que nos conocimos en un periodo muy corto, pero se convirtió en una gran amiga. También quiero agradecer a Ildé y Gara por hacer un ambiente tranquilo y de compañerismo en el laboratorio, la paciencia, la ayuda, la bonita amistad y las risas en el laboratorio.

Esta tesis doctoral ha recibido financiación del programa de BECAS CONACYT-GOBIERNO DEL ESTADO DE HIDALGO, MÉXICO 2018 con el número de becario; 714508, y al Ministerio de Ciencia e Innovación de España (PID2019-110441RBC33 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033).



Índice

RESUMEN.....	7
SUMMARY	10
RESUM	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 La contaminación del agua y escasez.....	18
1.2 Aguas urbanas	19
1.3 Agua residual industrial.....	19
1.4 Agua residual de la industria farmacéutica.....	20
1.5 Tratamientos convencionales de aguas residuales de la industria farmacéutica	20
1.6 Procesos de oxidación avanzada.....	21
1.7 Fotocatálisis mediada por semiconductores	23
1.8 Fotocatálisis mediada por sensibilizadores orgánicos	25
1.9 Rosa de Bengala utilizado en el proceso de fotocatálisis	29
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Reactivos	35
3.2 Síntesis de fotocatalizadores.....	36
3.3 Fotodegradaciones	39
3.4 Determinación química de $^1\text{O}_2$	41
3.5 Determinación de la carga de RB en fibras de poliamida	41
3.6 Equipos	43
3.7 Técnicas microbiológicas	47
4. RESULTADOS	53
CAPÍTULO I.....	53

4.1 Fotorreactividad de nuevos fotocatalizadores heterogéneos de Rosa de Bengala-SiO ₂ con y sin núcleo de magnetita para la degradación de fármacos y la desinfección de aguas.	53
Introducción.....	53
Resultados y discusión	55
Conclusiones.....	87
CAPÍTULO II.....	89
4.2 Síntesis y caracterización de micropartículas de SiO ₂ -RB y Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -RB para la degradación de fármacos en aguas	89
Introducción.....	89
Resultados y discusión	90
Conclusiones.....	102
CAPÍTULO III	103
4.3 Evaluación del porcentaje óptimo de Rosa de Bengala en tejidos de Poliamida para la fotoinactivación de bacterias Gram positivas con luz visible.....	103
Introducción.....	103
Resultados y discusión	105
Conclusiones.....	120
CAPÍTULO IV	121
4.4 Síntesis, caracterización y evaluación de la lana de vidrio con Rosa de Bengala para la desinfección de aguas residuales urbanas.....	121
Introducción.....	121
Resultados y discusión	122
Conclusiones.....	131
5. CONCLUSIONES GENERALES	133
6. REFERENCIAS	137

RESUMEN

En los últimos años, la detección de un número creciente de contaminantes xenobióticos en los sistemas acuáticos ha traído como consecuencia efectos nocivos en los ecosistemas, así como en la salud humana. Los procesos de oxidación avanzada como la fotocatalisis heterogénea están recibiendo una gran atención debido a su eficiencia, bajo costo, fácil recuperación de los catalizadores, además de ser ecoamigables. Los mecanismos involucrados en este tipo de procesos son muy complejos y no están completamente establecidos.

En este contexto, el objetivo de esta tesis fue sintetizar nuevos fotocatalizadores sólidos basados en la heterogeneización del Rosa de Bengala (RB) con el propósito de obtener materiales con propiedades fotocatalíticas mejoradas respecto a las del colorante orgánico en medio homogéneo, lo cual, además permitía poder recuperar y reutilizar con facilidad el fotocatalizador. Para ello, el RB como sustancia fotoactiva se unió mediante diferentes procesos sintéticos a varios soportes sólidos. Así, una parte de los nuevos fotocatalizadores heterogéneos sintetizados estaban formados por RB unida covalentemente a diferentes materiales de óxido de sílice. Unos eran los formados por nano y microesferas de sílice con y sin núcleos de magnetita recubiertos por el colorante y otros eran de lana de vidrio revestida también covalentemente con el colorante. Además, también se sintetizaron fotocatalizadores heterogéneos usando como soporte sólido fibras de poliamida, aunque en este caso el RB se unió iónicamente a dicho material. Una vez sintetizados los nuevos materiales fotocatalíticos, estos fueron caracterizados por diferentes técnicas incluyendo la microscopía electrónica y la espectroscopía de absorción. Posteriormente, se estudiaron las propiedades fotocatalíticas de cada material en procesos de descontaminación y/o desinfección, así como las propiedades fotofísicas y fotoquímicas que presentaba el colorante asociado a cada uno de los diferentes materiales. Para los estudios de fotodescontaminación se usaron compuestos tóxicos y persistentes en el agua como antiinflamatorios no esteroideos, el diclofenaco y el acetaminofeno, así como el ofloxacino, un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas. La capacidad fotocatalítica de los materiales para desinfección de aguas se evaluó usando cepas bacterianas Gram positivas (*E. faecalis*) y negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). En cuanto a los estudios fotofísicos y fotoquímicos se realizaron estudiando la reactividad del estado excitado singlete y triplete del RB en estos catalizadores frente a los contaminantes y al

oxígeno molecular. Para ello se usaron técnicas como la espectroscopía de emisión en estacionario y en tiempo resuelto, así como la de fotólisis de destello láser.

A continuación, se resumen los Capítulos que conforman esta tesis doctoral, destacando los resultados más significativos de cada uno:

En el Capítulo I de esta tesis, se sintetizaron dos nuevos fotocatalizadores heterogéneos nanoestructurados de sílice con y sin núcleo de magnetita que incorporan covalentemente RB en su superficie. Ambos mostraron ser capaces de producir la fotodegradación de diclofenaco (DCF), acetaminofeno (ACF) y ofloxacino (OFX), bajo irradiación con luz visible. También se analizaron todas las constantes de reacción de los procesos que intervienen en la degradación de los tres fármacos, lo cual ayudó a establecer que el paso inicial de sus oxidaciones se debía producir mediante procesos de transferencia electrónica entre RB y los tres fármacos, además se pudo establecer que este mecanismo era el predominante tanto en disoluciones homogéneas como usando estos nanofotocatalizadores heterogéneos. Adicionalmente, estos fotocatalizadores también mostraron tener una gran eficacia en la fotoinactivación de bacterias Gram positivas. El efecto que se observó en estos materiales por la presencia del núcleo de magnetita fue principalmente físico ya que ayudaba a su recuperación mediante campos magnéticos y producía un aumento de la concentración de RB en la superficie. Por otra parte, también se pudo observar que, aunque aparentemente el RB conservaba sus propiedades fotofísicas en los materiales heterogéneos, el RB soportado tenía una mayor fotoestabilidad que en homogéneo.

En el Capítulo II, se sintetizaron dos fotocatalizadores heterogéneos con recubrimiento de RB unido covalentemente a la superficie de micropartículas de sílice con y sin núcleo de magnetita. Las micropartículas de sílice se caracterizaron mediante técnicas de microscopía electrónica comprobando su morfología esférica y su núcleo magnético, y demostrando la presencia de RB por espectroscopía de absorción. Las micropartículas de sílice con RB demostraron una gran eficiencia en la eliminación de DCF en medio acuoso bajo irradiación de luz visible, mientras que las micropartículas de sílice con RB y núcleo de magnética no pudieron dispersarse adecuadamente en el medio acuoso lo que impidió su eficiencia en la degradación de DCF. Estas micropartículas pueden llegar a ser una gran opción para la degradación de fármacos en aguas, debido a su tamaño micrométrico que facilita su recuperación del medio de reacción después de su uso. También se observó que las propiedades fotofísicas del RB anclado a la superficie de las micropartículas de

sílice no se vieron afectadas, aunque si aumentaba la fotoestabilidad del RB sobre el fotocatalizador. Por otra parte, esos mismos estudios no pudieron realizarse con las micropartículas de RB con núcleo de magnetita debido a que su núcleo de magnetita era voluminoso y de color totalmente negro. Sin embargo, se observó que este núcleo alteraba las propiedades superficiales de estas micropartículas de RB.

En el Capítulo III, se determinó la influencia del porcentaje de RB al 0.5, 1 y 3 % (o.w.f.) soportado sobre tejidos de poliamida, para la inactivación de bacterias Gram positivas. Así se vio que el tejido teñido al 1 % de RB (o.w.f.) tenía la capacidad de fotoinactivación bacteriana más alta, siendo esta de 6 log₁₀ unidades de reducción en ufc/mL bajo luz visible a 6.75 mW/cm² en 15 min. Con ello se vio que la cantidad de RB sobre los tejidos de poliamida tiene una gran importancia. Así, una cantidad menor de RB en el tejido no era capaz de generar suficiente oxígeno singlete, mientras que en una cantidad mayor al 1% debe generar una agregación del fotosensibilizador, lo que conduce a una disminución del oxígeno singlete y a un aumento de la carga negativa neta del tejido debido al carácter aniónico del RB, lo cual genera una repulsión electrostática con las bacterias que reduce la respuesta fotodinámica antibacteriana del tejido.

Finalmente, en el Capítulo IV se sintetizó un fotocatalizador de lana de vidrio con RB anclado en su superficie para evaluar su capacidad de fotoinactivación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Para ello, primero se caracterizó el material y se evaluaron las propiedades fotofísicas por espectroscopía de fluorescencia y experimentos de fotólisis de destello láser. Así, al igual que ocurría con las microesferas de RB, se pudo determinar que las propiedades del RB no se veían afectadas en el fotocatalizador de lana de vidrio. Posteriormente, se evaluó la fotoinactivación de bacterias Gram negativas y Gram positivas a una concentración inicial de 10⁶ ufc/mL, pero solo se observó, como era previsible por los resultados de los capítulos anteriores, una significativa inactivación sobre las bacterias Gram positivas (*E. faecalis*).

Así, se ha demostrado que los fotocatalizadores heterogéneos sintetizados con RB como sensibilizador pueden ser utilizados tanto para procesos de descontaminación como para desinfección de aguas.

SUMMARY

In recent years, the detection of an increasing number of xenobiotic contaminants in aquatic systems has had harmful consequences on ecosystems, as well as on human health. Advanced oxidation processes such as heterogeneous photocatalysis are receiving great attention due to their efficiency, low cost, easy recovery of catalysts, as well as being eco-friendly. The mechanisms involved in this type of process are very complex and are not completely established.

In this context, the objective of this thesis was to synthesize new solid photocatalysts based on the heterogenization of Rose Bengal (RB) with the purpose of obtaining materials with improved photocatalytic properties with respect to those of the organic dye in homogeneous medium, and that will also allow easy recover and reuse the photocatalyst. To do this, RB as a photoactive substance was linked through different synthetic processes to various solid supports. Thus, a part of the new heterogeneous photocatalysts synthesized were formed by RB covalently linked to different silica oxide materials. Some were made up of silica nano- and microspheres with and without magnetite cores coated with the dye and others were made of glass wool also covalently coated with the dye. In addition, heterogeneous photocatalysts were also synthesized using polyamide fibers as a solid support, although in this case the RB was ionically bonded to said material. Once the new photocatalytic materials were synthesized, they were characterized by different techniques including electron microscopy and absorption spectroscopy. Subsequently, the photocatalytic properties of each material were studied in decontamination and/or disinfection processes, as well as the photophysical and photochemical properties presented by the dye associated with each of the different materials. Toxic and persistent compounds in water such as non-steroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac, and acetaminophen, as well as ofloxacin, an antibiotic of the fluoroquinolone family, were used for the photodecontamination studies. The photocatalytic capacity of the water disinfection materials was evaluated using Gram-positive (*E. faecalis*) and negative (*E. coli* and *P. aeruginosa*) bacterial strains. Photophysical and photochemical studies were carried out by studying the reactivity of the singlet and triplet excited state of RB in these catalysts against contaminants and molecular oxygen. For this purpose, techniques such as stationery and time-resolved emission spectroscopy as well as laser flash photolysis were used.

The following is a summary of the Chapters that compose this doctoral thesis, highlighting the most significant results of each one of them:

In Chapter I of this thesis, two new heterogeneous nanostructured silica nanostructured photocatalysts with and without magnetite core that covalently incorporate RB on their surface were synthesized. Both were shown to be capable of producing the photodegradation of diclofenac (DCF), acetaminophen (ACF) and ofloxacin (OFX), under visible light irradiation. All the reaction constants of the processes involved in the degradation of the three drugs were also analyzed, which helped to establish that the initial step of their oxidations should occur by electron transfer processes between the RB and the three drugs, and it was also possible to establish that this mechanism was the predominant one both in homogeneous solutions and using these heterogeneous nano-photocatalysts. In addition, these photocatalysts were also shown to have a high efficiency in the photoinactivation of Gram-positive bacteria. The effect observed in these materials due to the presence of the magnetite core was mainly physical since it helped their recovery by magnetic fields and produced an increase of the RB concentration on the surface. On the other hand, it could also be observed that, although RB apparently retained its photophysical properties in the heterogeneous materials, the supported RB exhibited a higher photostability than homogeneous RB.

In Chapter II, two heterogeneous photocatalysts with RB coating covalently bonded to the surface of silica microparticles with and without magnetite core were synthesized. The silica microparticles were characterized by electron microscopy techniques verifying their spherical morphology and magnetic core and demonstrating the presence of RB by absorption spectroscopy. The silica microparticles with RB showed high efficiency in the removal of DCF in aqueous medium under visible light irradiation, while the silica microparticles with RB and magnetic core, could not disperse adequately in the aqueous medium and therefore could not be used effectively for the DCF degradation tests.

These microparticles can become a great option for drug degradation in water, due to their micrometer size that facilitates their recovery from the reaction medium after use. It was also observed that the photophysical properties of the RB anchored to the surface of the silica microparticles were not affected, although the photostability of the RB on the photocatalyst increased. On the other hand, these same studies could not be carried out for magnetite-cored RB microparticles because their magnetite core was bulky and

completely black in color. However, it was observed that this core altered the surface properties of these RB microparticles.

In Chapter III, the influence of the percentage of RB at 0.5, 1 and 3 % (o.w.f.) supported on polyamide fabrics was determined for the inactivation of Gram-positive bacteria. Thus, it was seen that the fabric dyed at 1 % RB (o.w.f.) had the highest bacterial photoinactivation capacity, being 6 log₁₀ units of reduction in cfu/mL under visible light at 6.75 mW/cm² in 15 min. Thus, it was seen that the amount of RB on polyamide fabrics has a great importance. Since a lower amount of RB in the polyamide fabrics was not able to generate sufficient singlet oxygen, while an amount higher than 1% causes aggregation of the photosensitizer, resulting in a decrease of singlet oxygen and an increase of the net negative charge of the polyamide fabrics due to the anionic character of RB, which generates an electrostatic repulsion with bacteria that reduces the antibacterial photodynamic response of the polyamide fabrics.

Finally, in Chapter IV, a glass wool photocatalyst with RB anchored on its surface was synthesized to evaluate its ability to photo-inactivate Gram-positive and Gram-negative bacteria. For this purpose, the material was first characterized and its photophysical properties were evaluated by fluorescence spectroscopy and laser flash photolysis experiments. Thus, as in the case of RB microspheres, it could be determined that the properties of RB were not affected in the glass wool photocatalyst. Subsequently, the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria at an initial concentration of 10⁶ cfu/mL was evaluated, however, significant inactivation was only observed for the Gram-positive bacteria (*E. faecalis*), as it was predictable from the results of the previous chapters.

Thus, it has been demonstrated that heterogeneous photocatalysts with RB as sensitizer can be used for both water decontamination and/or disinfection processes.

RESUM

En els últims anys, la detecció d'un nombre creixent de contaminants xenobiòtics en els sistemes aquàtics ha portat com a conseqüència efectes nocius en els ecosistemes, així com en la salut humana. Els processos d'oxidació avançada com la fotocàlisis heterogènia estan rebent una gran atenció a causa de la seua eficiència, sota cost, fàcil recuperació dels catalitzadors, a més de ser ecoamigables. Els mecanismes involucrats en aquesta mena de processos són molt complexos i no estan completament establits.

En este context, l'objectiu d'esta tesi va ser sintetitzar nous fotocatalitzadores sòlids basats en la heterogeneització del Rosa de Bengala (RB) amb el propòsit d'obtindre materials amb propietats fotocatalítiques millorades respecte a les del colorant orgànic al mig homogeni, la qual cosa, a més permetia poder recuperar i reutilitzar amb facilitat el fotocatalitzador. Així, una part dels nous fotocatalitzadores heterogenis sintetitzats estaven formats per RB unida covalentement a diferents materials d'òxid de sílice. Uns estaven els formats per nano i microesferes de sílice amb i sense nuclis de magnetita recoberts pel colorant i altres eren de llana de vidre revestida també covalentement amb el colorant. A més, també es van sintetitzar fotocatalitzadores heterogenis usant com a suport sòlid fibres de poliamida, encara que en aquest cas el RB es va unir iònicament a aquest material. Una vegada sintetitzats els nous materials fotocatalítics, aquests van ser caracteritzats per diferents tècniques incloent la microscòpia electrònica i la espectroscòpia d'absorció. Posteriorment, es van estudiar les propietats fotocatalítiques de cada material en processos de descontaminació i/o desinfecció, així com les propietats fotofísiques i fotoquímiques que presentava el colorant associat a cadascun dels diferents materials. Per als estudis de fotodescontaminació es van usar compostos tòxics i persistents en l'aigua com a antiinflamatoris no esteroïdals, el diclofenaco i el acetaminofeno, així com el ofloxacino, un antibiòtic de la família de les fluoroquinolonas. La capacitat fotocatalítica dels materials per a desinfecció d'aigües es va avaluar usant ceps bacterians Gram positives (*E. faecalis*) i negatives (*E. coli* i *P. aeruginosa*). Quant als estudis fotofísics i fotoquímics es van realitzar estudiant la reactivitat de l'estat excitat singlete i triplet del RB en aquests catalitzadors enfront dels contaminants i a l'oxigen molecular. Per a això es van usar tècniques com l'espectroscòpia d'emissió en estacionari i en temps resol, així com la de fotòlisis de centelleig làser.

A continuació, es resumeixen els Capítols que conformen esta tesi doctoral, destacant els resultats més significatius de cadascun:

En el Capítol I d'aquesta tesi, es van sintetitzar dos nous fotocatalitzadores heterogenis nanoestructurados de sílice amb i sense nucli de magnetita que incorporen covalentement RB en la seua superfície. Tots dos van mostrar ser capaços de produir la fotodegradació de diclofenaco (DCF), acetaminofeno (ACF) i ofloxacino (OFX), sota irradiació amb llum visible. També es van analitzar totes les constants de reacció dels processos que intervenen en la degradació dels tres fàrmacs, la qual cosa va ajudar a establir que el pas inicial de les seues oxidacions s'havia de produir mitjançant processos de transferència electrònica entre RB i els tres fàrmacs, a més es va poder establir que aquest mecanisme era el predominant tant en dissolucions homogènies com usant aquests nanofotocatalitzadores heterogenis. Addicionalment, aquests fotocatalitzadores també van mostrar tindre una gran eficàcia en la fotoinactivació de bacteris Gram positives. L'efecte que es va observar en estos materials per la presència del nucli de magnetita va ser principalment físic ja que ajudava a la seua recuperació mitjançant camps magnètics i produïa un augment de la concentració de RB en la superfície. D'altra banda, també es va poder observar que, encara que aparentment el RB conservava les seues propietats fotofísiques en els materials heterogenis, el RB suportat tenia una major fotoestabilidad que en homogeni.

En el Capítol II, es van sintetitzar dos fotocatalitzadores heterogenis amb recobriment de RB unit covalentement a la superfície de micropartícules de sílice amb i sense nucli de magnetita. Les micropartícules de sílice es van caracteritzar mitjançant tècniques de microscòpia electrònica comprovant la seua morfologia esfèrica i el seu nucli magnètic, i demostrant la presència de RB per espectroscòpia d'absorció. Les micropartícules de sílice amb RB van demostrar una gran eficiència en l'eliminació de DCF al mig aquós sota irradiació de llum visible, mentre que les micropartícules de sílice amb RB i nucli de magnètica, no van poder dispersar-se adequadament en el medi aquós el que va impedir la seua eficiència en la degradació de DCF. Aquestes micropartícules poden arribar a ser una gran opció per a la degradació de fàrmacs en aigües, a causa de la seua grandària micromètrica que facilita la seua recuperació del mitjà de reacció després del seu ús. També es va observar que les propietats fotofísiques del RB ancorat a la superfície de les micropartícules de sílice no es van veure afectades, encara que si augmentava la fotoestabilidad del RB sobre el fotocatalitzador. D'altra banda, eixos mateixos estudis no

van poder realitzar-se amb les micropartícules de RB amb nucli de magnetita pel fet que el seu nucli de magnetita era voluminós i de color totalment negre. No obstant això, es va observar que aquest nucli alterava les propietats superficials d'aquestes micropartícules de RB.

En el Capítol III, es va determinar la influència del percentatge de RB al 0.5, 1 i 3% (o.w.f.) suportat sobre teixits de poliamida, per a la inactivació de bacteris Gram positives. Així es va veure que el teixit tenyit a l'1% de RB (o.w.f.) tenia la capacitat de fotoinactivació bacteriana més alta, sent aquesta de 6 log₁₀ unitats de reducció en ufc/ml sota llum visible a 6.75 mW/cm² en 15 min. Així, una quantitat menor de RB sobre els teixits de poliamida té una gran importància. Ja que una quantitat menor de RB en el teixit no era capaç de generar suficient oxigen singlete, mentre que en una quantitat major a l'1% s'ha de generar una agregació del fotosensibilizador, la qual cosa condueix a una disminució de l'oxigen singlete i a un augment de la càrrega negativa neta del teixit degut al caràcter aniònic del RB, la qual cosa genera una repulsió electroestàtica amb els bacteris que redueix la resposta fotodinàmica antibacteriana del teixit.

Finalment, en el Capítol IV se sintetitza un fotocatalizador de llana de vidre amb RB ancorat en la seua superfície per a avaluar la seua capacitat de fotoinactivació de bacteris Gram positives i Gram negatives. Per a això, primer es va caracteritzar el material i es van avaluar les propietats fotofísiques per espectroscòpia de fluorescència i experiments de fotólisis de centelleig làser. Així, igual que ocorria amb les microesferes de RB, es va poder determinar que les propietats del RB no es veien afectades en el fotocatalizador de llana de vidre. Posteriorment, es va avaluar la fotoinactivació de bacteris enfront de Gram negatives i Gram positives a una concentració inicial de 10⁶ ufc/ml, però només es va observar, com era previsible pels resultats dels capítols anteriors, una significativa inactivació sobre els bacteris Gram positives (*E. Faecalis*).

Així, s'ha demostrat que els fotocatalizadores heterogenis sintetitzats amb RB com a sensibilizador poden ser utilitzats tant per a processos de descontaminació com per a desinfecció d'aigües.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente en todo el mundo se enfrenta un grave problema por la disminución en la disponibilidad de agua originado principalmente por el crecimiento acelerado de poblaciones e industrias, que aumentan la demanda de extracción y consumo de agua trayendo como consecuencia la contaminación de la misma [1]. Un contaminante del agua es cualquier sustancia que interfiere con un uso específico de la misma, ya sea para uso doméstico, industrial o para consumo humano [2]. En los ecosistemas acuáticos, uno de los problemas más actuales es el representado por los contaminantes emergentes, compuestos de origen antropogénicos presentes en las aguas naturales a concentraciones de micro y nanogramos. Esos compuestos pertenecen a clases de compuestos químicos muy diferentes como por ejemplo clorofenoles, antibióticos, pesticidas, herbicidas y compuestos de interés industrial [3,4]. La presencia de este tipo de contaminantes junto a la presencia de microorganismos en cuerpos de agua puede llegar a causar enfermedades transmitidas por el agua [5]. Entre las enfermedades más comunes causadas por agua contaminada se incluyen disentería, gastroenteritis, colera, fiebre tifoidea y diarreas agudas [6]. La exposición a agua potable contaminada es una de las principales causas de muerte en Europa y la segunda en todo el mundo, con aproximadamente 17 millones de muertes anuales. Según los informes, los principales microorganismos patógenos son *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*, [7,8] y se propagan principalmente a través de los desechos humanos y animales [9]. La importancia de la desinfección del agua se ha considerado una preocupación mundial, relacionada principalmente con la protección del medio ambiente y la salud humana [10].

1.1 La contaminación del agua y escasez

El agua dulce, es un recurso fundamental para el bienestar humano y el medio ambiente, además de ser considerado como el recurso natural más importante en el mundo. El 97% del agua de nuestro planeta existe como agua de mar y el 3% es agua dulce. De este porcentaje de agua dulce, alrededor de un 79% se encuentra en forma de glaciares, el 20% es agua subterránea y únicamente el 1% se encuentra disponible para uso humano [11].

La gestión de los recursos hídricos en muchas regiones áridas y semiáridas del planeta ha sido un gran reto durante mucho tiempo debido a los problemas de escasez de agua. Asociado a esto, el desarrollo intensivo a nivel industrial y urbano, acompañado de un gran crecimiento de la población, especialmente en las ciudades, ha provocado una fuerte presión sobre los recursos hídricos locales. Además, el cambio climático compromete aún más la calidad y disponibilidad del agua para el suministro a diferentes poblaciones, así como el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, lo que aumenta la necesidad de encontrar soluciones sostenibles a este problema [12].

Una de las principales causas de la escasez de agua es su contaminación, siendo los sectores que contaminan el agua dulce principalmente el industrial, el municipal, el agrícola y el ganadero, por lo que se debe tener un control de la contaminación generada por estos sectores. Particularmente, la industria genera una mayor carga de residuos contaminantes respecto a la carga de residuos en las aguas residuales municipales, dificultando su proceso de remediación en las plantas de tratamiento [13]. La reutilización de aguas residuales tratadas es una de las prácticas más prometedoras para que el problema de la escasez sea abordado a fondo. El reúso del agua residual tiene la capacidad de estimular la economía local, convirtiéndose en una estrategia satisfactoria para garantizar la estabilidad socioeconómica y política en los países [14].

1.2 Aguas urbanas

La gestión de los sistemas de aguas urbanas se encuentra amenazada principalmente por el desarrollo y crecimiento de la población y su urbanización; a su vez también existe la preocupación por el cambio climático que causa un suministro de agua irregular y a menudo insuficiente para una población, incluso en lugares que normalmente no se ven afectados por la escasez de agua. En los países desarrollados, los sistemas de gestión de aguas urbanas incluyen sistemas de suministro de agua centralizados, redes de alcantarillado e instalaciones de tratamiento de agua en grandes escalas, lo que implica tener un mayor control y gestión de sus servicios, contribuyendo así a la salud pública [15]. Sin embargo, en la actualidad la capacidad de las plantas de tratamiento de aguas suele ser insuficiente para hacer frente a la gestión de estos residuos, teniendo como consecuencia un tratamiento inadecuado de los residuos y obteniendo efluentes que pueden llegar a contribuir al deterioro de la calidad ambiental, sobre todo en los ecosistemas acuáticos [16]. Las aguas residuales de origen urbano no son la única preocupación ambiental; particularmente, la industrialización ha contribuido al agotamiento de los recursos naturales y principalmente del agua, por lo que existe la necesidad de que las industrias garanticen un tratamiento adecuado a sus efluentes antes de ser vertidos directamente en ecosistemas acuáticos [17].

1.3 Agua residual industrial

El desarrollo industrial suele estar relacionado con el uso de grandes volúmenes de agua dulce para su producción a gran escala, por lo que las industrias tienen el compromiso de trabajar en la preservación del medio ambiente tratando sus efluentes generados, de forma adecuada, en plantas de tratamiento de aguas [1]. Un sistema industrial sostenible busca minimizar el consumo de energía y el uso de materias primas y reducir los residuos adoptando políticas económicas, ecológicas y sociales sostenibles [18].

Un tratamiento incorrecto de aguas industriales llega a liberar diversos tipos de contaminantes, principalmente de origen químico, que pueden llegar a ser persistentes y tóxicos para el medio ambiente [19]. Por lo tanto, la identificación de las posibles fuentes contaminantes se ha convertido en algo fundamental para su control y tratamiento [20].

1.4 Agua residual de la industria farmacéutica

La industria farmacéutica se encuentra entre las cinco principales industrias más importantes de la economía mundial. La fabricación de sus productos necesita suministros constantes de agua de alta calidad para diversos procesos que al mismo tiempo generan grandes cantidades de desechos. Estas aguas residuales contienen altas concentraciones de compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos, biodegradables y no biodegradables junto con residuos farmacéuticos, por ejemplo, compuestos aromáticos policíclicos, benceno y elementos heterocíclicos [21].

Los efluentes procedentes de la industria farmacéutica contienen niveles entre 5000 y 80,000 mg/L de DQO (Demanda Química de Oxígeno), es por ello que para cada tipo de efluente proveniente de este tipo de industrias se necesita un tratamiento específico, ya que sus aguas residuales pueden contener, dependiendo de su producción, contaminantes orgánicos, antibióticos, antifímicos, antihistamínicos y analgésicos [22]. Para reducir el impacto ambiental y cumplir con las demandas de los límites de descarga reglamentarios cada vez más estrictos se han implementado diversas opciones de tratamiento [23].

1.5 Tratamientos convencionales de aguas residuales de la industria farmacéutica

Los efluentes de la industria farmacéutica son tratados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, sin embargo, muchos de los compuestos que se encuentran en estas aguas no son biodegradables y, además de pertenecer al grupo de los llamados contaminantes emergentes, son difíciles de eliminar de manera eficiente mediante tratamientos primarios, secundarios y terciarios [24].

Las técnicas más comunes de tratamiento que se han aplicado en las aguas de la industria farmacéutica son [21,25–29]:

- Tratamientos físico-químicos; cloración, adsorción por carbón activado.
- Tratamientos biológicos; 1) Tratamientos aeróbicos por biorreactores de membrana y lodos activados convencionales, 2) Procesos anaeróbicos por

reactores de digestión de manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente, reactor por lotes de secuenciación y biorreactores de membrana, 3) Sistemas híbridos, aeróbico y anaeróbico.

- Procesos de oxidación avanzada; oxidación electroquímica, ozonización, fotofenton y fotocatalisis.
- Procesos combinados de oxidación avanzada y tratamientos biológicos; ozonización y tratamientos anaeróbicos por biorreactores de membrana, electroflotación y reactor por lotes de secuenciación y fenton-lodos activados convencionales.

1.6 Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (POA) son tecnologías basadas en la intermediación del radical hidroxilo (con un tiempo de vida media de *ca.* 2 μ s, [30]) y otros radicales como el radical sulfato ($\text{SO}_4^{\cdot-}$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ion ferrato (FeO_4^{2-}) y radical ozono ($\text{O}_3^{\cdot-}$) para oxidar compuestos recalcitrantes, no biodegradables y tóxicos. Además los POA son considerados como los métodos más efectivos para el tratamiento de aguas contaminadas [31–33].

Entre los procesos de oxidación avanzada utilizados para la eliminación de contaminantes en medios acuáticos se pueden encontrar diversos procesos como [34]:

- Proceso Fenton: El proceso consta de una mezcla de peróxido de hidrógeno y sal ferrosa, que genera radicales hidroxilo (HO^{\cdot}) y se aplica de manera eficiente en la eliminación de compuestos orgánicos en las aguas residuales. Los radicales hidroxilo son reactivos electrófilos que reaccionan rápidamente y de forma no selectiva con todos los contaminantes orgánicos ricos en electrones, con un potencial de oxidación de 2.8 V [35]. Dentro del proceso fenton se pueden encontrar también procesos combinados como foto-fenton, fenton-ozono, electro-fenton, entre otros [36].
- Ozono: El tratamiento con ozono (O_3) para el agua potable generalmente cumple con la desinfección, eliminación de sabores y olores, así como la degradación de contaminantes [37]. Es un poderoso oxidante que reacciona en el agua

directamente con productos químicos con un potencial de oxidación de 2.07 V y que puede generar especies radicales como el OH^\bullet que es mucho más reactivo. El tratamiento con ozono puede mejorar asociándose con luz UV (ultravioleta) o peróxido de hidrógeno [38]. El uso del ozono al tratar aguas está limitado por dos factores; 1) la solubilidad y 2) la variación cinética de sus reacciones [39].

- Luz ultravioleta de tipo C: La irradiación UVC ($\lambda=254$ nm) actúa como desinfectante y al combinarse con oxidantes activos como el peróxido, el persulfato y el cloro, se generan radicales altamente reactivos (OH^\bullet , Cl^\bullet , $\text{SO}_4^{\bullet-}$) capaces de eliminar contaminantes orgánicos, y de inactivar genes de resistencia a antibióticos del agua potable, aguas residuales y aguas de reúso [40–42].
- Ultrasonidos: Las ondas sonoras de baja frecuencia generan cavitaciones que favorecen la degradación de contaminantes orgánicos presentes en aguas residuales, debido al ataque de los radicales hidroxilo generados por la disociación térmica de agua y las moléculas de oxígeno disueltas [43]. Primero, el contaminante puede sufrir degradación térmica dentro de la cavidad y en la región interfacial (cavidad-líquido). En segundo lugar, los radicales libres (principalmente el radical OH^\bullet), formados debido a la termólisis del agua, pueden reaccionar con el contaminante en la región interfacial o en la solución [44–46].
- Electrofotocatálisis: La oxidación electrofotocatalítica se usa para aumentar la eficiencia fotocatalítica durante la degradación de contaminantes orgánicos. El proceso se produce al aplicar un potencial de polarización a través de un fotoánodo sobre el que se coloca el catalizador, la corriente es aplicada por un potenciostato, mientras que el fotoelectrodo es irradiado con luz ultravioleta o visible, logrando que bajo un potencial externo de polarización positiva permita una mejor separación y minimización de cargas (e^-/h^+), debido al proceso de recombinación competitiva [47–49].
- Electroquímica: La electroquímica ha logrado grandes avances en el tratamiento de aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos, brindando soluciones limpias, de bajo precio y fáciles de controlar [50]. La oxidación electroquímica de

contaminantes orgánicos para el tratamiento de aguas se lleva a cabo de manera directa e indirecta; de manera directa la transferencia de electrones sucede en la superficie del electrodo sin ninguna participación de otras sustancias y de manera indirecta los contaminantes inorgánicos se oxidan a través de la mediación de algunas especies electroactivas generadas en la superficie del ánodo, actuando como intermediarios para el transporte de electrones y la oxidación de los compuestos orgánicos [51,52].

- Fotocatálisis: Es una técnica compleja que implica procesos fotofísicos y fotoquímicos. Un semiconductor o fotocatalizador se comporta como un material fotoactivo [53]. En el proceso de fotocatálisis, se llevan a cabo dos reacciones: 1) la oxidación de moléculas de agua absorbidas de forma disociativa, y 2) la reducción de aceptores de electrones por electrones fotogenerados, conduciendo ambas reacciones a la producción de especies reactivas de oxígeno, como radicales hidroxilo y radicales anión superóxido [54]. Los procesos fotocatalíticos pueden llevarse a cabo en fase homogénea y heterogénea. En la fotocatálisis homogénea, los reactivos y el fotocatalizador se encuentran en la misma fase, mientras que en los procesos heterogéneos se encuentran en fases separadas [55]. Dado que la fotocatálisis es la parte de esta Tesis Doctoral en las siguientes secciones se va a desarrollar con más detalles este concepto. Se ha prestado especial atención en los procesos de fotocatálisis debido a sus eficiencias en la eliminación de contaminantes en aguas, con particular atención en los procesos de fotocatálisis en fase heterogénea ya que hacen posible la recuperación de los materiales después del proceso de tratamiento representando una solución tecnológica respetuosa con el medio ambiente [56].

1.7 Fotocatálisis mediada por semiconductores

La fotocatálisis es definida como la aceleración de una transformación fotoquímica por la acción de un catalizador [57]. Es un método ideal debido a su alta eficiencia, bajo consumo de energía y respetuoso con el medio ambiente, ya que las condiciones de reacción fotocatalítica incluyen principalmente la irradiación de luz solar (luz visible y luz ultravioleta). Se ha presentado un particular interés en los materiales y sistemas que

utilizan luz visible y solar debido a su bajo consumo de energía de 17 kW·h /kg de DQO eliminado, logrando rendimientos suficientemente altos. Se ha demostrado que la combinación entre dos tecnologías como la de adsorción y fotocatalisis puede mejorar el efecto de degradación de los contaminantes [58,59].

Las tasas de rendimiento dentro de los procesos fotocatalíticos dependen de factores como el flujo de luz incidente, la longitud de onda, la longitud de absorción a través del agua, la hidrodinámica y geometría del reactor, la solubilidad de los fotocatalizadores en el agua y, principalmente, la velocidad de reacción con los contaminantes y la inactivación de patógenos [60].

Los procesos heterogéneos comprenden al menos siete pasos; 1) El transporte del contaminante hasta la superficie del fotocatalizador; 2) la difusión del contaminante hasta el sitio activo; 3) la adsorción del contaminante; 4) la absorción de un fotón con la energía necesaria para estimular el material semiconductor; 5) la desorción de los productos de degradación; 6) la difusión de los productos hasta la superficie del fotocatalizador, y por ultimo; 7) el transporte de los productos generados hasta el seno del fluido [61,62].

La fuente de luz es un factor importante para estos procesos que involucran fotones, ya que conlleva una gran influencia en los gastos de operación y mantenimiento. Clásicamente se han utilizado fuentes de luz convencionales como lámparas de mercurio (con irradiación en el rango de luz UV, Figura 1), lámparas fluorescentes y lámparas de arco de Xe (con irradiación en el rango de luz visible, Figura 1) y actualmente se ha incrementado el uso de dispositivos LED debido a que cuentan con un bajo consumo de energía, un largo tiempo de vida útil y espectros de emisión de luz estrechos [63]. Para aprovechar aún más la luz solar en la región visible, se han utilizado colorantes orgánicos como fotocatalizadores [64].

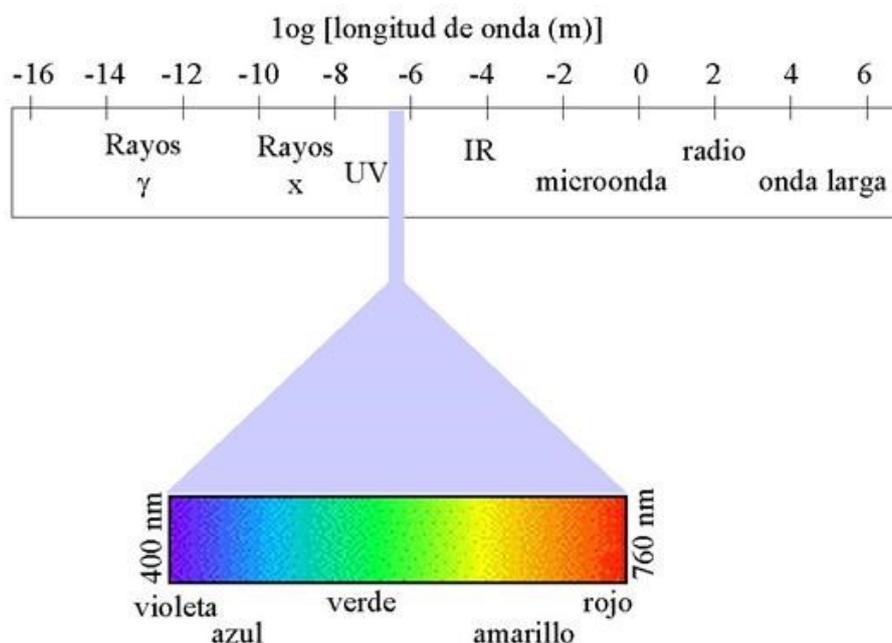


Figura 1. Espectro de frecuencias y longitud de onda.

1.8 Fotocatálisis mediada por sensibilizadores orgánicos

El mecanismo de funcionamiento de fotocatalizadores funcionalizados con sensibilizadores orgánicos, comienza con la absorción de un fotón por parte del sensibilizador, que después de haber alcanzado su primer estado excitado singlete, puede desactivarse por vías diferentes. Una de esas vías es el cruce entre sistemas (ISC) que transforman el estado singlete en triplete, el cual tiene un tiempo de vida relativamente largo y puede desactivarse mediante dos mecanismos de acción fotodinámica: tipo I y tipo II [65]. En el tipo I se produce una fotooxidación radicalaria del sustrato por transferencia de un electrón al estado excitado triplete del fotosensibilizador, formando un radical anión del fotosensibilizador y un radical catión del sustrato. En el tipo II, la transferencia de energía desde el estado triplete del fotosensibilizador al oxígeno molecular genera oxígeno singlete lo cual reacciona con el sustrato produciendo su fotooxidación (Figura 2) [66,67].

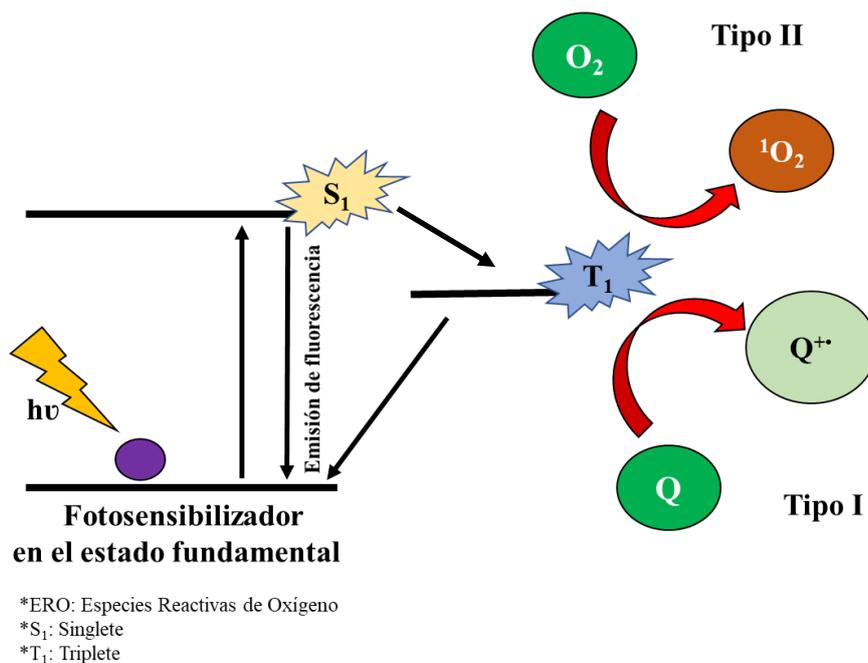


Figura 2. Diagrama de las reacciones tipo I y II de un fotosensibilizador modificada a partir de Kwiatkowski et al. 2018 [67].

Uno de los inconvenientes de los fotocatalizadores orgánicos radica en que tienen que retirarse del medio tras su reacción.

Los fotosensibilizadores soportados en semiconductores o materiales inorgánicos consisten principalmente en el anclaje de un sensibilizador orgánico sobre la superficie del fotocatalizador. Actualmente se están utilizando diversos soportes como por ejemplo, el TiO₂ [68,69], el ZnO [70], zeolitas [71] y el SiO₂ [4,72,73]. Más recientemente, nuevos materiales como los nitruros de carbono gráfiticos poliméricos que absorben la luz visible [74], nitruro de carbono gráfitico co-dopado con fósforo y azufre decorado con Ag₃VO₄ [75], fotocatalizador BiOI/Fe₃O₄@óxido de grafeno ternario [76], o puntos cuánticos de carbono soportados por AgI /ZnO/nitruro de carbono gráfitico dopado con fósforo [77], entre otros, han sido reportados como fotocatalizadores heterogéneos híbridos con buena eficiencia en descontaminación y desinfección. Además, los fotocatalizadores soportados se pueden recuperar fácilmente después de la reacción, lo que permite operar en un modo continuo y así reciclar el fotocatalizador para un posible reúso [3,78].

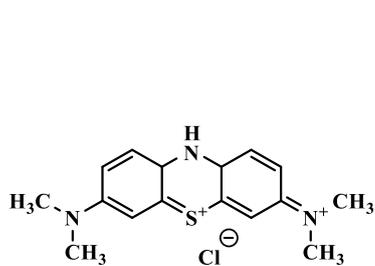
Diversos grupos de moléculas que absorben en el UV-vis han mostrado tener la capacidad de generar oxígeno singlete: Sin embargo, para ser candidatos útiles como fotosensibilizadores, deben contar con las siguientes características [79]:

- 1) Alto coeficiente de absorción en la región espectral de la luz de excitación.
- 2) Un estado de triplete de energía adecuada para llevar a cabo una transferencia de energía eficiente al oxígeno en estado fundamental.
- 3) Un alto rendimiento cuántico de deformación de su estado triplete y con un tiempo de vida bastante largo ($\tau_T > 1 \mu s$).
- 4) Alta fotoestabilidad.

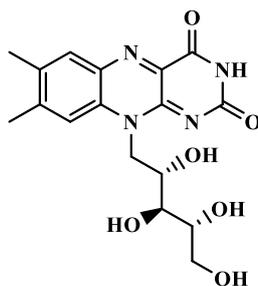
Los colorantes utilizados como fotocatalizadores deben ser resistentes durante el proceso fotocatalítico tener una carga de colorante óptima para la generación de radicales. Antes de su oxidación, un fotosensibilizador ideal debe generar de 10^3 a 10^5 moléculas de oxígeno singlete [79].

Se han utilizado diferentes tipos de fotosensibilizadores para la degradación y desinfección de aguas residuales como, por ejemplo (Figura 3):

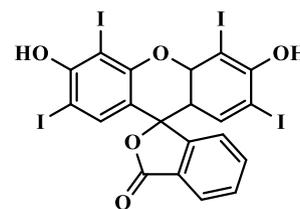
- Derivados de fenotiazinas como el Azul de metileno que es un fotosensibilizador compuesto por dos anillos de benceno unidos por un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre, con una fuerte absorción entre 630-680 nm capaz de generar 1O_2 [80,81].
- Derivados de Riboflavina (vitamina B2), capaces de generar 1O_2 tras ser irradiada típicamente entre 350-470 nm con rendimientos cuánticos de oxígeno singlete (Φ_Δ) entre 0.7 y 0.8 [82].
- Derivados de Xantona como la Eritrosina B, Eosina Y, Rodamina B y Rosa de Bengala, utilizadas por su alto coeficiente de absorción en la región visible con un máximo de absorción en 480-550 nm; los rendimientos cuánticos de oxígeno singlete se encuentran entre 0.6 y 0.8 dependiendo del disolvente [83–87].



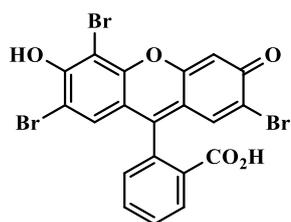
Azul de Metileno



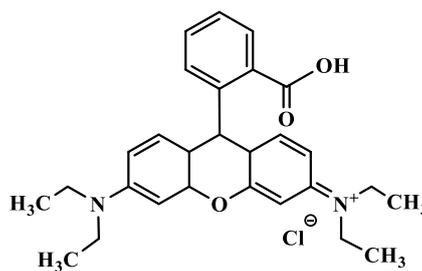
Riboflavina



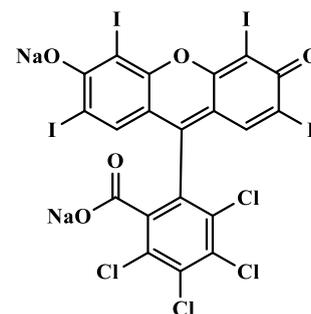
Eritrosina B



Eosina Y



Rodamina B



Rosa de Bengala

Figura 3. Estructuras de diferentes colorantes orgánicos.

El Rosa de Bengala, en específico, es un colorante ampliamente utilizado como fotosensibilizador para la degradación de contaminantes farmacéuticos, así como en la desinfección de aguas residuales [88].

1.9 Rosa de Bengala utilizado en el proceso de fotocatalisis

El Rosa de Bengala (RB) es un compuesto orgánico formado por un anillo de xanteno sustituido en la posición C9 por un ácido tetraclorobenzoico; estos dos restos tienen una orientación casi ortogonal que los hace aproximadamente independientes (Figura 4). La molécula original de RB se puede desprotonar en el hidroxilo C3 y en el carboxilo del ácido tetraclorobenzoico para obtener diferentes sales. La forma más utilizada de RB es su sal disódica [89].

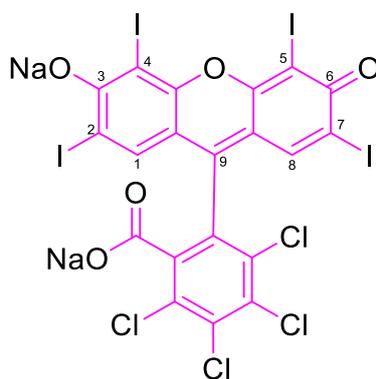


Figura 4. Estructura química del Rosa de Bengala (sal disódica).

RB cuenta con un gran coeficiente de absorción en la región visible (480-550 nm), alto rendimiento cuántico en la generación de oxígeno singlete ($\Phi_{\Delta} = 0.76$ en agua) y una alta tendencia a producir un estado excitado triplete fotoquímicamente activo, por lo que su estado triplete excitado se desactiva eficientemente con oxígeno [90,91].

El proceso de fotocatalisis con Rosa de Bengala aplicado al tratamiento de aguas contaminadas para generar especies oxidantes y eliminar contaminantes emergentes, se puede llevar a cabo por el mecanismo de tipo I y II, dependiendo de la interacción del contaminante con el fotosensibilizador [66].

Por otro lado, el RB se ha utilizado también en la eliminación de microorganismos patógenos en aguas, actuando preferentemente por el mecanismo de tipo II para la eliminación de bacterias (Figura 5) [92].

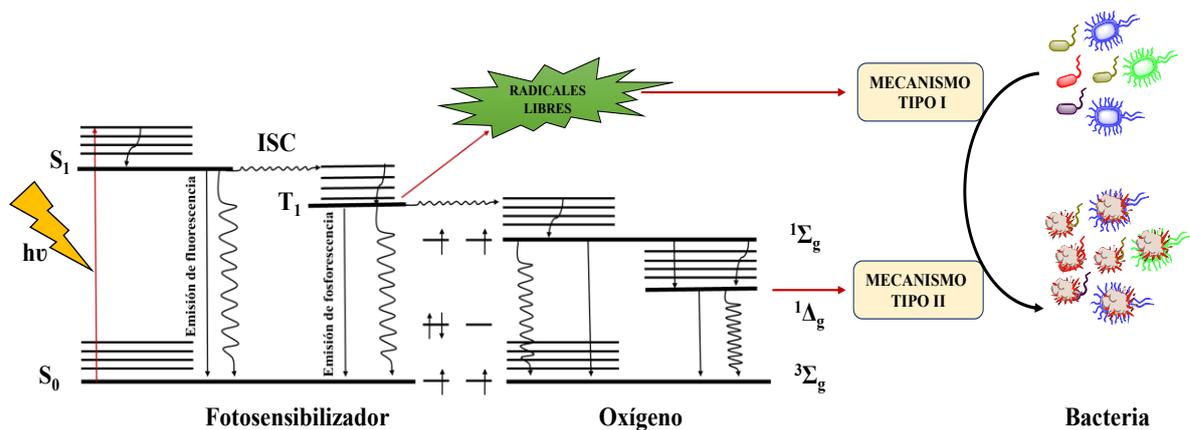


Figura 5. Diagrama de Jablonski que muestra los diversos modos de excitación y relajación en un cromóforo modificada a partir de Park et al. 2004 [93].

Como se sabe, las bacterias Gram positivas cuentan con una pared celular de peptidoglicano gruesa pero porosa (20-80 nm) en comparación con las bacterias Gram negativas (< 10 nm). A diferencia de las bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa adicional, que es impermeable a las moléculas grandes. Las bacterias Gram negativas, al contar con esta doble membrana hace que disminuya la penetración del oxígeno singlete en el citoplasma, concediendo así a las bacterias Gram negativas una menor susceptibilidad a los bactericidas fotodinámicamente activos [94,95]. La fotoinactivación de las bacterias Gram positivas se puede obtener con un fotosensibilizador, independientemente de su carga, mientras que la de las bacterias Gram negativas generalmente requieren del uso de un fotosensibilizador catiónico o la combinación de un fotosensibilizador con agentes disruptores de membrana [96].

El oxígeno singlete es una de las especies más importantes en la eliminación de bacterias, ya que cuenta con propiedades oxidantes y se puede generar bastante eficientemente. Específicamente actúa alterando la permeabilidad de las membranas celulares, atravesando y destruyendo la pared celular; de esta manera, reacciona con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando la muerte celular. Para proteger sus componentes intracelulares, las células microbianas pueden inducir la producción de defensas antioxidantes, como enzimas protectoras (como el superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa) o pigmentos (como los carotenoides que actúan como inhibidores no fotoquímicos del 1O_2). También puede actuar a nivel del ADN a través de dos mecanismos, es decir, alteración o modulación. Se han informado roturas en el ADN de cadena simple y doble, y la desaparición de la forma superenrollada del ADN

plasmídico en especies Gram positivas y Gram negativas. De hecho, los fotosensibilizadores pueden interactuar con los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas e inducir la reducción de los residuos de guanina que provocan la escisión del ADN [97,98]. Estos daños provocados a la célula se producen solo en las proximidades inmediatas del fotosensibilizador en estado excitado debido a la corta vida útil del oxígeno singlete en los sistemas biológicos [97,99].

2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es demostrar que un fotosensibilizador orgánico como el Rosa de Bengala (RB) soportado sobre diferentes materiales puede ser usado en fotocátalisis heterogénea tanto para producir una eficiente desinfección de aguas residuales como para participar en procesos de descontaminación. Con ese propósito se desarrollarán diferentes estrategias, una a nivel de su heterogeneización, utilizando varios métodos sintéticos de incorporación del colorante a diferentes soportes sólidos, y otra, a nivel mecanístico, intentando modificar los procesos fotoquímicos implicados en los procesos de descontaminación y desinfección.

Los objetivos específicos son:

- 1) Sintetizar y caracterizar nuevos fotocatalizadores heterogéneos con Rosa de Bengala sobre nanoesferas de óxido de silicio con y sin núcleo de magnetita para estudiar la influencia de estos soportes en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del RB, así como, evaluar la eficacia fotocatalítica de los nuevos materiales sintetizados en la degradación de fármacos y en desinfección de aguas.
- 2) Estudiar el efecto del tamaño de los soportes de óxido de silicio con o sin magnetita en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del RB y en sus propiedades como fotocatalizador heterogéneo.
- 3) Sintetizar y caracterizar nuevos materiales fotocatalíticos donde el RB esté unido mediante fuerzas iónicas a tejidos de poliamida con el propósito de evaluar su eficiencia en procesos de desinfección de aguas.
- 4) Sintetizar y caracterizar un fotocatalizador heterogéneo con RB unido covalentemente a lana de vidrio (GW) para evaluar su efectividad para producir la fotoinactivación de bacterias Gram positivas y Gram negativas en medios acuosos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Acetaminofeno (99%), acetato de sodio (NaAc, 99%), ácido acético (99%), ácido clorhídrico (37%), ácido fórmico (98%), ácido oleico (90%), agua deuterada, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) anhidro, 2-aminotiofenol (99%), alcohol bencílico (99.8%), ciclohexano (99.5%), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (98%), diclofenaco sal disódica (98%), dimetil sulfóxido (DMSO, 99.8%), disolución salina tamponada con fosfato (PBS), etanol, etilenglicol, hexano (98.5%), cloruro de hierro (III) hexahidratado (99.99%), hidróxido de amonio (25%–28%), hidróxido de sodio (97%), 1-metilimidazol (99%), lana de vidrio (Merck; diámetro de fibra de 15-25 μm), 1-octadeceno (90%), ofloxacino (99%), ortosilicato de tetraetilo (TEOS, 98%), polietilenglicol (1500 M.W.), polioxietileno nonil fenil éter (Igepal CO-520), rosa de bengala sal sódica (95%), tolueno anhidro se adquirieron de Sigma-Aldrich. Medios de cultivo; Agar-Agar de Difco™, agar de recuento en placa (PCA), infusión de cerebro y corazón (BHI), caldo nutritivo (NB) adquiridos de Scharlab. Todas las disoluciones se prepararon con agua de grado Milli-Q obtenida de un Milli-Q® IX 7003/05/10/15. El acetonitrilo (ACN) y el etanol fueron de calidad HPLC.

3.2 Síntesis de fotocatalizadores

-Síntesis de nanopartículas (NPs) de SiO₂

Las NPs de SiO₂ se prepararon utilizando el método de microemulsión inversa según el procedimiento descrito por Ding *et al.* [100]. Brevemente, 7.2 g Igepal CO-520 fueron añadidos en 100 mL de ciclohexano y se colocaron en el sonicador durante 10 minutos. Después se añadió una disolución de hidróxido de amonio (25%-28%, 0.2 mL) a la disolución anterior, que se mantuvo bajo agitación continua. Después, se añadió TEOS (4 mL) lentamente durante 10 h. Finalmente, se recuperaron las NPs mediante centrifugación, se lavaron con etanol (4×100 mL) y se secaron al vacío.

-Síntesis de nanopartículas (NPs) de Fe₃O₄@SiO₂

Las NPs de Fe₃O₄@SiO₂ se obtuvieron en dos pasos según el procedimiento ya descrito por Ding *et al.* y Park *et al.* [100,101]. Primero, se preparó el núcleo de Fe₃O₄ de la siguiente forma: se disolvió FeCl₃•6H₂O (540.6 mg, 2 mmol) en H₂O (6 mL) a temperatura ambiente, luego se añadieron en etanol (8 mL), hexano (14 mL) y ácido oleico (1.9 mL). Posteriormente, la disolución se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Después, se añadió NaOH (0.24 g) y se calentó a 70 °C durante 4 h manteniendo una agitación constante. La capa orgánica que contenía el complejo Fe(oleato)₃ fue separada con un embudo de separación, se lavó con agua desionizada (4×100 mL) y se dejó a 80 °C durante la noche. El Fe(oleato)₃ obtenido se dispersó en una mezcla orgánica de ácido oleico (0.32 mL) y de 1-octadeceno (12.5 mL). La disolución resultante se purgó con N₂ durante 30 min a temperatura ambiente y luego se llevó a una temperatura de 320 °C durante 30 min en atmósfera de N₂. Finalmente, se dejó a temperatura ambiente y el Fe₃O₄ se precipitó empleando un exceso de etanol. El sólido aislado se volvió a dispersar en hexano y luego se precipitó con etanol realizando este proceso varias veces [100].

En segundo lugar, se utilizó un método de microemulsión inversa para finalizar las NPs de Fe₃O₄@SiO₂. Para ello, se añadió Igepal CO-520 (7.2 g) en ciclohexano (100 mL) y fue sonicado durante 10 minutos. A continuación, se suspendió de Fe₃O₄ en ciclohexano (0.03 mL, 22.72 mg de Fe₃O₄) e hidróxido de amonio (25%-28%, 2.9 mL) bajo agitación constante. Finalmente, se adicionó lentamente TEOS (4 mL) a la suspensión durante 10 h. Después, las NPs de Fe₃O₄@SiO₂ se recolectaron por centrifugación (6000 rpm durante 5 minutos), se lavaron con etanol varias veces (4×100 mL) y se secaron al vacío.

-Síntesis de las micropartículas de SiO₂

Las micropartículas de SiO₂ se sintetizaron siguiendo el método Stöber [102]. El método consiste en adicionar hidróxido de amonio al 28-30% (87 mL) y TEOS (20 mL) utilizando etanol como disolvente (500 mL). Todo ello se colocó en un matraz balón de 1 L en baño de hielo manteniendo una temperatura de 10 °C durante 2 h. Posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h; transcurrido este tiempo se recuperó el material mediante centrifugación, se lavó con etanol (6x100 mL) y se dejó secar a vacío.

-Síntesis de las micropartículas de Fe₃O₄@SiO₂

Las micropartículas de Fe₃O₄@SiO₂ se obtuvieron mediante dos pasos. Primero, las micropartículas de Fe₃O₄ se obtuvieron mediante el método de síntesis hidrotermal [103,104]. Este método consiste en disolver FeCl₃•6H₂O (1.35 g, 5 mmol) en etilenglicol (40 ml) para formar una solución transparente, seguido de la adición de acetato de sodio (3.6 g) y polietilenglicol (1.0 g). Posteriormente, la mezcla se agitó durante 1 h y luego se vertió en una autoclave de acero inoxidable revestida de teflón con una capacidad de 50 ml. La autoclave se calentó a 200 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 48 h, una vez transcurridas las 48h se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto obtenido es la magnetita (Fe₃O₄) con un aspecto de color negro, el cual se lavó repetidas veces con etanol (6x100 mL) y finalmente se dejaron secar a vacío.

En segundo lugar, una vez obtenidas las micropartículas de Fe₃O₄ se recubrieron con una capa de sílice [105]. Primero, 0.2 g de Fe₃O₄ se dispersaron en etanol sonicando la suspensión durante 15 min. Posteriormente, se adiciono una solución de hidróxido de amonio (7 mL en 9.3 mL de etanol) y se sónico durante 15 min más, después se adiciono una solución de TEOS (6 mL en 5 mL de etanol) y se dejó sonicando durante 1 h. Finalmente, se recolecto el producto lavándolo varias veces con etanol (6x100 mL) y se secaron al vacío.

-Anclaje del RB a la superficie de las micropartículas y las NPs de SiO₂ y Fe₃O₄@SiO₂

El anclaje covalente del RB sobre las micropartículas y las NPs de Fe₃O₄@SiO₂ y SiO₂, fue llevado a cabo en dos etapas. En la primera etapa, las partículas (8.0 g) fueron derivatizadas durante la noche con 3-aminopropiltriétoxosilano (APTES) anhidro (0.8 mL, 0.043 M) en tolueno anhidro (80 mL) a una temperatura de 150 °C para obtener partículas de SiO₂ y Fe₃O₄@SiO₂ con grupo aminopropilo en su superficie [106]. La segunda etapa consistió en tratar las partículas con 1-metilimidazol (0.0176 mL, 6 × 10⁻³ M), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (0.042 g, 6 × 10⁻³ M) y RB (0.218 g, 6 × 10⁻³ M) en 35 mL de DMSO a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, las partículas obtenidas de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB fueron centrifugadas para su recuperación (6000 rpm durante 5 minutos), se lavaron con DMSO (3x50 mL) y EtOH (4x100 mL) y se secaron a vacío. Se prepararon otros dos fotocatalizadores SiO₂-RB (SiO₂-RB-1.7 y SiO₂-RB-5) donde se aumentó la cantidad de 1-metilimidazol, el clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida y RB 1.66 veces y 5 veces, respectivamente.

-Procedimiento de teñido de los tejidos de poliamida con RB (RB-PAF)

Este proceso de teñido se realizó en la EPSA (Escuela Politécnica Superior de Alcoy-UPV) gracias a un proyecto conjunto y posteriormente las muestras teñidas fueron utilizadas como fotocatalizadores en el ITQ-UPV. Las muestras de poliamida (Nylon 6.6, 5 g) se tiñeron con Rosa de Bengala (RB) según tres intensidades diferentes 0.5, 1 y 3 % o.w.f. (on weight of fiber-sobre el peso de la fibra). La disolución de teñido consistió en una disolución acuosa de RB (proporción tejido-baño 1:20 p/v) tratada con 10 g/L de sulfato sódico y 5 mL/L de ácido acético para alcanzar un pH de 3.8. El dispositivo de teñido era un Tin Control abierto. La disolución se calentó hasta 100 °C, alcanzados mediante un gradiente térmico de 3 °C min⁻¹. La temperatura de tintura (100 °C) se mantuvo durante 60 minutos con agitación mecánica; a continuación, el baño se enfrió hasta 40 °C mediante un gradiente térmico de -6 °C min⁻¹. A continuación, se realizaron diferentes ciclos de lavado (4x100 mL) con agua Milli-Q fría para eliminar el exceso de colorante y otras impurezas; finalmente, los tejidos teñidos se secaron a temperatura ambiente.

Para confirmar el agotamiento del baño, se determinó la cantidad de RB restante a partir de la relación absorbancia-concentración a una absorbancia de 550 nm, correspondiente a la absorción máxima de RB.

-RB anclado en lana de vidrio (GW)

El anclaje covalente del RB sobre la lana de vidrio (Merck; diámetro de fibra de 15-25 μm), se realizó en tres pasos [107]: primero, fue necesario realizar un pretratamiento a la lana de vidrio; se utilizaron 10 g de la lana de vidrio y se colocaron en HCl (400 mL, 6 M) por 12 h bajo agitación constante y después se lavó a diferentes tiempos (7x100 mL) con agua, hasta un pH 6, seguido de un lavado con una disolución de hidróxido de amonio (400 mL, 1 M) obteniendo un pH de 10, posteriormente se lavó con EtOH (5x100 mL) y se secó a vacío.

La conjugación del RB con el GW se logró en dos pasos: primero, los 10 g de GW se trataron durante la noche con APTES (10 mL, 0.150 M) en tolueno anhidro (300 mL) a 150 °C para obtener $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, posteriormente se eliminó el exceso de APTES lavando con EtOH (5x100 mL) y se secó a vacío; luego, se trató con 1-metilimidazol (0.2 mL, 8×10^{-3} M), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (0.450 g, 8×10^{-3} M) y RB (1.3 g, 4×10^{-3} M) en 300 mL de DMSO a temperatura ambiente durante otras 24 h. Después, se lavó con DMSO (3x300 mL), EtOH (3x300 mL) y luego agua (3x300 mL), y se secó al vacío.

3.3 Fotodegradaciones

Las fotodegradaciones del Capítulo I y II, se llevaron a cabo utilizando un fotorreactor casero (Figura 76) que está equipado con un montaje en espiral de tiras de 2.5 m de Green-LEDs Samsung SMD5630 IP20 de 40W que mostraron una banda de emisión centrada en 527 nm. Se estudió la fotodegradación de las disoluciones acuosas de los contaminantes a 5×10^{-5} M en presencia de RB homogéneo, como control de referencia, así como con suspensiones de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs. La concentración de RB utilizada para estos experimentos fue de 5×10^{-6} M (10% mol), que correspondía a 0.8 mg/mL de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs y 0.44 mg/mL de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs. Así, 10 mL de las muestras se colocaron en tubos de vidrio Pyrex con agitación magnética, y se irradiaron

bajo atmósfera de aire o nitrógeno. La eliminación de acetaminofeno (ACF), diclofenaco (DCF) y ofloxacino (OFX) se monitorizó a diferentes tiempos de irradiación mediante HPLC utilizando un modelo Agilent 1220 Infinity LC con bomba cuaternaria G4290B, detector de fotodiodo G4290 B, equipado con una columna Mediterranea Sea 18 (25 cm×0.46 cm, tamaño de partícula de 5 µm). Para ACF y DCF la fase móvil fue una mezcla en gradiente de agua (pH 3): CH₃CN (70:30-30:70) a un flujo de 1.5 mL/min; la longitud de onda de detección se fijó en 280 nm; para el OFX se utilizó una fase móvil con una mezcla isocrática de agua (pH 3): CH₃CN (75:25) a un flujo de 0.7 mL/min; la longitud de onda de detección fue de 294 nm.

Para el Capítulo III se utilizó un fotorreactor LZC-4 (Luzchem Research Inc., Ottawa, Canadá), con 2, 4 y 8 lámparas LZC-LED verdes de 8 vatios ($\lambda_{\max} = 520$ nm) colocadas en posición lateral que suponían irradiancias, justo en el punto donde se colocaba el vial con la muestra, de 1.66, 3.34 y 6.75 mW/cm², respectivamente, según el número de lámparas utilizadas.

3.4 Determinación química de $^1\text{O}_2$

En el Capítulo III, la detección química de $^1\text{O}_2$ se llevó a cabo mediante la fotooxigenación del 9,10-dimetil antraceno (DMA) en presencia de RB-PAF al 0.5 % (30.6 mg), 1 % (30.7 mg) y 3 % (30.1 mg) (o.w.f.) en MeCN ($V=3$ mL) a 293 K. Las disoluciones fueron irradiadas en un fotorreactor casero construido con un montaje en espiral de tiras de LED verdes de 2.5 m (λ_{em} centrada en 520 nm), Samsung SMD2835-IP20 de 12.5 W. La concentración inicial de DMA fue de 80 μM , y su absorbancia se monitorizó mediante espectroscopía UV.

La medición de la vida útil del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) en el Capítulo III, se realizó registrando la fosforescencia característica del $^1\text{O}_2$ a 1276 nm con un detector NIR Hamamatsu (Peltier enfriado a -62.8 °C operando a 6500 V, acoplado a un monocromador de rejilla), utilizando un Nd:YAG L52137 V LOTIS TII a una longitud de onda de excitación de 532 nm. Los pulsos simples tenían una duración de unos 10 ns, y la energía era inferior a 5 mJ por pulso. El sistema estaba formado por el láser pulsado, un monocromador Oriel 77250 acoplado al detector NIR Hamamatsu y el osciloscopio conectado al ordenador. La señal de salida se transfería del osciloscopio a un ordenador personal. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, bajo atmósfera de aire.

3.5 Determinación de la carga de RB en fibras de poliamida

La cantidad de RB adsorbido en las fibras de poliamida fue determinada usando dos métodos diferentes: espectroscopía UV-vis y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS); Cabe mencionar que el teñido de la tela (tal como ya se ha comentado en el apartado 3.2) y la medición del color durante el proceso de teñido fueron realizados en EPSA (Escuela Politécnica Superior de Alcoy-UPV).

1) Espectroscopía UV-vis, se utilizaron dos métodos para la determinación de RB en las fibras:

- a) Inicialmente, la cantidad de RB en las fibras de poliamida se midió durante el proceso de teñido, calculando la cantidad de RB residual en la disolución post-teñido.
- b) Posteriormente, para determinar con mayor precisión la cantidad de RB adsorbida en el material final, se llevó a cabo un proceso en dos etapas:
 - i) Ruptura de los tejidos: se trataron cantidades específicas de RB-PAF con ácido fórmico al 80% (2 mL) a temperatura ambiente durante dos minutos; a continuación, se ajustó el pH de la mezcla a 7 con NaOH (2 M). Los tejidos disgregados que contenían el colorante se filtraron y lavaron con agua Milli-Q (5×100 mL).
 - ii) Extracción del colorante de las fibras disgregadas: los tejidos disgregados del tratamiento anterior se sometieron a sonicación con DMSO (20 mL) durante 3 h a 80 °C. Este proceso se repitió tres veces para garantizar la extracción completa del colorante y se midió la absorbancia en cada una de las extracciones realizadas.

La concentración de RB en cada extracción se calculó utilizando una curva de calibración absorbancia-concentración de RB en DMSO (espectrofotómetro Varian-Cary 50).

2) Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Una segunda determinación de la cantidad de RB adsorbida en las fibras de poliamida se realizó por ICP-MS. Las fibras de poliamida, primeramente, fueron sometidas a un tratamiento de digestión en horno de microondas. Las soluciones obtenidas al final de proceso de digestión se analizaron por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente midiendo la cantidad de iodo.

3.6 Equipos

-Fluorescencia

Para todas las mediciones fotofísicas en estado estacionario con muestras líquidas se emplearon celdas de cuarzo con una longitud de recorrido de 1 cm. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, registrados en un fluorímetro de EDINBURGH INSTRUMENTS (FLS1000) equipado con una lámpara Xe de 450 W. Para las mediciones de fluorescencia resuelta en el tiempo, descritas en los Capítulos del I-IV, se utilizó el equipo FL900 de Edinburgh Instruments, equipado con un láser EPL-405 de Edinburgh Instruments con longitud de onda de 398 a 410 nm, potencia de 0.09 a 0.11 mW.

-Láser

Los experimentos de fotólisis de destello láser se realizaron utilizando dos equipos de fotólisis de destello láser, descritos a continuación:

El sistema de fotólisis de destello láser consiste en el láser pulsado, una lámpara de xenón Lo255 Oriel pulsada, un monocromador 77200 monocromador Oriel, una carcasa de tubo fotomultiplicador Oriel, una fuente de alimentación de PMT 70705 y un osciloscopio Tektronix TDS-640A. La señal obtenida del osciloscopio se transfirió a un ordenador personal para el tratamiento de datos.

En el Capítulo II-IV, los experimentos del láser se realizaron utilizando un sistema OPO Ekspla (EKS-NT342C-10) acoplado a una extensión UV (EKS-NT342C-SH-SFG) como fuente de excitación y un sistema de detección de Edinburgh Instruments (LP980) acoplado a una cámara ICCD (Andor iStar CCD 320T), para las mediciones de las micropartículas de SiO₂-RB, los tejidos de poliamida teñidos y la lana de vidrio con RB, a una $\lambda_{exc} = 532$ nm con una potencia de 10 J. Las emisiones de fosforescencia de RB se registraron utilizando la cámara ICCD (Andor iStar CCD 320T) a $\lambda_{exc} = 532$ nm.

-Medidas de absorción (UV/Vis)

Los espectros de absorción UV-vis de las disoluciones y suspensiones se registraron en el espectrofotómetro Cary-50 de Agilent Technologies.

Los espectros de reflectancia UV-vis se obtuvieron utilizando un Cary 5000 de Agilent Technologies y un MINOLITA CM-3600d.

-Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)

Se ha utilizado el modelo Agilent Serie 1100 con bomba cuaternaria G1311A, detector de fotodiodo DAD G1315B, automuestreador de líquidos estándar G1313A y desgasificador G1322A, utilizando una columna Teknokroma C18 Mediterranea Sea (25×0.46 cm y 5 m de tamaño de partícula), para el análisis de muestras en los Capítulos I y II.

-Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Las muestras en los Capítulos I-IV, fueron analizadas en ICP-MS modelo Agilent Technologies ICPMS7900. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento de digestión en horno de microondas, previo a la determinación de la cantidad de RB en base a la cantidad de yodo.

-Microscopía electrónica de transmisión y microscopía de emisión de campo de alta resolución

El diámetro y la morfología de los materiales sintetizados de SiO₂-RB y de Fe₃O₄@SiO₂-RB se obtuvieron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de emisión de campo de alta resolución (HRFESEM). Los experimentos de TEM se realizaron en un sistema JEOL JEM 2100F operado a un voltaje de aceleración de 200 kV. Las imágenes de HRFESEM fueron tomadas en un GeminiSEM 500, ZEISS, con un voltaje de aceleración de 0.5 kV. Las muestras se prepararon como una dispersión sólida sobre una rejilla de cobre.

-Difracción de rayos X (XRD)

La estructura de los nuevos fotocatalizadores y la característica de fase amorfa de las NPs de SiO₂ (Capítulo I) se determinó mediante XRD. Los experimentos se realizaron en geometría Bragg-Bretano utilizando un difractómetro PANalytical CUBIX equipado con un detector PANalytical X'Celerator. Radiación de rayos X de Cu K α ($\lambda_1 = 1.5406 \text{ \AA}$, λ_2

= 1.5444 Å, $I_2 / I_1 = 0.5$), un voltaje y corriente del tubo de 45 kV y 40 mA, respectivamente.

-Resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN de ^{29}Si confirmó que APTES y RB (Capítulo I) se incorporaron covalentemente a la red de sílice inorgánica (enlaces Si-C). Los espectros de RMN se registraron utilizando un equipo Bruker DPX300 (300 MHz).

-Fotorreactores

Los ensayos fotocatalíticos del Capítulo IV se realizaron con un simulador solar SUNTEST XLS+ (Atlas Material Testing Solutions) con una irradiación media de 30 W/m^2 (Figura 6).



Figura 6. Simulador solar SUNTEST XLS+ (Atlas Material Testing Solutions).

Se utilizó un fotorreactor *Luzchem*, modelo LZC-4V, equipado con 8 lámparas que emiten a 520 nm (irradiancia en $67.45 \text{ W}/\text{m}^2$), para las irradiaciones realizadas en los Capítulos I y II, (véase la Figura 7).

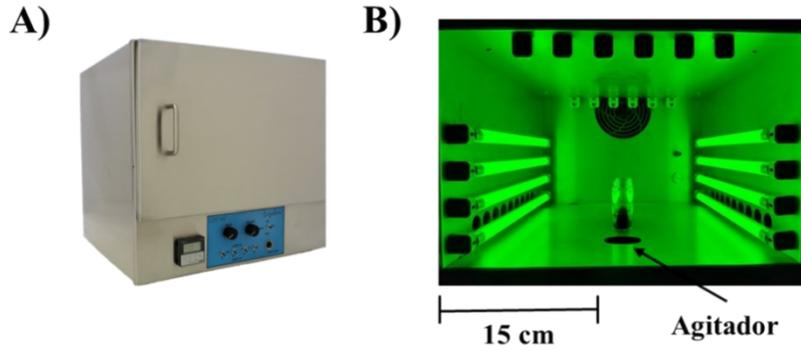


Figura 7. A) Fotorreactor Luzchem, modelo LZC-4V, B) fotorreactor Luzchem en funcionamiento con 8 lámparas en posición lateral y un punto de agitación en el centro del fotorreactor.

Un fotorreactor casero que cuenta con un montaje en espiral de tiras de LEDs verdes de 2.5 m ($\lambda_{em} = 530$ nm) Samsung SMD5630IP20 (40 W) se utilizó para las irradiaciones de los Capítulos I-III (Figura 8).

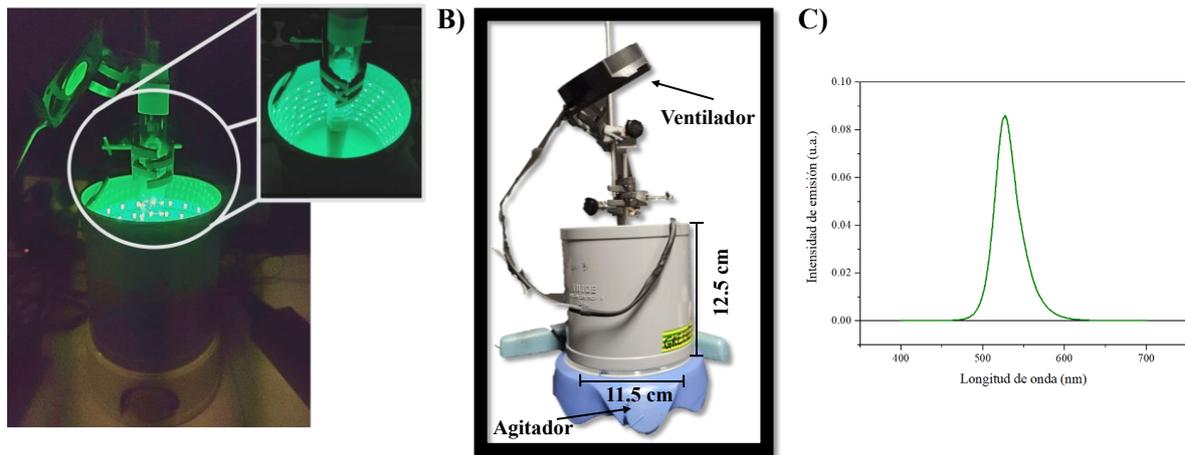


Figura 8. A) Fotorreactor casero en funcionamiento con LED de 530 nm, equipado con una tira verde de 2.5 m (40 W Samsung SMD5630IP20). B) Dimensiones del fotorreactor casero. C) Espectro de emisión del LED del Fotorreactor casero.

3.7 Técnicas microbiológicas

Las pruebas antibacterianas se realizaron con tres cepas bacterianas diferentes, dos de ellas pertenecientes al grupo de las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* CECT4624, *Pseudomona aeruginosa* CECT108) y una tercera especie perteneciente al grupo de las Gram positivas (*Enterococcus faecalis* CECT184). Todas ellas se obtuvieron de la "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT) en forma de liófilos. La reactivación de las cepas bacterianas se realizó utilizando dos medios de cultivo líquidos diferentes: caldo nutritivo (Nutrient Broth: NB) para *E. coli* y *P. aeruginosa* e infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusion: BHI) para *E. faecalis*. Las suspensiones bacterianas se mantuvieron a 36 ± 1 °C durante 24-48 horas. Tras un segundo cultivo en NB en similares condiciones (36 ± 1 °C; 24 h.), las bacterias se inocularon en agar de recuento en placa (PCA) por el método de siembra en triple estría. Tras la incubación a 36 ± 1 °C durante 24 h, se tomaron dos colonias bacterianas del PCA y se utilizaron como inóculo en el experimento a una concentración final de 1×10^6 ufc/mL (unidades formadoras de colonias/mL) en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS; 10 mL, pH 7.4). Posteriormente, se inocularon en 50 mL de NB y se incubaron a 36 ± 1 °C durante 14-16 h. A continuación, se recuperó el inóculo por centrifugación (4000 rpm, 10 min a 4 °C) en una centrífuga Eppendorf (Mod. 5415R; Sigma-Aldrich, Madrid, España). El pellet, que contenía la biomasa bacteriana, se lavó dos veces en las mismas condiciones con PBS (2x10 mL) y se resuspendió en PBS. Por último, la suspensión bacteriana que se utilizaría en los posteriores estudios de inactivación bacteriana fotodinámica, a la concentración de 1×10^6 ufc/mL, se obtuvo por dilución en PBS tras haberse estimado la concentración inicial de bacterias con un hemocitómetro (cámara de Neubauer). La concentración de la suspensión bacteriana utilizada en los experimentos fue siempre, paralelamente, confirmada con un recuento de viables en placa.

-Inactivación fotodinámica del Capítulo I

Los experimentos de irradiación para evaluar la inactivación fotodinámica de las cepas bacterianas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*, se llevaron a cabo con una irradiación de 67.45 W/m^2 utilizando un fotorreactor *Luzchem Research Inc* (descrito en la sección 3.6). Se irradiaron 4 mL de las suspensiones bacterianas (1×10^6 ufc) durante 20 minutos en presencia de las cantidades adecuadas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ NPs para realizar el estudio a dos concentraciones de RB diferentes (2×10^{-5} M y 9×10^{-5} M de RB).

Los experimentos también se realizaron con RB en homogéneo a una concentración de 2×10^{-5} M en las mismas condiciones. Los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado y los experimentos de control en oscuridad se realizaron por duplicado. Para valorar el efecto sobre la inactivación de las bacterias, periódicamente a lo largo del experimento se tomaron alícuotas (0.5 mL) de la suspensión bacteriana, se realizaron diluciones decimales seriadas en PBS y 100 μ L de las diluciones apropiadas se sembraron en placas con PCA y se cultivaron (36 ± 1 °C durante 14-16 h) para obtener el número de unidades formadoras de colonias. La inactivación bacteriana se determinó en función de la reducción del número de colonias viables respecto a las obtenidas en el inicio del experimento.

-Inactivación fotodinámica del Capítulo III

Los estudios de inactivación bacteriana fotodinámica se realizaron frente a *E. faecalis* utilizando los tres tejidos de poliamida teñidos con RB al 0.5, 1 y 3 % o.w.f.

Cada muestra de tejido de poliamida (2.6 cm de diámetro, 0.0468 g) se sujetó a un anillo de aluminio de forma que el tejido pudiera permanecer fijo y liso durante todo el experimento (Figura 9). El anillo se sumergió en posición vertical en un vial Pyrex (2.9 cm de diámetro, 6.5 cm de altura) que contenía 10 mL de la suspensión bacteriana (1×10^6 ufc/mL en PBS). El vial se colocó en el fondo de un fotorreactor LZC-4 (Luzchem Research Inc., Ottawa, Canadá), y la suspensión se mantuvo en agitación constante para evitar la precipitación bacteriana Figura 9.

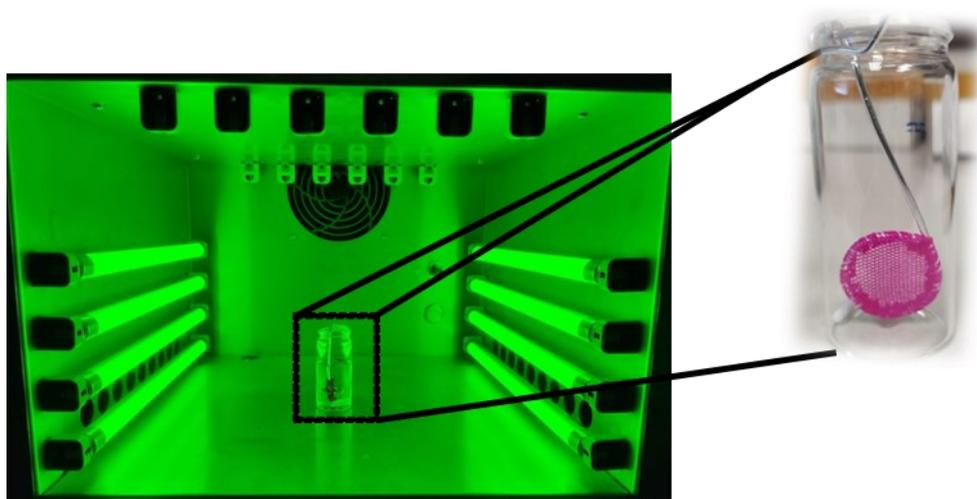


Figura 9. Fotorreactor Luzchem Research Inc con 8 lámparas LED ($\lambda_{em} = 520$ nm, 6.75 mW/cm²) en posición lateral durante la irradiación de las bacterias con RB-PAF. Inserción: Se utilizaron frascos PYREX con un diámetro de 2.9 cm y una altura de 6.5 cm. en el interior, el tejido se colocó en posición lateral junto con un soporte metálico (aluminio) con un diámetro de 2.6 cm. con un peso de 0.0468 g de tejido en un volumen de trabajo total de 10 mL.

Las irradiaciones se realizaron utilizando, en posiciones laterales, 2, 4 y 8 lámparas LZC-LED verdes de 8 vatios ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$), lo que supuso irradiancias, en el punto donde se colocó el vial, de 1.66, 3.34 y 6.75 mW/cm^2 , respectivamente. Las alícuotas de las suspensiones bacterianas (0.5 mL), que se retiraron cada 0, 5, 10, 15 y 20 min desde el inicio de la irradiación se diluyeron (10x) de forma seriada utilizando PBS. A continuación, las diluciones apropiadas (100 μL) se sembraron en placas PCA y se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante toda la noche (12-14 h) para estimar el número de bacterias viables. Cada experimento incluyó su correspondiente control realizado en condiciones de oscuridad. Y para todos los tratamientos se realizaron cuatro repeticiones independientes. La actividad fotodinámica antibacteriana de los tejidos se muestra como reducción de la supervivencia, en log (ufc/mL), a lo largo del experimento.

Además, en los casos en los que se obtuvo una inactivación bacteriana total (100%), los tejidos irradiados se colocaron directamente en placas de PCA y se incubaron, como se ha descrito anteriormente, para confirmar si todas las bacterias que pudieran haber estado adheridas al tejido a lo largo del experimento estaban realmente inactivadas.

-Efecto de la concentración de RB en los tejidos sobre su capacidad para adsorber bacterias (Capítulo III)

Para determinar si la concentración de RB en el tejido podía afectar a su capacidad de adsorción de bacterias, se evaluaron dos tejidos (1 cm^2 de superficie) de las concentraciones de RB, 1% y 3% (o.w.f.), utilizando una concentración de *E. faecalis* de 1×10^3 ufc/mL en 4 mL de PBS. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de agitación constante (200 rpm) y oscuridad. Se determinó el número de bacterias que quedaban en la suspensión tras diferentes periodos experimentales. Así, se extrajeron alícuotas (1 mL) después de 0, 1 y 2 horas desde el inicio del experimento. Las bacterias presentes en las suspensiones se determinaron mediante el recuento de viables colocando, directamente de la alícuota o de la dilución apropiada, 100 o 50 μL en placas PCA y se incubaron durante la noche a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. El número de bacterias adsorbidas en el tejido se calculó restando las ufc/mL que permanecían en la suspensión bacteriana, tras el periodo evaluado, de las ufc/mL al inicio del experimento. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado de forma independiente.

-Análisis estadístico de los datos (Capítulo III)

La actividad fotodinámica antibacteriana de RB-PAF 1% o.w.f. obtenida tras la exposición a diferentes irradiancias de luz verde a lo largo de distintos periodos de tiempo se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de Welch. Posteriormente, el análisis post-hoc de Games-Howell estableció las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Este estudio se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS v.16.0.1 (2008). SPSS Inc.

Por otro lado, se utilizó la prueba t de Student para comparar los resultados en el experimento de adsorción de bacterias en tejidos. En este caso, el análisis se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion v. 18.1.13. (2018). Statgraphics Technologies Inc.

-Inactivación fotodinámica del Capítulo IV

Los ensayos fotocatalíticos y microbiológicos, se realizaron en colaboración con la Plataforma Solar de Almería-CIEMAT, Tabernas (Almería, España), descritos a continuación.

Los ensayos fotocatalíticos se realizaron en un simulador solar SUNTEST XLS+ (Atlas Material Testing Solutions) con una irradiación UV-A media de 30 W/m^2 . El montaje experimental estaba compuesto por un vaso de precipitados transparente a los rayos UV de 145 mm de diámetro y 30 mm de altura (simulando el mismo diámetro de tubo empleado en los colectores parabólicos compuestos para fotocátalisis heterogénea) y agitado magnéticamente a 200 rpm. La temperatura del agua se monitorizó con un termómetro portátil modelo CRISON TM 65 (CRISON INSTRUMENTS SA, España). La temperatura máxima del agua estuvo por debajo de $37.5 \text{ }^\circ\text{C}$, descartándose por tanto efectos térmicos sobre la viabilidad bacteriana. La radiación de luz incidente fue monitoreada por un radiómetro UV-A portátil, modelo PMA2111 (Solar Light Co., Inc, Philadelphia), asegurando una radiación promedio de 30 W/m^2 (rango 320-400 nm, con alta resolución (0.01 W/m^2)).

Todos los ensayos se realizaron siguiendo el mismo esquema experimental: después de llenar el vaso de precipitados con la matriz de agua correspondiente, y para los ensayos realizados a diferentes pH, se ajustó con ácido sulfúrico o hidróxido de sodio y se controló con un pH-metro. Después de eso, se agregó un volumen apropiado de la suspensión

madre microbiana preparada para alcanzar una concentración inicial de 10^6 ufc/mL por bacteria y 1 g/L de RB inmovilizado. El efecto de la irradiación solar únicamente y del fotocatalizador en la oscuridad también se investigó como espacios en blanco del rendimiento fotocatalítico sobre la reducción de ambas bacterias. Después de unos minutos de homogeneización en oscuridad, se encendió el simulador solar, comenzando la exposición a la irradiación durante 2 h. Durante este tiempo, se tomaron y analizaron muestras a intervalos regulares para cada muestra cada 0, 15, 30, 35, 60, 90 y 120 min. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados de cada eliminación de objetivo se trazaron en gráficos como el valor promedio de todas las réplicas con la desviación estándar como barras de error.

Las cepas bacterianas utilizadas para el ensayo microbiológico fueron *E. coli* K12 (CECT 4624) y *E. faecalis* (CECT 5143). Ambas cepas se obtuvieron de la colección española de cultivos tipo. Brevemente, se obtuvieron suspensiones de 10^9 ufc/mL por bacteria utilizando medios líquidos Luria-Bertani (LB, Sigma-Aldrich) mediante incubación en incubadora con agitación rotatoria durante 20 h a 37 °C y 100 rpm. Posteriormente, cada suspensión se centrifugó 15 min a 3000 rpm, los pellets se suspendieron en solución tampón de fosfato (PBS) y se diluyeron directamente en la muestra para obtener una concentración inicial de 10^6 ufc/mL. La cuantificación de la concentración microbiana de todas las muestras de agua se llevó a cabo mediante la dilución en serie de las muestras en PBS y el método estándar de recuento en placa. Se esparcieron 50–500 μ L de muestra en medio específico, agar para coliformes y agar Slanetz Bartley, y se incubaron 24-48 h para *E. coli* y *E. faecalis* (ambos a 37 °C), respectivamente. Se encontró que el límite de detección (DL) de esta técnica es de 2 UFC/mL.

4. RESULTADOS

CAPÍTULO I

4.1 Fotorreactividad de nuevos fotocatalizadores heterogéneos de Rosa de Bengala-SiO₂ con y sin núcleo de magnetita para la degradación de fármacos y la desinfección de aguas.

Introducción

El continuo crecimiento de la población y la industrialización provocan la presencia de un gran número de contaminantes en los cuerpos acuáticos que son eliminados a través de plantas de tratamiento de aguas residuales [108]. De hecho, existen más de 4000 sustancias activas en el mercado, y muchas de ellas y sus metabolitos se han encontrado en aguas residuales naturales y municipales [109,110]. Entre de los fármacos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los antibióticos, incluidas las fluoroquinolonas (FQ), son de los productos farmacéuticos más utilizados en todo el mundo [111–113]. Muchos de los compuestos que se han detectado en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en Europa, como el paracetamol (10-23.33 µg/L), el diclofenaco (0.01-510 µg/L) y el ofloxacino (0.89-31.7 µg/L) son totalmente sintéticos y están clasificados como contaminantes emergentes [109,114]. A su vez, el problema de la aparición de microorganismos en las fuentes de agua de los países desarrollados está asociado a la contaminación cruzada de las aguas de acceso público [115].

Los procesos de oxidación avanzada (POA) ofrecen una alternativa viable para degradar contaminantes recalcitrantes, que son difíciles de eliminar mediante procesos de tratamiento biológicos [116]. Entre estas técnicas, la fotocatálisis constituye una importante alternativa para la degradación de contaminantes orgánicos, y la inactivación de bacterias [117,118]. Los fotocatalizadores empleados para tales fines se basan principalmente en semiconductores, siendo el TiO₂ el ejemplo más representativo [119].

La fotocatálisis heterogénea basada en colorantes orgánicos que absorben la luz visible cuenta con un gran potencial para la eliminación de contaminantes orgánicos, siendo respetuosa con el medio ambiente es sostenible, y al incidir luz sobre los mecanismos de funcionamiento permite evaluar la cinética de los pasos iniciales de la

descontaminación/desinfección [3,120]. Asimismo, la desinfección del agua mediante la inactivación fotodinámica de los microorganismos ofrece grandes ventajas frente a los procesos convencionales de remediación del agua, tales como evitar la resistencia microbiana [93].

El Rosa de Bengala (RB) es un colorante orgánico no tóxico y libre de metales con una fuerte banda de absorción en la región verde del espectro visible ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), con un estado de excitación triplete de larga duración y un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($\Phi_{\Delta} = 0.76$). Por todo ello, el RB se ha sido ampliamente estudiado como fotocatalizador homogéneo en descontaminación/desinfección de aguas residuales [66,121,122].

Sin embargo, el principal inconveniente de la fotocatálisis homogénea es la difícil separación de los fotocatalizadores del medio de reacción una vez finalizado el tratamiento; es por ello, que la fotocatálisis heterogénea representa un gran avance tecnológico para su aplicación [123]. Los catalizadores heterogéneos que incorporan propiedades magnéticas facilitan aún más su separación y recuperación del medio de reacción [100,124]. Recientemente nuestro equipo de investigación ha demostrado que la heterogeneización de un colorante orgánico anclado sobre un soporte inorgánico tiene una fuerte influencia en su comportamiento. Así se ha visto que un nuevo fotocatalizador basado en riboflavina ($\text{SiO}_2\text{-RF}$) mejora su estabilidad al tener una coraza completamente cubierta de RF lo cual produce una rápida desactivación de $^1\text{RF}^*$ impidiendo la formación de $^3\text{RF}^*$ y $^1\text{O}_2$. Además, se pudo observar que la alta adsorción de contaminantes orgánicos a su superficie daba lugar a la transferencia de electrones que producía la oxidación del contaminante a través del mecanismo de Tipo I [125]. En este contexto, el RB se ha implementado en diferentes sistemas que incluyen nanotransportadores orgánicos e inorgánicos mejorando el sector biofarmacéutico y potenciando la terapia basada en el uso del RB [89]. Al mismo tiempo, se han reportado algunos ejemplos sobre el uso de nanopartículas de sílice mesoporosa para evitar su agregación y garantizar la producción de $^1\text{O}_2$ para la terapia fotodinámica [72,126]. Sin embargo, se necesita una investigación más profunda en la forma en que la derivatización del RB sobre soportes heterogéneos influye en el mecanismo de acción contra la degradación de contaminantes orgánicos y la desinfección del agua.

Es por ello, que en este capítulo se propone la síntesis de dos nuevos fotocatalizadores heterogéneos que incorporan RB unido covalentemente a la superficie de las nanopartículas de sílice con y sin núcleo de magnetita. Los nuevos fotocatalizadores se caracterizaron y se probaron en conjunto con RB en medio homogéneo en la fotodegradación de diclofenaco (DCF), acetaminofeno (ACF) y ofloxacino (OFX). Adicionalmente, se evaluó su capacidad de inactivación en bacterias Gram positivas y Gram negativas. También se analizan los mecanismos implicados en estos procesos a partir de experimentos fotofísicos y fotoquímicos.

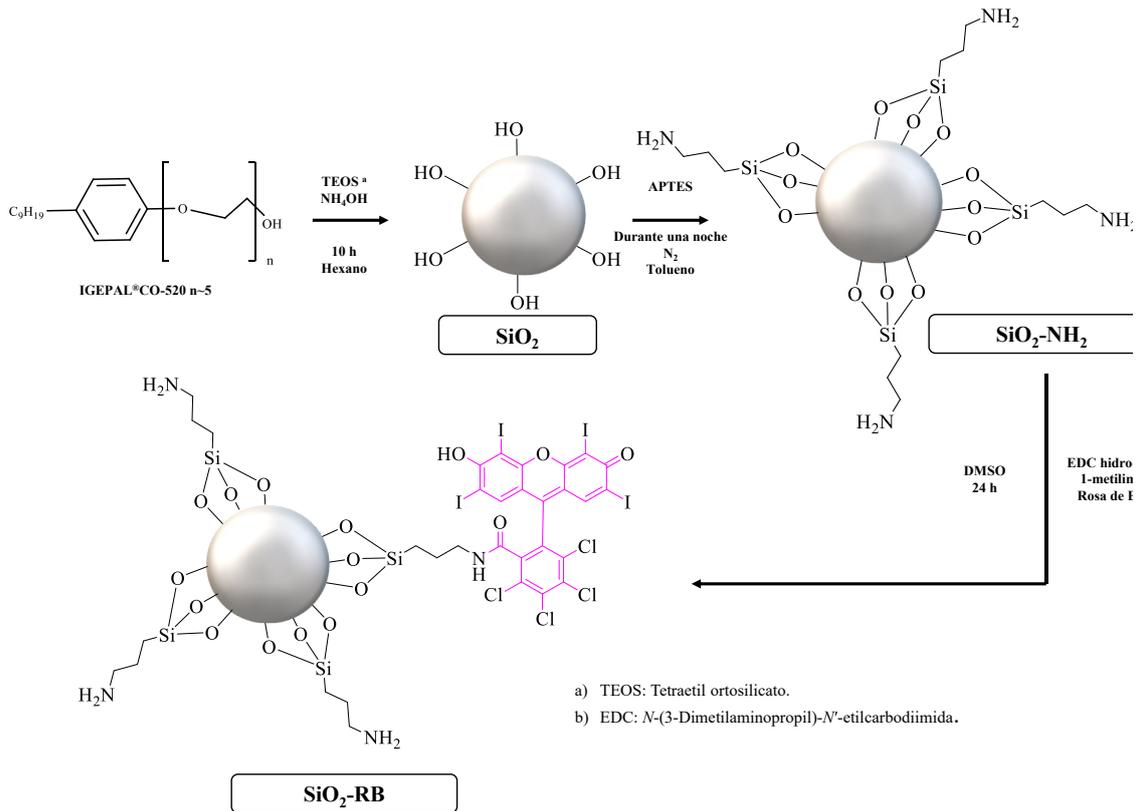
Resultados y discusión

Síntesis de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB NPs

Los dos nuevos fotocatalizadores heterogéneos (SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB NPs) se sintetizaron en varias etapas como se muestra en el esquema de la Figura 10. Entre los métodos descritos para la síntesis de NPs de sílice, se seleccionó el protocolo de microemulsión inversa (ver detalles en la sección 3.2 Síntesis de fotocatalizadores) ya que podía aplicarse para la preparación del fotocatalizador que incorpora a su vez un núcleo de magnetita (Fe₃O₄@SiO₂-RB). Explicando brevemente la síntesis, primeramente, se formó una microemulsión con IGEPAL CO-520 en hexano (en ausencia y en presencia de NPs de Fe₃O₄ previamente sintetizadas) que fue tratada con amoníaco acuoso, el cual entra en las micelas de Igepal CO-520, aumentando su tamaño y formando una microemulsión inversa. A continuación, el TEOS añadido sufre una hidrólisis en la interfaz aceite/agua y finalmente se condensa para formar la coraza de sílice. Las NPs de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB resultantes se derivatizaron con APTES para dar lugar a una monocapa de grupos aminos libres que cumple dos objetivos diferentes; 1) protege la sílice del medio acuoso, y 2) facilita la posterior unión covalente del RB a las NPs. Así, el tratamiento de las NPs de SiO₂-NH₂ / Fe₃O₄@ SiO₂-NH₂ con RB bajo el típico protocolo de formación de amidas, en presencia de EDC como agente de acoplamiento, da lugar a la formación de SiO₂-RB y Fe₃O₄@ SiO₂-RB como polvos de color rosa, que al contar con un fuerte enlace covalente creado entre las NPs y el cromóforo impide la posterior liberación del colorante en el medio homogéneo. De acuerdo con la intensidad del color rosa, la presencia del núcleo de magnetita parece producir una mayor carga de

RB (véase la Figura 11A-B). En un intento de incrementar la carga de RB en la superficie de las NPs, se adicionaron mayores cantidades de RB (1.7 y 5 veces más de RB, SiO₂-RB-1.7 SiO₂-RB-5) sin embargo, se obtuvo la misma carga de RB en los tres casos (Figura 11 C).

A)



B)

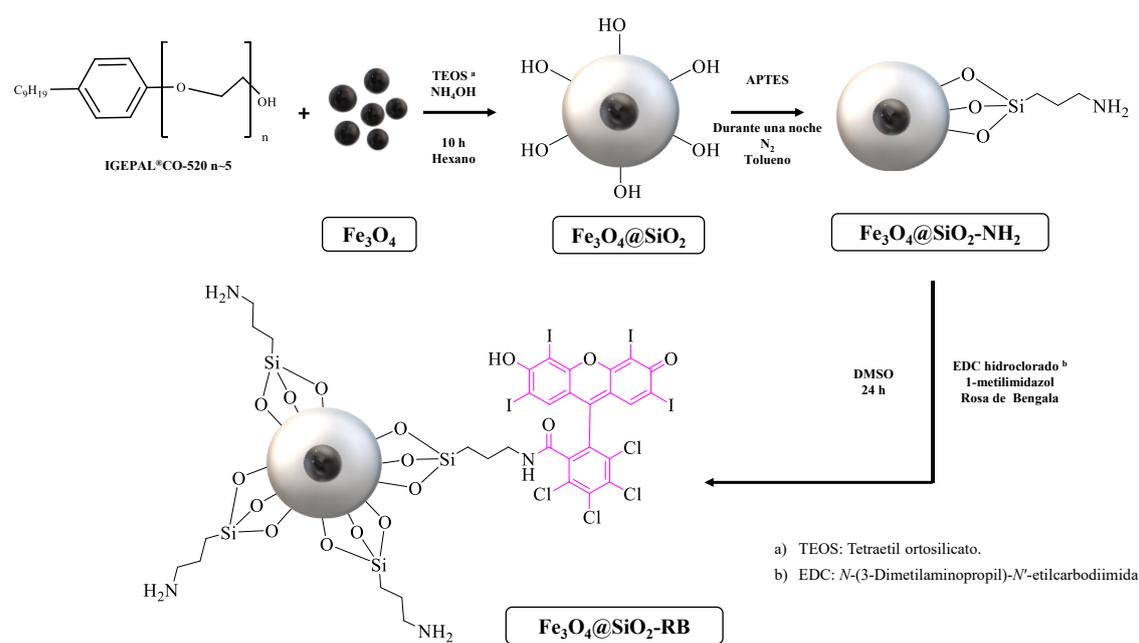


Figura 10. Síntesis de los fotocatalizadores heterogéneos $SiO_2\text{-RB}$ NPs (A) and $Fe_3O_4@SiO_2\text{-RB}$ NPs (B).

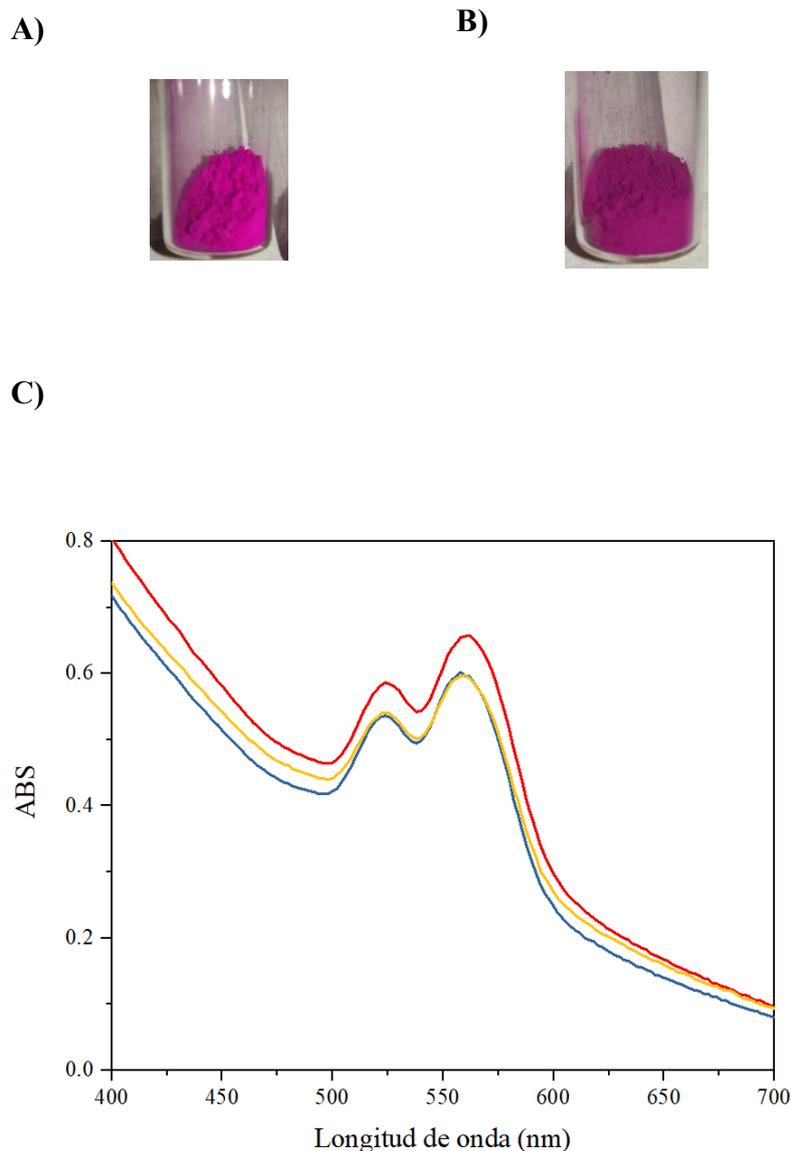


Figura 11. Imágenes reales de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (A) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (B) NPs. Espectros de absorción visible de suspensiones de los tres fotocatalizadores de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ en agua (0.5 mg mL^{-1}): Línea roja: $\text{SiO}_2\text{-RB}$; Línea amarilla: $\text{SiO}_2\text{-RB-1.7}$ y línea azul: $\text{SiO}_2\text{-RB-5}$.

Caracterización de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$

Las imágenes TEM (Figura 12) y HRFSEM (Figura 13) correspondientes a las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (A y B, respectivamente) revelaron que ambas NPs sintetizadas tienen una morfología esférica, idéntica a las NPs antes de la derivatización (Figura 13 A y B). El tamaño del diámetro en ambos casos fue similar (aprox. 83.0 ± 0.6 nm para $\text{SiO}_2\text{-RB}$, y aprox. 86 ± 5 nm para el $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$) mostrando una dispersión

homogénea. En el caso de las NPs magnéticas, el núcleo cuenta con un diámetro de aprox. 18.0 ± 1.3 nm y la mayoría de las esferas contaban con un núcleo de magnetita.

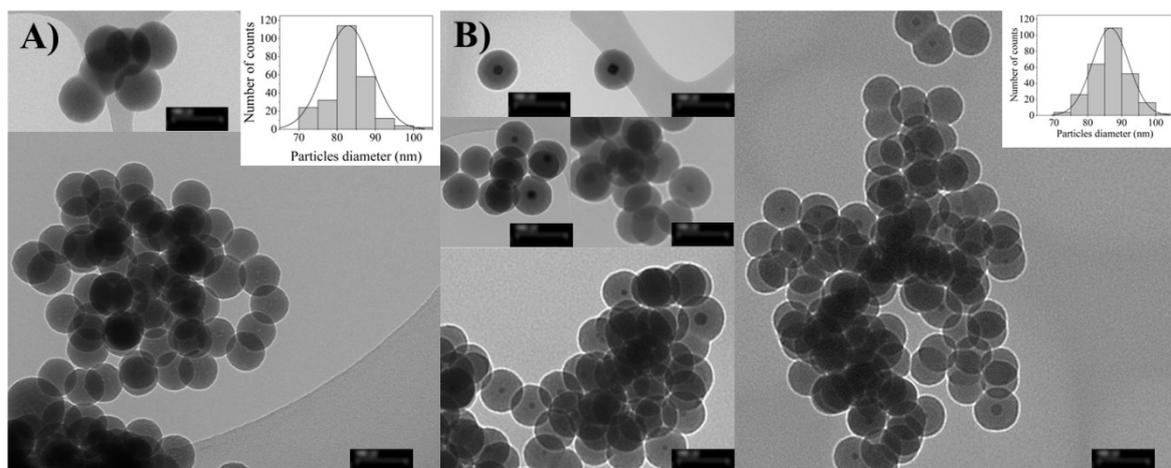


Figura 12. Imágenes de TEM de SiO₂-RB (A) y de Fe₃O₄@SiO₂-RB (B) y su distribución de tamaños (recuadros de la derecha).

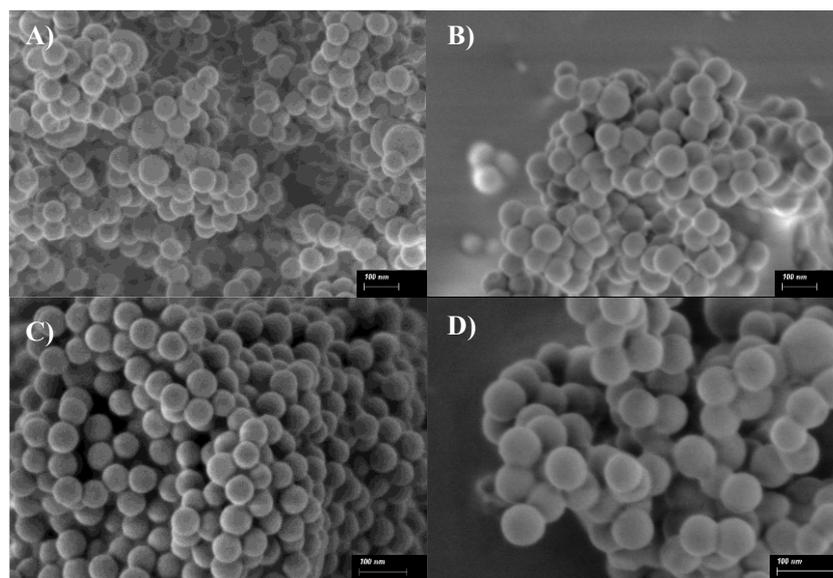


Figura 13. Imágenes de HRFESEM de SiO₂-NH₂ (A), Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ (B), SiO₂-RB (C) y Fe₃O₄@SiO₂-RB (D).

La difracción de rayos X antes y después del anclaje de RB confirmó la presencia de SiO₂ junto con los picos característicos correspondientes de Fe₃O₄ en el caso de Fe₃O₄@SiO₂ (Figura 14) [127].

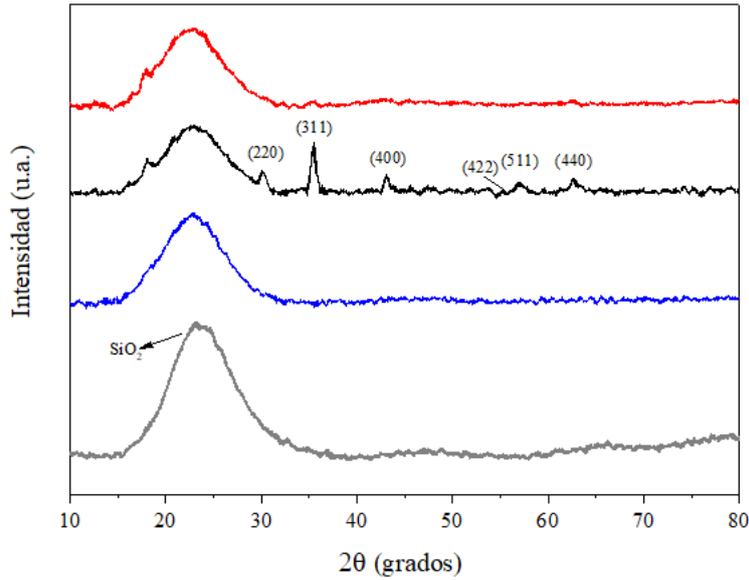


Figura 14. Difractograma de rayos X de: $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (gris), $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (negro) and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (rojo).

El RMN de estado sólido de ^{29}Si (Figura 15) muestra los picos característicos de la sílice a -97.91, -107.50 y -116.34 ppm, correspondientes a $(\text{SiO})_2\text{Si}(\text{OH})_2$ (Q_2), $(\text{SiO})_3\text{SiOH}$ (Q_3) y $(\text{SiO})_4\text{Si}$ (Q_4), junto con un pico a -73.57, que podría asignarse a la especie $(\text{SiO})_3\text{SiRNH}$ (T_3), demostrando que la funcionalización de la superficie de las NPs con APTES se consiguió con éxito [128].

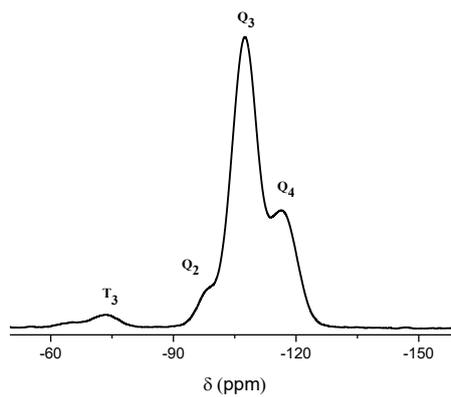


Figura 15. Espectro de RMN de estado sólido de ^{29}Si de $\text{SiO}_2\text{-RB}$.

Además, los espectros de reflectancia difusa mostraron la banda con un hombro, característico del RB con máximos a 563 nm y 559 nm para las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$. En el

caso de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$, la banda fue ligeramente desplazada hacia el azul en comparación con el RB en sólido con un máximo a 564 nm (Figura 16).

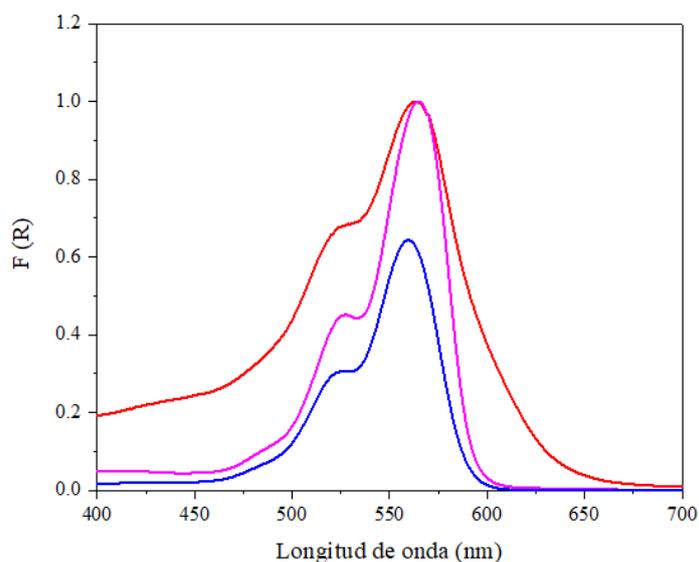


Figura 16. Espectros de reflectancia difusa con corrección de la línea de base de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (azul), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (rojo) y RB (rosa).

La cantidad de RB unido covalentemente a la superficie de las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ se determinó mediante dos métodos diferentes: Espectroscopía UV-vis y Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Para el primer caso, se prepararon diferentes suspensiones acuosas de NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y se registraron los espectros visibles antes y después de la corrección de la línea base debido a la dispersión de la luz asociada a las NPs (Figura 17). La absorbancia al máximo se comparó con una curva de calibración del RB en homogéneo.

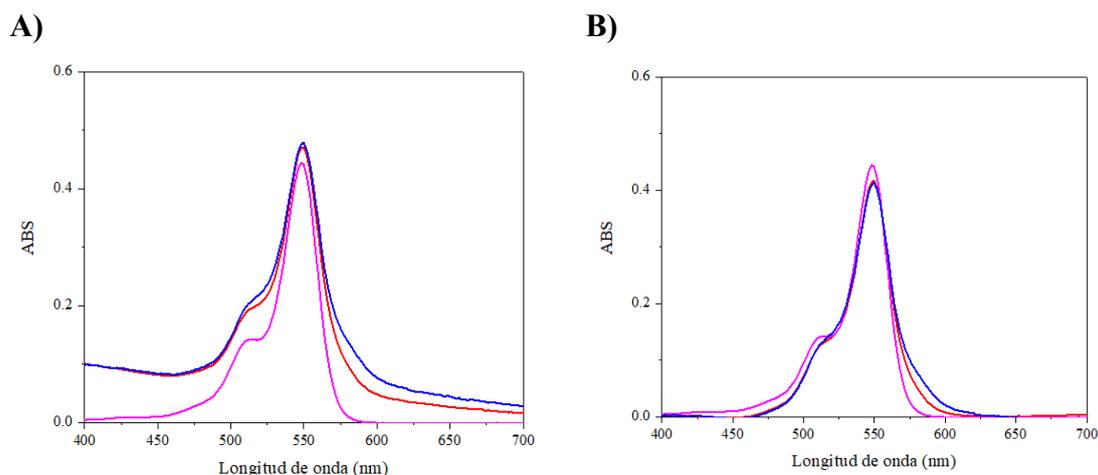


Figura 17. Espectros visibles de suspensiones acuosas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (azul, 0.80 mg mL^{-1}), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@-SiO}_2\text{-RB NPs}$ (rojo, 0.44 mg mL^{-1}) y RB (rosa, $5 \times 10^{-6} \text{ M}$) antes de la corrección de su línea base (A) y después de la corrección de línea (B).

Por comparación de las absorbancias obtenidas, se determinó una carga de RB de 0.63% (p/p) y 1.16% (p/p) para $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}$, respectivamente. A partir de estos valores, también se estimó la parte de la superficie de las NPs cubiertas por moléculas de RB, que correspondía a aproximadamente 1/8 para las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y a aproximadamente 1/4 para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}$, los detalles del procedimiento se describen a continuación:

El porcentaje del área cubierta por las moléculas de RB en la superficie de las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@-SiO}_2\text{-RB}$ se determinó asumiendo que; 1) las partículas de SiO_2 son esferas perfectas, y 2) el área de la molécula de RB se tomó de Pubchem, véase la Figura 18.

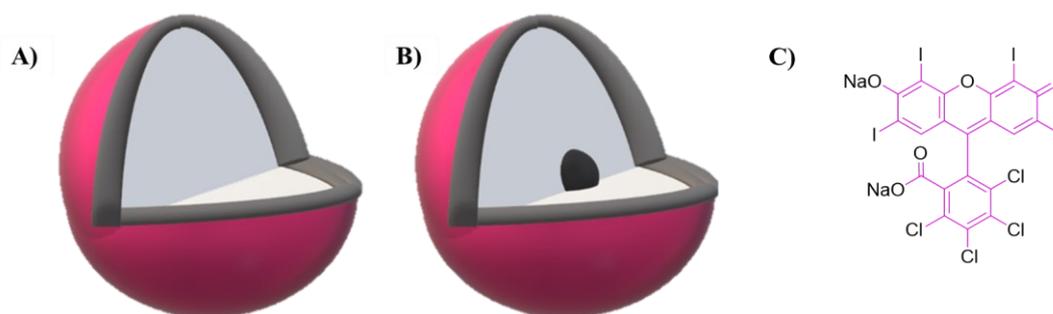


Figura 18. Supuestos geométricos de las nanopartículas (A y B) y del cromóforo RB (C).

Para las nanopartículas de SiO₂-RB, en primer lugar, el volumen y el área de la esfera se pueden calcular con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Volumen de la esfera: } V_S = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Área de la esfera: } A_S = 4 \cdot \pi \cdot r^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

En nuestro caso, el diámetro medio de las nanopartículas sintetizadas es de 83 nm (determinado a partir de experimentos de TEM). Por tanto, para una sola nanopartícula de SiO₂:

$$V_{SiO_2} = 3 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1}$$

$$A_{SiO_2} = 2.16 \times 10^4 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}$$

Luego, para determinar la masa de una sola nanopartícula de SiO₂ (ecuación 3), asumimos que tiene la misma densidad que el SiO₂ comercial ($d_{SiO_2} = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$):

$$m_{SiO_2} = V_{SiO_2} \times d_{SiO_2} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$m_{SiO_2} = 3 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1} \times 2.65 \text{ g SiO}_2 \text{ cm}^{-3}$$

$$m_{SiO_2} = 7.95 \times 10^{-16} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}$$

Según nuestros cálculos, la carga de RB es del 0.63% (p/p) en las NPs de SiO₂-RB. Así, la masa de SiO₂ por g de SiO₂-RB es:

$$m_{SiO_2} = 1 - m_{RB} = 1 - \frac{0.63}{100} = 0.9937 \text{ g SiO}_2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \quad \text{Ecuación 4}$$

Finalmente, el área superficial de 1 g de NPs de SiO₂-RB se determinó a partir de la ecuación 5:

$$A_{SiO_2-RB \text{ NPs}} = 0.9937 \text{ g SiO}_2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times \frac{2.16 \times 10^4 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}}{7.95 \times 10^{-16} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$A_{SiO_2-RB} = 2.7 \times 10^{19} \text{ nm}^2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

A continuación, se puede determinar el número de moléculas de RB por g de NPs de SiO₂-RB mediante la ecuación 6:

$$\text{Moléculas de RB} = 0.0063 \text{ g de RB} (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times \frac{1 \text{ mol}}{1017.64 \text{ g of RB}} \times \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Moléculas de RB} = 3.72 \times 10^{18} \text{ moléculas} (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

El área de la molécula de RB es de $0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1}$ según los datos descritos en Pubchem. A continuación, el área de las moléculas de RB obtenidas por g de SiO_2 -RB se estimaron a partir de la ecuación 7.

$$A_{RB} = 3.72 \times 10^{18} \text{ moléculas } (g \text{ SiO}_2 - RB)^{-1} \times 0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1} \quad \text{Ecuación 7}$$

Por lo tanto, el valor del área es:

$$A_{RB} = 3.3 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (g \text{ SiO}_2 - RB)^{-1}$$

$$\frac{A_{RB}}{A_{\text{SiO}_2\text{-RB}}} \times 100 = 12.3 \%$$

En el caso de las NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{SiO}_2$, el radio medio de las partículas sintetizadas es de 86.5 nm (determinado mediante TEM). Por lo tanto, utilizando las ecuaciones 1 y 2 para una sola nanopartícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{SiO}_2$:

$$V_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = 3.38 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1}$$

$$A_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = 2.35 \times 10^4 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}$$

Posteriormente, para determinar la masa de una sola nanopartícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (ecuación 8) de las NPs y entonces también utilizamos la misma densidad que la reportada para el SiO_2 comercial ($d_{\text{SiO}_2} = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$):

$$m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = V_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} \times d_{\text{SiO}_2} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = 3.38 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1} \times 2.65 \text{ g SiO}_2 \text{ cm}^{-3}$$

$$m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = 8.96 \times 10^{-16} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}$$

Los cálculos correspondientes se realizaron para las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB: La carga de RB es del 1.16% (p/p) en las NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB. Así, la masa de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ por g de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB es:

$$m_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2} = 1 - m_{RB} = 1 - \frac{1.16}{100} = 0.9884 \text{ g SiO}_2 (g \text{ Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - RB)^{-1} \quad \text{Ecuación 9}$$

Finalmente, el área superficial de 1g de NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB se determinó desde la ecuación 10:

$$A_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB NPs}} = 0.9884 \text{ g SiO}_2 (g \text{ Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - RB)^{-1} \times \frac{2.35 \times 10^4 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}}{8.96 \times 10^{-16} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$A_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}} = 2.6 \times 10^{19} \text{ nm}^2 (g \text{ Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - RB)^{-1}$$

Después, se puede determinar el número de moléculas de RB por g de NPs de SiO_2 -RB mediante la ecuación 11:

$$\text{Moléculas de RB} = 0.0116 \text{ g de RB } (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times \frac{1 \text{ mol}}{1017.64 \text{ g of RB}} \times \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$\text{Moléculas de RB} = 6.9 \times 10^{18} \text{ moléculas } (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

Posteriormente, utilizando el área de la molécula de RB ($0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1}$), el área de las moléculas de RB obtenidas por g de las NPs de SiO_2 -RB se estimaron a partir de la ecuación 12:

$$A_{\text{RB}} = 6.9 \times 10^{18} \text{ moléculas } (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times 0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1} \quad \text{Ecuación 12}$$

Por lo tanto, el valor del área es:

$$A_{\text{RB}} = 6.2 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (\text{g Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

$$\frac{A_{\text{RB}}}{A_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2-\text{RB}}} \times 100 = 23.8 \%$$

Además, la carga de RB en las NPs también se determinó mediante ICP-MS, basándose en la cantidad de yodo tras la digestión por microondas. Los resultados mostraron valores de $8.76 \pm 0.08 \text{ mg I/g}$ y $10.57 \pm 0.7 \text{ mg I/g}$ para las NPs de SiO_2 -RB y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB, respectivamente. A partir de estos datos, la carga de RB determinada fue del 1.6 % y del 2 % (p/p) para las NPs de SiO_2 -RB y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB, respectivamente, en correlación con los resultados obtenidos a partir de la absorbancia visible tras la corrección debida a la dispersión de la luz.

Fotodegradación de contaminantes

En la Figura 19 se muestran los resultados de los experimentos de fotodegradación llevados a cabo en presencia de las NPs de SiO_2 -RB y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -RB, así como, las irradiaciones control en condiciones homogéneas de RB, bajo diferentes atmósferas, (véase la Figura 8 para el montaje de la irradiación). Como se puede observar en el caso de las irradiaciones en fase heterogénea, el núcleo magnético no produjo ningún efecto significativo en las fotodegradaciones, y la agitación inicial en oscuridad dio lugar a una disminución de aproximadamente el 10% en la concentración de los fármacos, debido a una adsorción parcial en la superficie de los fotocatalizadores. Lo más interesante es que las irradiaciones heterogéneas dieron lugar a mayores rendimientos de fotodegradación que las irradiaciones en homogéneo. En concreto, el DCF se eliminó por completo tras tres horas de irradiación heterogénea. En el caso del ACF, se alcanzó hasta un 77% de

eliminación tras 6 horas de irradiación, mientras que sólo se observó un 70% de OFX tras 4 horas.

No obstante, la degradación observada en condiciones heterogéneas puede considerarse muy buena, y contrasta mucho con los valores observados en condiciones homogéneas (alrededor del 30% en condiciones homogéneas aireadas en el caso del DCF y OFX y en el caso del DCF y el ACF, y <5% para el OFX). La asociación entre el OFX y los fotocatalizadores puede ser la razón de esa mejora. Cabe mencionar que en todas las irradiaciones realizadas con los contaminantes se observó una mayor fotoestabilidad del RB tras la heterogeneización. (ver los resultados utilizando DCF en la Figura 20). Además, la eliminación de los fármacos fue mayormente independiente de la presencia de aire, lo que indica un mecanismo diferente de la participación del $^1\text{O}_2$. De este modo, la reactividad de los fotocatalizadores heterogéneos con RB en la primera hora de irradiación es máxima, independientemente del fármaco, y disminuye considerablemente a medida que la concentración de fármaco disminuye.

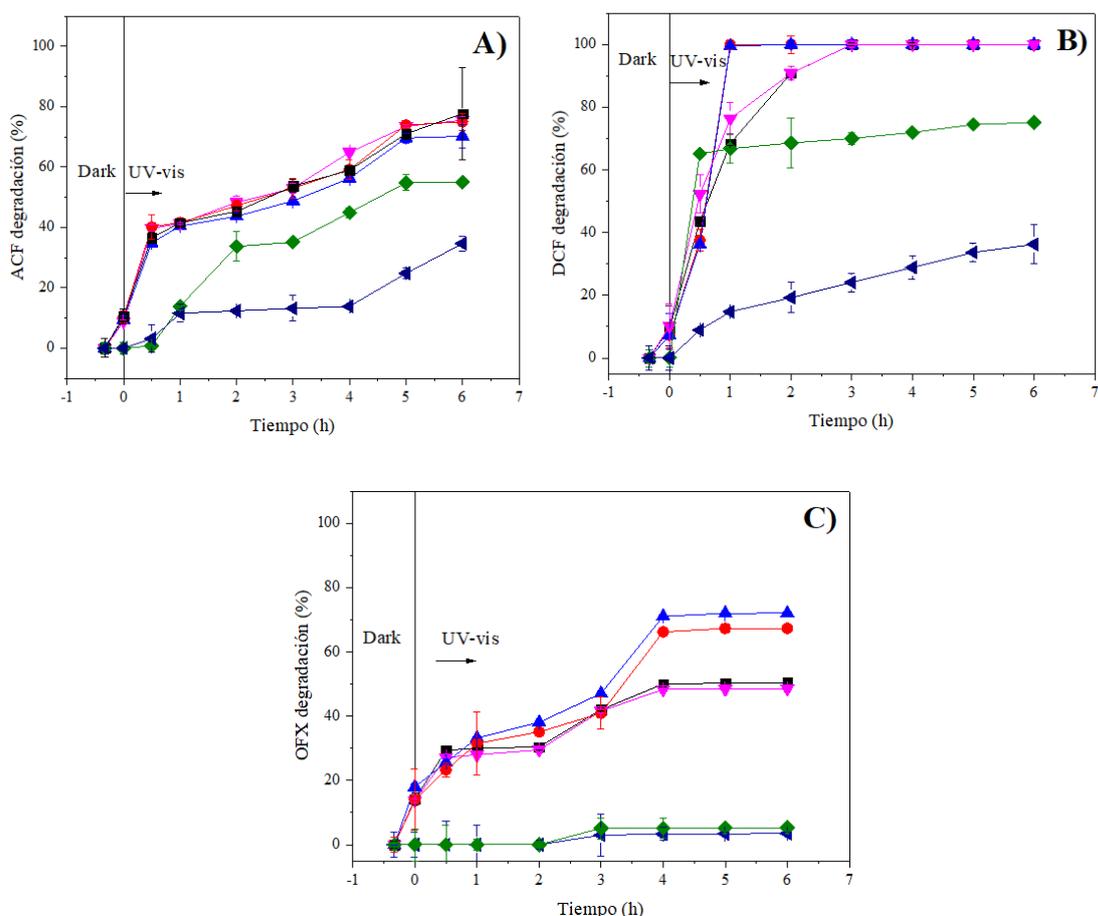


Figura 19. Evaluación de la eliminación de ACF (A), DCF (B) y OFX (C), $C_0 = 5 \times 10^{-5} M$ por cada uno, frente al tiempo de irradiación en presencia de $\text{SiO}_2\text{-RB_Aire}$ (●), $\text{SiO}_2\text{-RB_N}_2$ (■), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB_Aire}$ (▲), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB_N}_2$ (▼), RB-homogéneo_Aire (◀) y RB-homogéneo_N_2 (◆). $[\text{RB}] = 5 \times 10^{-6} M$ en disolución acuosa.

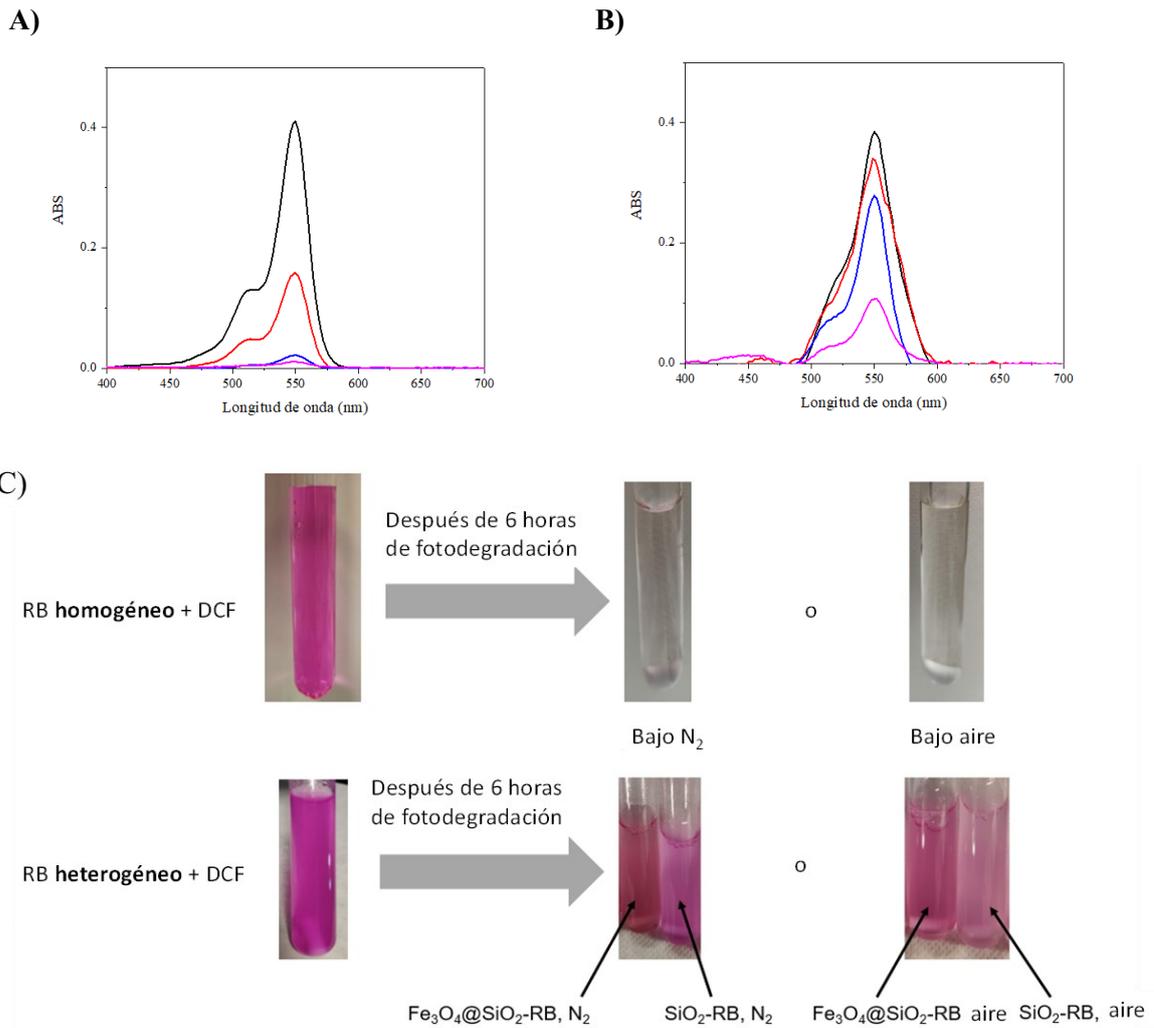


Figura 20. Espectros visibles de la RB-homogéneo (A) y de la suspensión- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (B) (con corrección de la línea de base) con DCF bajo aire (10 mL, 5×10^{-6} M en agua) a diferentes tiempos de irradiación: 0 h (negro), 1 h (rojo), 3 h (azul) and 6 h (rosa) y (C) imágenes reales que muestran los cambios en el color rosa tras la irradiación.

Inactivación fotodinámica de bacterias Gram negativas y Gram positivas

Se llevaron a cabo experimentos de fotoinactivación de *E. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en presencia de NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (Figura 21) utilizando dos concentraciones diferentes de fotocatalizador (equivalentes a una concentración de $\text{RB} = 2 \times 10^{-5}$ M y 9×10^{-5} M), bajo irradiación de luz verde (520 nm).

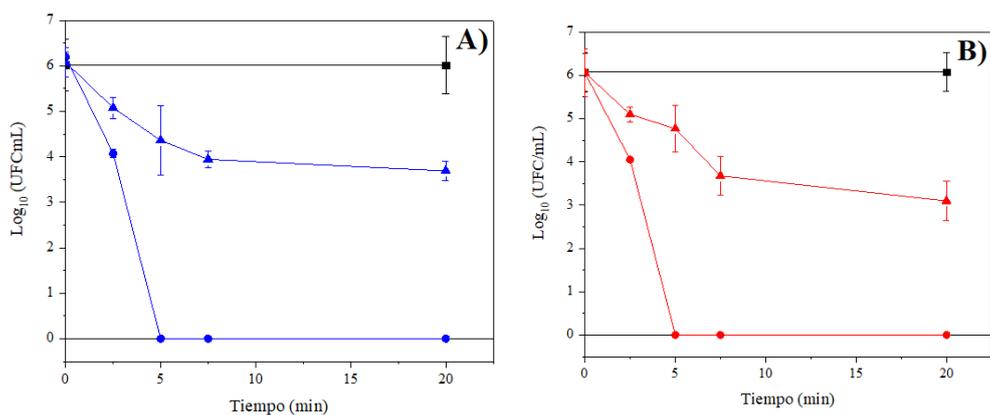


Figura 21. Curvas de supervivencia de *E. faecalis* en presencia de (A) SiO₂-RB y (B) Fe₃O₄@SiO₂-RB a concentraciones de RB de 2×10^{-5} M (círculos) y 9×10^{-5} M (triángulos) tras ser irradiados con lámparas LED ($\lambda_{\text{max}} = 520$ nm, 67.45 W m⁻²). Los experimentos de control se realizaron en la oscuridad (■). Los datos se muestran como media \pm desviación estándar ($n=4$).

Ambos fotocatalizadores fueron altamente eficientes en la inactivación de la bacteria Gram positiva, *E. faecalis*, y ambos mostraron una cinética muy similar. De hecho, las curvas de supervivencia de *E. faecalis* para la concentración baja de RB (2×10^{-5} M) fueron prácticamente idénticas para los dos fotocatalizadores. Sólo 2.5 min después de la exposición a la irradiación de luz verde, se obtuvo una reducción de colonias viables de más de 2 unidades logarítmicas (inactivación bacteriana >99%), y 2.5 min después, se alcanzó la total inhibición bacteriana en ambos casos. Curiosamente, a la concentración más alta (9×10^{-5} M), se obtuvieron niveles de inactivación bacteriana más bajos del 99.59% (2.3 unidades log_{10}) y 99.69% (2.9 unidades log_{10}) para las NP de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB, respectivamente, tras 20 min de irradiación. La menor eficacia antibacteriana encontrada a mayor concentración de RB podría atribuirse a la formación de agregados que afectan negativamente a la generación de oxígeno singlete, afectando directamente a la interacción del oxígeno singlete con las bacterias, ya que las moléculas de RB al estar más cerca unas de otras primero interactúan entre ellas y después con el medio externo, además de verse afectado en su tiempo de vida útil [72,129]. A efectos comparativos, también se expuso *E. faecalis* a una disolución homogénea de RB (2×10^{-5} M). De forma similar, se logró la inhibición bacteriana completamente en 5 min después de la exposición a la luz, mientras que, en condiciones de oscuridad, no se obtuvo ninguna reducción de los recuentos viables después de 20 min (resultados no mostrados). Estos resultados similares mostrados por ambas NPs y el RB en fase homogénea demuestran

claramente que la actividad fotodinámica antimicrobiana del RB no se ve alterada cuando este fotosensibilizador está unido covalentemente a las NPs de sílice.

Nuestros resultados de inactivación de las bacterias Gram positivas han mostrado que la utilización de concentraciones de RB más altas de las habitualmente descritas para desinfección puede ser una estrategia adecuada ya que se consigue mejorar la eficiencia. En este sentido, Guo *et al.* [130], describió que las nanopartículas de sílice decoradas con RB evaluadas a una concentración equivalente a 3 μM de RB y con una intensidad de iluminación de la fuente de luz (525 nm) de aproximadamente 33 J/cm^2 , fueron capaces de alcanzar una reducción de siete órdenes de magnitud en el recuento de viabilidad de la bacteria Gram positiva tras 40 min de exposición. Sin embargo, en nuestro caso, con una cantidad de nanopartículas correspondiente a una concentración de 20 μM y con una intensidad de iluminación de la fuente de luz (520 nm) menor, de 8.1 J/cm^2 , el tiempo necesario para una inactivación bacteriana completa fue de sólo 5 min, lo que demuestra una eficiencia muy superior por parte de nuestras NPs. En este caso, la concentración bacteriana inicial evaluada fue de 1×10^6 ufc/mL, que es una concentración bacteriana que suele encontrarse en las aguas residuales. No obstante, el uso de altas concentraciones de fotocatalizador debe optimizarse para evitar la formación de agregados que afecten negativamente a la actividad fotodinámica, como se ha demostrado que ocurre con la concentración más alta ensayada en este trabajo.

Por otro lado, no se observó inhibición de *E. coli* y *P. aeruginosa*, en ninguna de las concentraciones utilizadas, ni en presencia de los fotocatalizadores heterogéneos ni de RB homogéneo, a pesar del aumento del tiempo de irradiación de hasta 1 h. Está ampliamente descrito que las bacterias Gram negativas son más resistentes a la actividad bactericida fotodinámica que las bacterias Gram positivas debido a su pared externa altamente organizada [96]. Además, las fuerzas de repulsión electrostática entre el RB aniónico y la capa externa de las bacterias Gram negativas cargada negativamente podría impedir la interacción RB-bacteria y, en consecuencia, el efecto fotodinámico del RB. En este sentido, la modificación de la superficie de las NPs sintetizadas mediante la introducción de cargas positivas podría mejorar su actividad desinfectante, convirtiéndolas también en activas frente a las bacterias Gram negativas. Este efecto se ha demostrado recientemente en un fotocatalizador basado en lana de vidrio con RB [131].

Estado excitado singlete de RB en NPs de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB

Se investigaron las propiedades del estado de excitación singlete del RB (¹RB*) en los fotocatalizadores SiO₂-¹RB* y Fe₃O₄@SiO₂-¹RB* NPs registrando sus espectros de emisión de fluorescencia en suspensiones acuosas y comparando los resultados con una disolución homogénea de RB a la misma absorbancia y longitud de onda de excitación (Figura 22). Los máximos de emisión (a unos 567 nm), así como la intensidad de emisión observada para los tres materiales fueron prácticamente idénticos.

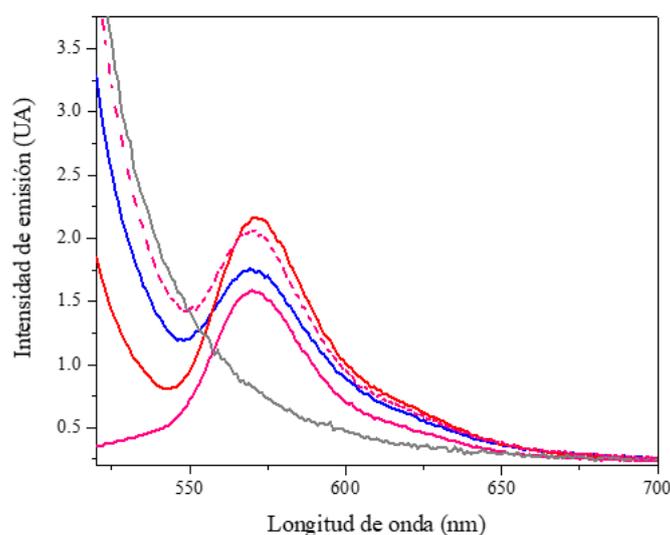


Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia del RB a Abs= 0.05 a λ_{exc} = 500 nm de: RB en disolución acuosa (rosa), SiO₂-RB suspensión acuosa (azul), Fe₃O₄@SiO₂-RB en suspensión acuosa (rojo), suspensión de SiO₂ en RB (rosa-línea punteada) y una suspensión de SiO₂ (gris).

Así, el rendimiento cuántico de fluorescencia del RB (Φ_F) en las NPs será aproximadamente el mismo que el descrito para la RB en disoluciones homogéneas ($\Phi_F = 0.018$) [3]. Los tiempos de vida de emisión de RB en los fotocatalizadores heterogéneos no se pudieron determinar ya que se encontraban por debajo del límite de detección de nuestro equipo. Este hecho concuerda con un tiempo de vida ¹RB* para SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB similar al descrito en la bibliografía para RB en disolución acuosa homogénea ($\tau_F < 0.1$ ns) [3]. Por lo tanto, podríamos decir que la reactividad de ¹RB* sería la misma en medios acuosos que cuando está unido covalentemente a la sílice de las NPs, con y sin la presencia de un núcleo de magnetita. Esta hipótesis fue confirmada por la desactivación de la emisión en estado estacionario al aumentar la cantidad de ACF y DCF (véase la Figura 23 para los resultados de ACF y DCF en las NPs SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB y la Figura 24 para el RB homogéneo).

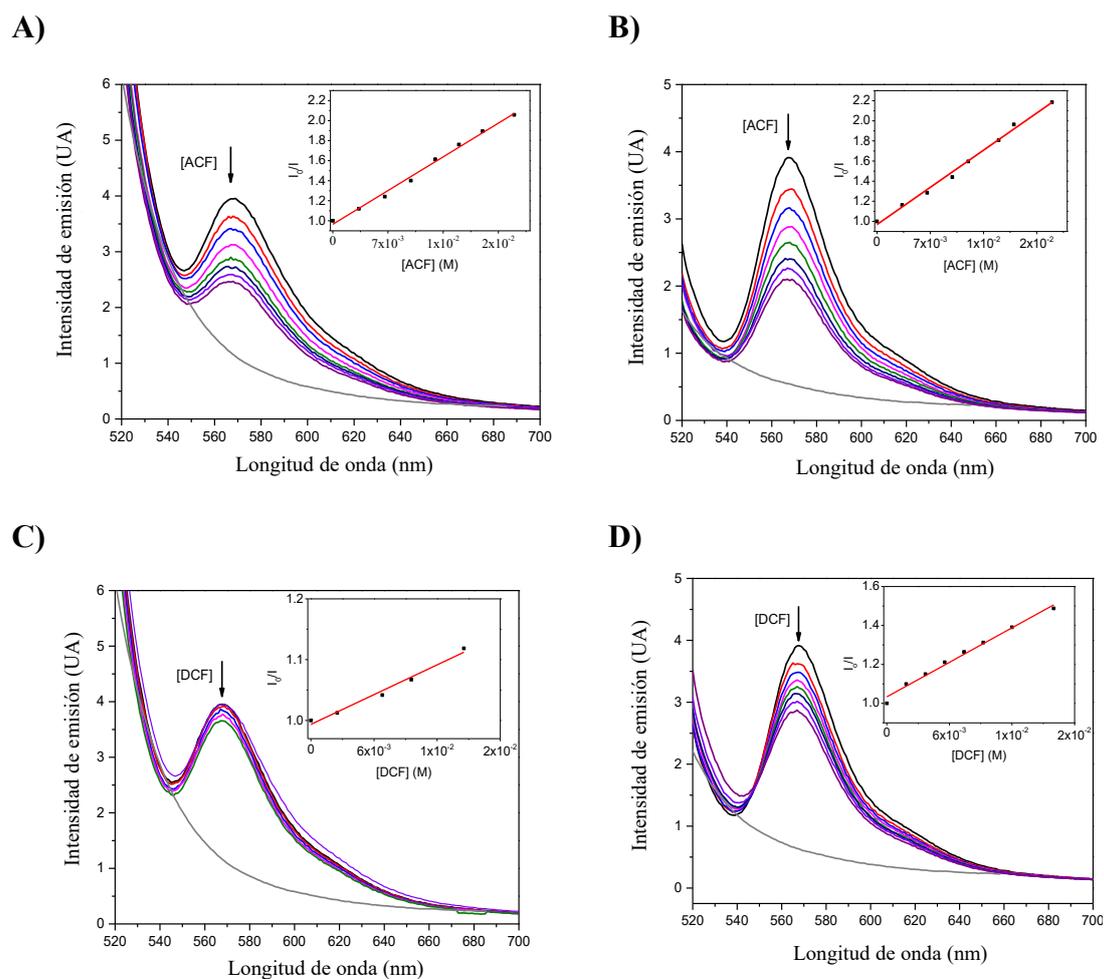


Figura 23. Espectros de fluorescencia en suspensiones acuosas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (columna izquierda, $Abs = 0.03$ a $\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}$) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (columna derecha, $Abs = 0.05$ a $\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}$) en presencia de concentraciones crecientes de ACF (A y B) y DCF (C y D). Recuadros: Gráficos de Stern-Volmer obtenidos a partir de los correspondientes experimentos en estado estacionario.

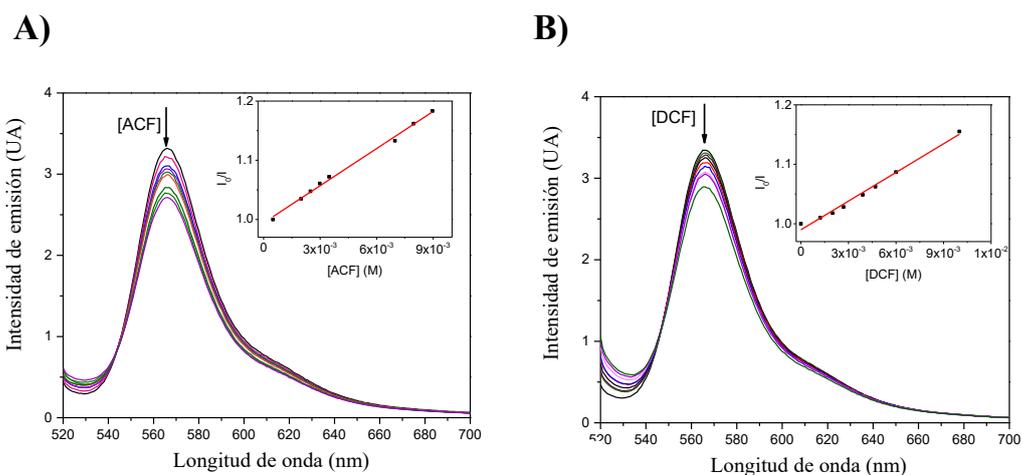


Figura 24. Espectros de fluorescencia en suspensiones acuosas de **RB** ($Abs = 0.03$ a $\lambda_{exc} = 500$ nm) en presencia de concentraciones crecientes de ACF (A) and DCF (B). Recuadros: Gráficos de Stern-Volmer obtenidos a partir de los correspondientes experimentos en estado estacionario.

Para el caso de OFX, la desactivación en estado estacionario se determinó a partir de la disminución del color del RB en el momento inicial tras la excitación láser, a partir de experimentos de LFP (Figura 25).

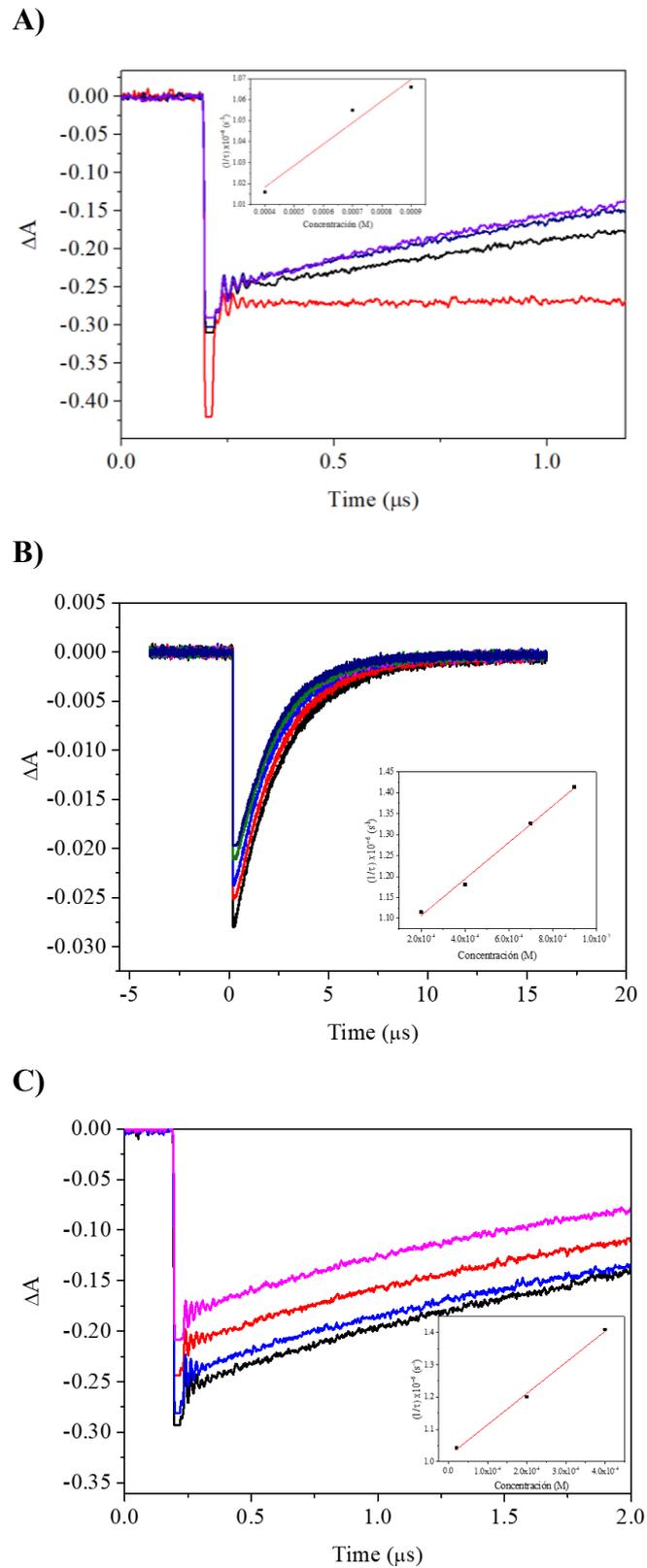


Figura 25. Disminución de absorbancia del RB tras la excitación del láser ($Abs = 0.03$ a $\lambda_{exc} = 500$ nm) en presencia de concentraciones crecientes de OFX (A, RB homogéneo; B, SiO_2 -RB, C, $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB). Recuadros: Gráficos de Stern-Volmer correspondientes.

Las constantes de la desactivación en estado estacionario (K) que se determinaron a partir de los experimentos realizados que se muestran en la Tabla 1. Estos valores revelaron un comportamiento de $^1\text{RB}^*$ con ACF, DCF y OFX en el medio acuoso muy similar al $^1\text{RB}^*$ generado por las NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$.

Tabla 1. Constantes de desactivación en estado estacionario (K) de $^1\text{RB}^*$ en los tres sistemas en agua por los tres fármacos.

Fotocatalizador	K / M ⁻¹		
	ACF	DCF	OFX
RB	20.91 ± 0	16.06 ± 0.67	102 ± 20
SiO ₂ -RB	48.07 ± 1.53	8.16 ± 0.62	437 ± 20
Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -RB	52.79 ± 1.68	29.52 ± 1.30	965 ± 47

En paralelo, se realizaron cálculos termodinámicos para evaluar la viabilidad de la transferencia de electrones desde los fármacos a los estados excitados del RB utilizando los siguientes valores reportados de E_{red} : $E_{\text{red}}(\text{RB}/\text{RB}^{\cdot-}) = -0.78 \text{ V}$ [132], $E_{\text{red}}(\text{ACF}^{\cdot+}/\text{ACF}) = +1.15 \text{ V}$ [66], $E_{\text{red}}(\text{DCF}^{\cdot+}/\text{DCF}) = +0.75 \text{ V}$ [66], $E_{\text{red}}(\text{OFX}^{\cdot+}/\text{OFX}) = +1.21 \text{ V}$ [133] todos frente a SCE, y las energías de $^1\text{RB}^*$ y $^3\text{RB}^*$ (2.17 y 1.80 eV [66,134]).

La viabilidad de la transferencia de electrones desde los fármacos a los estados excitados del RB se estimó mediante la ecuación de la energía de Gibbs de la transferencia de electrones fotoinducida:

$$\Delta G_{\text{et}} (\text{eV}) = - [E(\text{RB}/\text{RB}^{\cdot-}) - E(\text{D}^{\cdot+}/\text{D})] - E_{\text{S}_0\text{T}^*}(\text{RB}) + \Delta E_{\text{Coulombico}}$$

Donde $E(\text{RB}/\text{RB}^{\cdot-}) = -0.789 \text{ V}$ (vs SCE), $E(\text{D}^{\cdot+}/\text{D})$ es el potencial de oxidación de la especie donante (ACF, DCF y OFX), $E_{\text{S}_0\text{T}^*}(\text{RB})$ es la energía del estado excitado del singlete o triplete del RB. En disolventes polares, $\Delta E_{\text{Coulombico}}$ es despreciable y suele omitirse en las estimaciones fotofísicas.

Los valores de ΔG calculados (Tabla 2) indican que los procesos eran exergónicos en todos los casos a partir del $^1\text{RB}^*$ y podrían estar controlados por difusión. Por lo que, se asume una constante de velocidad de difusión a temperatura ambiente de aprox. $7.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [135] y sabiendo que el τ_F de $^1\text{RB}^*$ es de aprox. 0.1 ns en agua [134], la constante de Stern Volmer ($K_{SV} = k_q \times \tau_F$) para estas reacciones sería de aprox. 0.3 M^{-1} . Al comparar la K_{SV} con los valores K obtenidos (véase la Tabla 1), se pudo descartar con seguridad una influencia relevante de los procesos dinámicos en la desactivación de la fluorescencia del RB observado para ACF, DCF y OFX. Por lo tanto, las constantes de desactivación en estado estacionario observadas corresponden principalmente a constantes de asociación (K_a). En el caso particular de OFX, el valor de K_a en condiciones homogéneas es superior al de ACF y DCF; es más, en presencia de NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ se multiplica por 4 y 9, respectivamente. Este aumento es paralelo al mayor rendimiento de fotodegradación de este fármaco en condiciones heterogéneas frente a las homogéneas.

Tabla 2. Valores de ΔG calculados a partir de los valores reportados para cada uno de los fármacos.

Dador	ΔG a $^1\text{RB}^*$ (eV)	ΔG a $^3\text{RB}^*$ (eV)
ACF	-0.24	0.13
DCF	-0.64	-0.27
OFX	-0.18	0.19

Estado excitado triplete del RB en NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$

Se realizaron estudios de fotólisis de destello láser con RB en una disolución acuosa homogénea y en suspensiones de NPs de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$. El estado excitado triplete del RB ($^3\text{RB}^*$) detectado en los tres sistemas mostró un espectro de absorción transitoria idéntico, con bandas a λ_{max} ca. 370, 470 y 600 nm y una intensa decoloración centrada en 560 nm debida a la despoblación del estado fundamental del RB, lo que concuerda con la bibliografía (Figura 26) [134].

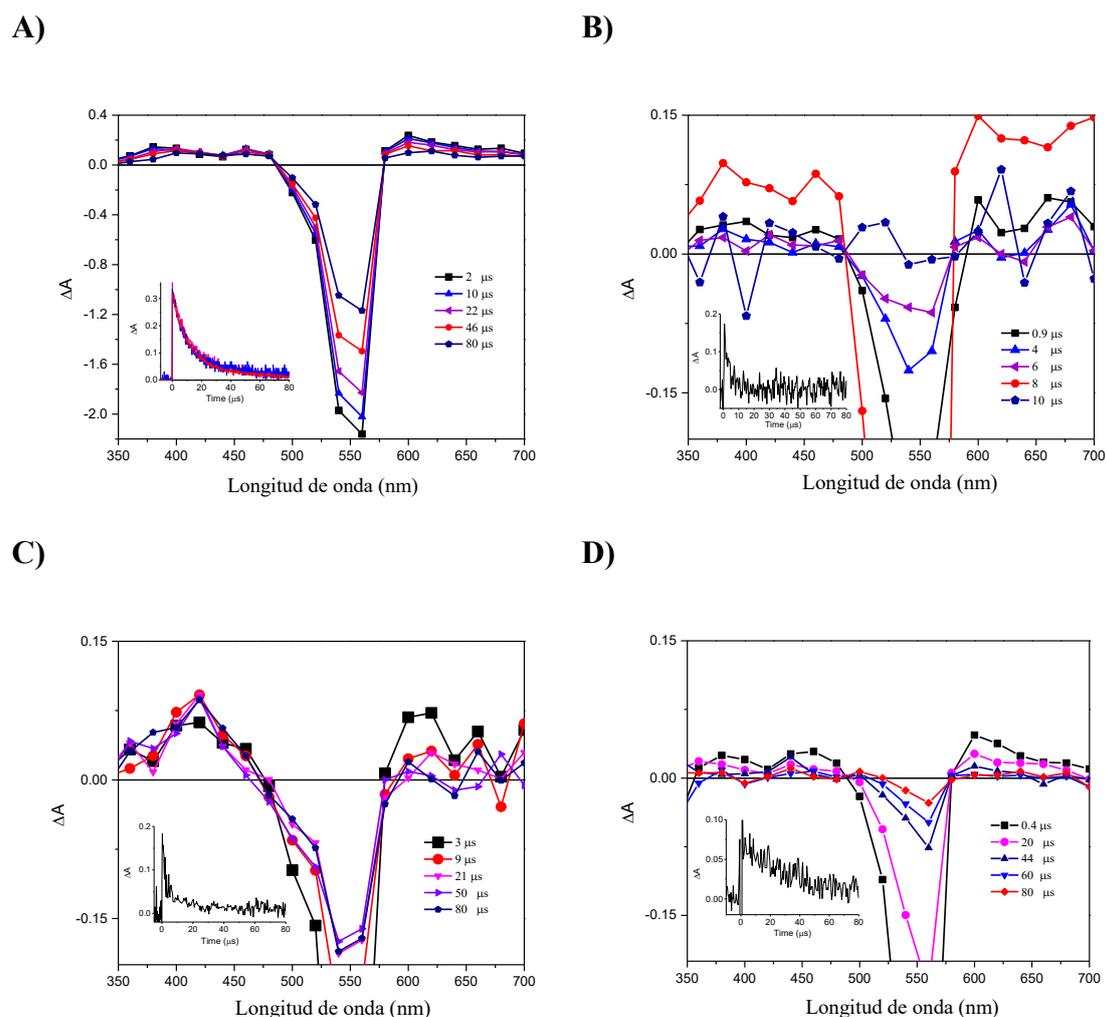


Figura 26. Espectros de absorción transitoria de disoluciones acuosas de RB en diferentes momentos tras el pulso láser obtenido: en ausencia de los fármacos (A), y en presencia de ACF $3 \times 10^{-4} M$ (B), DCF $3 \times 10^{-4} M$ (C), y OFX $2 \times 10^{-4} M$ (D). La absorbancia a 532 nm se fijó en 0.2 para todas las disoluciones. Los recuadros del gráfico muestran la desactivación del ${}^3RB^*$ registradas a 600 nm en medio homogéneo (rosa), y en suspensiones de NPs de SiO₂-RB (azul) y Fe₃O₄@ SiO₂-RB (rojo). Los recuadros de B, C y D muestran la desactivación del ${}^3RB^*$ registradas a 600 nm en presencia de cada fármaco a la concentración utilizada.

Además, no se observaron diferencias en la intensidad de la señal ni en el tiempo de vida de ${}^3RB^*$ (τ_T ca. 63 μs) entre los sistemas homogéneos y heterogéneos (véase en los recuadros de Figura 26 A). Estos resultados concuerdan con el porcentaje de superficie cubierta por RB en la superficie de las NPs SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB determinado por espectroscopía UV-Vis (aproximadamente 1/8 y 1/4 respectivamente de la superficie total de las NPs), donde cualquier interacción del RB entre su estado excitado y su estado fundamental es casi imposible.

Así, puesto que las propiedades fotofísicas de $^1\text{RB}^*$ y $^3\text{RB}^*$ no se modificaron tras la unión covalente de RB a NPs con y sin núcleo de magnetita, el rendimiento cuántico de cruce intersistema de RB (Φ_{ISC}) en las NPs sería aproximadamente el mismo que el descrito para RB en disoluciones homogéneas ($\Phi_{\text{ISC}} = 0.8 - 0.98$) [72,101]. Por lo tanto, se obtuvieron los espectros de absorción transitoria tras la adición de los fármacos a partir de disoluciones acuosas de RB (Figura 26 B-D). No se observaron nuevas señales, excepto la de un radical derivado de la anilina generado a partir de la reacción de transferencia de electrones del DCF [136]. Teniendo en cuenta estos resultados, y que la reactividad de $^1\text{RB}^*$ también resultó ser similar en los tres sistemas, las constantes de velocidad bimoleculares entre $^3\text{RB}^*$ y ACF, DCF y OFX (k_{qT}) sólo se determinaron en el medio homogéneo (Figura 27).

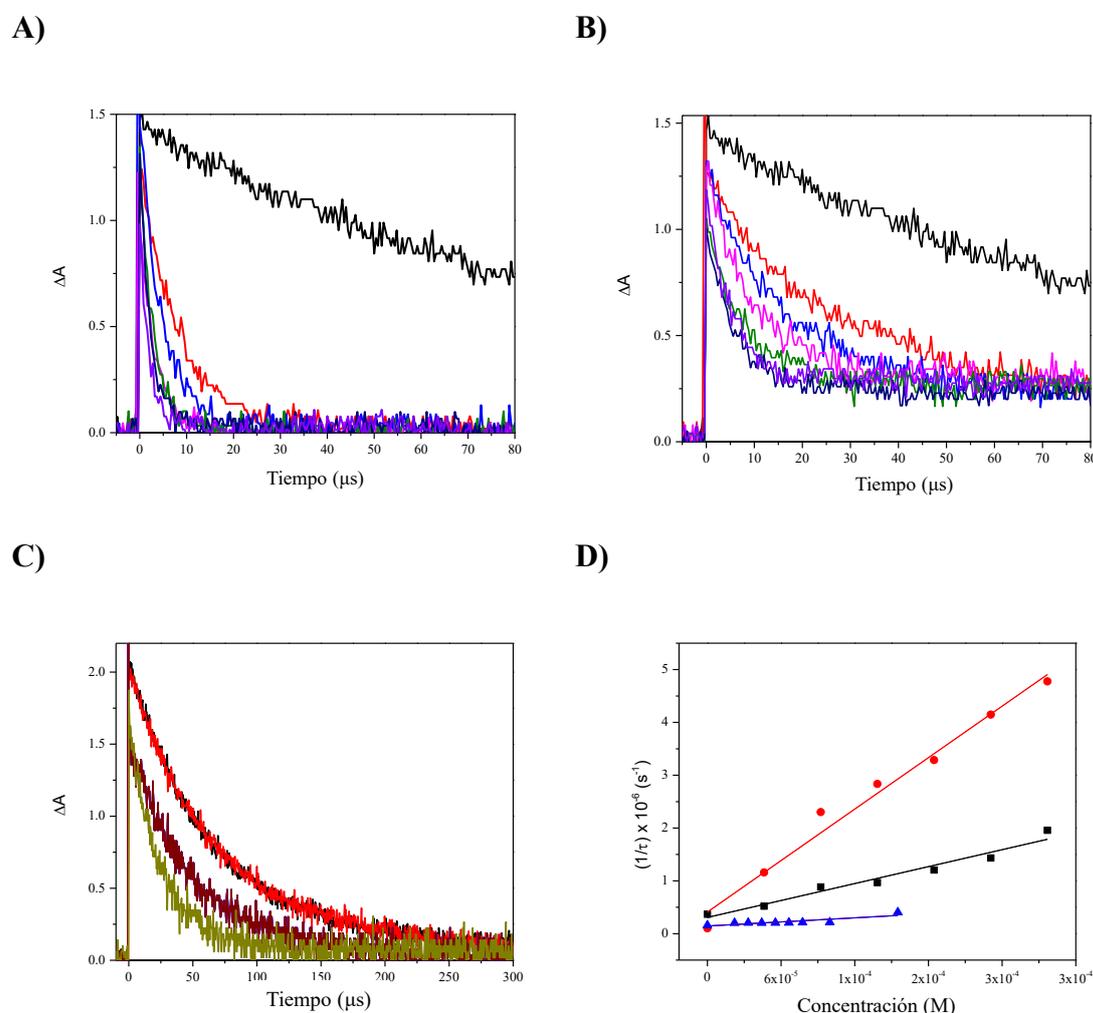


Figura 27. Gráficos de cinéticas monitorizadas a 540 nm tras la excitación del pulso del láser de RB ($Abs = 0.2$ at $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) en presencia de concentraciones crecientes de A) ACF, B) DCF y C) OFX. D) Gráficos de Stern-Volmer correspondientes a ACF (círculos rojos), DCF (cuadrados negros) y OFX (triángulos azules). Todos los experimentos se realizaron en medio acuoso bajo N_2 .

Los valores determinados (ver

Tabla 3) concuerdan con los valores ΔG estimados (Tabla 2). Curiosamente, los valores de k_{qT} obtenidos para los tres fármacos resultaron ser 10 veces superiores a los descritos en la bibliografía [66]. Sin embargo, nuestros datos se han determinado en medio acuoso y los reportados en la literatura se obtuvieron utilizando acetonitrilo como disolvente y es bien sabido que los disolventes polares como el agua favorecen los mecanismos de Tipo I debido a su mayor capacidad para estabilizar las especies cargadas. Por lo tanto, estos resultados revelan que para analizar la cinética en reacciones fotosensibilizadas, el k_{qT} debe determinarse utilizando el disolvente del medio de reacción, especialmente cuando el disolvente es agua.

Tabla 3. Constantes de desactivación del $^3RB^*$ (k_{qT}) en medio acuoso, y constantes de la desactivación de oxígeno singlete (k_{q1O2}) en agua deuterada para los tres fármacos.

Fotocatalizador	Q	$k_{qT} / M^{-1} s^{-1}$	$k_{q1O2} / M^{-1} s^{-1}$
RB	ACF	$(1.5 \pm 0.09) \times 10^9$	$(3.4 \pm 0.25) \times 10^6$
	DCF	$(5.0 \pm 0.43) \times 10^8$	$(4.7 \pm 0.12) \times 10^6$
	OFX	$(1.2 \pm 0.26) \times 10^8$	$(1.6 \pm 0.13) \times 10^7$

Generación y reactividad del 1O_2

La generación de oxígeno singlete también se registró en una disolución homogénea de RB y en suspensiones de NPs de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB utilizando D₂O como disolvente. Incluso en este caso, no se observaron diferencias en la intensidad de la señal ni en el tiempo de vida del 1O_2 entre los sistemas homogéneos y heterogéneos, como se muestra en la Figura 28.

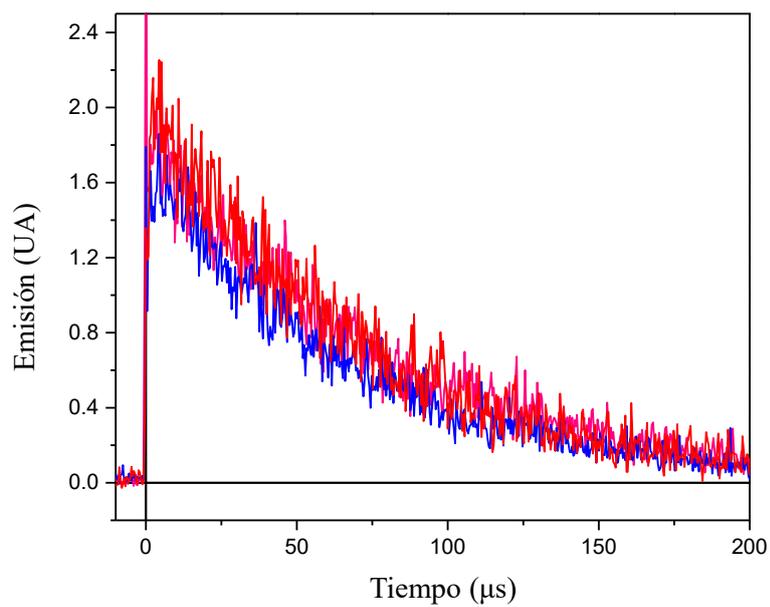


Figura 28. Gráficos de desactivación de la emisión registradas a 1270 nm correspondientes al $^1\text{O}_2$ generado en D_2O bajo aire para los siguientes sistemas: RB homogéneo (rosa), y suspensiones $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (azul) y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (rojo). $\text{Abs}_{532} = 0.2$ y $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Por esta razón, las constantes de velocidad bimolecular entre $^1\text{O}_2$ and ACF, DCF y OFX ($k_{q1\text{O}_2}$) sólo se determinaron en la fase homogénea (Figura 29), las constantes de velocidad bimoleculares obtenidas se muestran en la

Tabla 3. En estos experimentos, el RB se sustituyó por perinaftenona (PN) como generador de oxígeno singlete debido a su mayor rendimiento de formación de $^1\text{O}_2$ [137].

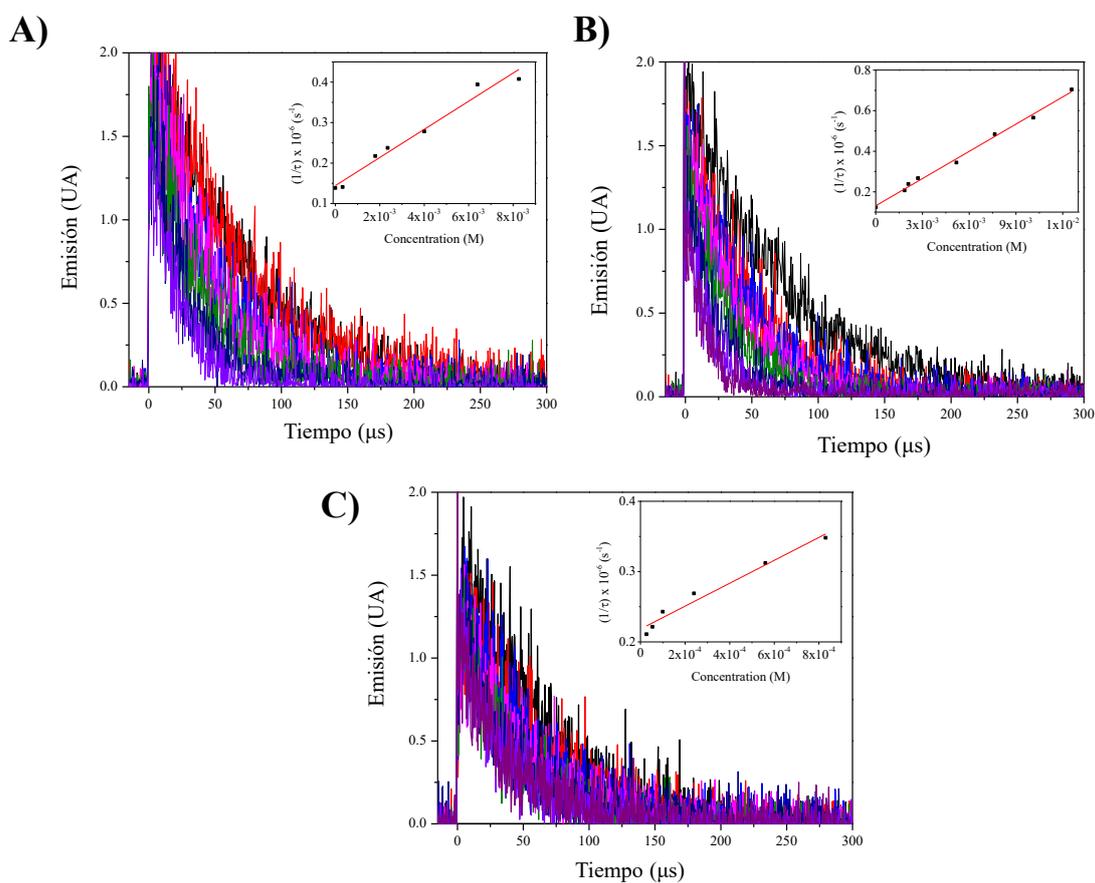


Figura 29. Gráficos de desactivación registradas a 1270 nm correspondientes al $^1\text{O}_2$ generado tras la excitación del pulso del láser de una disolución de PN en D_2O en aire ($\text{Abs} = 0.2$ a 355 nm) en presencia de concentraciones crecientes de A) ACF (hasta $8 \times 10^{-3} \text{ M}$), B) DCF (hasta $1 \times 10^{-2} \text{ M}$) y C) OFX (hasta $8 \times 10^{-4} \text{ M}$). Los recuadros corresponden a los gráficos de Stern-Volmer.

Análisis cinético

Todas las constantes de velocidad de desactivación de los estados excitados singlete y triplete del RB y de los dos fotocatalizadores heterogéneos, la desactivación del oxígeno singlete, junto con la concentración empleada de los fármacos y los parámetros fotofísicos del RB se combinaron para evaluar la contribución de cada vía potencial de desactivación, En primer lugar, se resumen los datos necesarios para el análisis cinético:

$$\Phi_F = 0.018 [3]$$

$\Phi_{ISC} = 0.76 - 0.98 [72,101]$; se ha utilizado aquí un valor de 0.76.

$$\Phi_{IC} = 0.222 \text{ (valor obtenido a partir de: } 1 - (\Phi_{ISC} + \Phi_F)\text{).}$$

$$\tau_F = 1 \times 10^{-10} \text{ s [134]}$$

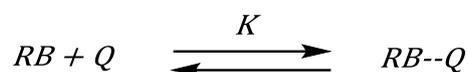
$$\tau_T = 6.3 \times 10^{-5} \text{ s (Este trabajo)}$$

$$[O_2] \text{ en agua} = 2.9 \times 10^{-4} \text{ M [135]}$$

$$\tau_{1O_2} = 3.5 \times 10^{-6} \text{ s [138]}$$

$$k_d \text{ (en agua)} = 7.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [135]$$

El fotocatalizador (RB) desde su estado fundamental, puede formar un complejo con los fármacos (Q), el porcentaje de fotocatalizador que participa en él (suponiendo una estequiometría 1:1) se muestra en la ecuación 15.



$$\text{Ecuación 13: } K = \frac{[RB \cdots Q]}{([RB] - [RB \cdots Q])([Q] - [RB \cdots Q])}$$

Donde:

[RB] y [Q] son las concentraciones utilizadas (1×10^{-6} M y 1×10^{-5} M, respectivamente) y [RB...Q] es la concentración del complejo formado.

Sobre la base de las constantes de equilibrio obtenidas experimentalmente, y a las concentraciones de [RB] y [Q] empleadas, se puede suponer con seguridad que:

$$[RB \cdots Q] \ll [RB]$$

y

$$[RB \cdots Q] \ll [Q]$$

Ecuación 14:

$$[RB \cdots Q] \cong K \times [RB] \times [Q]$$

Dividiendo la ecuación 14 por la concentración de fotocatalizador, el porcentaje de formación del complejo puede ser obtenida como se muestra en la ecuación 15:

Ecuación 15:

$$[RB \cdots Q](\%) \cong K \times [Q] \times 100$$

Por lo que, la ecuación 16 describe el porcentaje de fotocatalizador capaz de alcanzar el estado de excitación singlete:

Ecuación 16:

$${}^1(RB)^* \text{ formación } (\%) = 100 - [RB \dots Q](\%) \approx 100 - K \times [Q] \times 100 = \\ = (1 - K \times [Q]) \times 100$$

La desactivación del ${}^1RB^*$ puede llevarse a cabo por cuatro procesos diferentes: emisión (Φ_F/τ_S), conversión interna (Φ_{IC}/τ_S), cruce intersistema (Φ_{ISC}/τ_S), y la desactivación por los fármacos ($k_{qS}[Q]$), como se describe en la ecuación 17.

Ecuación 17:

$$\sum \text{Proceso desde } {}^1(RB)^* = \frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]$$

Así, el porcentaje del estado excitado singlete desactivado por los fármacos se muestra por la Ecuación 18 y la formación del estado excitado triplete se obtiene por la ecuación 19.

Ecuación 18:

$$\text{Desactivación de } {}^1(RB)^* (\%) = {}^1(RB)^* \text{ formation}(\%) \times \frac{k_{qS}[Q]}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]}$$

$$\text{Desactivación de } {}^1(RB)^* (\%) = (1 - K \times [Q]) \times 100 \\ \times \frac{k_{qS}[Q]}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]}$$

Ecuación 19:

$${}^3(RB)^* \text{ formación } (\%) = {}^1(RB)^* \text{ formación } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]}$$

$${}^3(RB)^* \text{ formación } (\%) = (1 - K \times [Q]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]}$$

Además, el estado excitado triplete también puede seguir dos vías diferentes: decaimiento intrínseco ($1/\tau_T$), desactivación de O_2 ($k_{qT}[O_2]$) desactivado por la formación de 1O_2 y la desactivación de los fármacos ($k_{qT}[Q]$), como se muestra en la ecuación 20:

$$\text{Ecuación 20: } \Sigma \text{ Processes from } {}^3(\text{RB})^* = \frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]$$

La contribución de las tres vías diferentes puede calcularse a partir de ecuación 21, ecuación 22 y ecuación 23:

Ecuación 21:

$$\text{Desactivación de } {}^3(\text{RB})^* (\%) = {}^1(\text{RB})^* \text{ formación } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{\frac{1}{\tau_T}}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

$$\text{Desactivación de } {}^3(\text{RB})^* (\%) = (1 - K \times [\text{Q}]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{\frac{1}{\tau_T}}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

Ecuación 22:

${}^1\text{O}_2$ Formación (%)

$$= {}^1(\text{RB})^* \text{ formation } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{k_{qT}[\text{O}_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

${}^1\text{O}_2$ Formación (%)

$$= (1 - K \times [\text{Q}]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{k_{qT}[\text{O}_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

Ecuación 23:

$$\text{Desactivación de } {}^3(\text{RB})^* (\%) = {}^1(\text{RB})^* \text{ formación } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{k_{qT}[\text{Q}]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

$$\text{Desactivación } {}^3(\text{RB})^* (\%) = (1 - K \times [\text{Q}]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[\text{Q}]} \times \frac{k_{qT}[\text{Q}]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[\text{O}_2] + k_{qT}[\text{Q}]}$$

Una vez formado el ${}^1\text{O}_2$ podría seguir dos vías: decaimiento intrínseco ($1/\tau_{102}$) y la desactivación por los fármacos ($k_{q102}[\text{Q}]$), de acuerdo con la ecuación 24 y 25, respectivamente.

Ecuación 24:

Desactivación of 1O_2 (%)

$$= {}^1(RB)^* \text{ formación } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]} \times \frac{k_{qT}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[O_2] + k_{qT}[Q]} \times \frac{1/\tau_{1O_2}}{1/\tau_{1O_2} + k_{q1O_2}[Q]}$$

Desactivación de 1O_2 (%)

$$= (1 - K \times [Q]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]} \times \frac{k_{qT}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[O_2] + k_{qT}[Q]} \times \frac{1/\tau_{1O_2}}{1/\tau_{1O_2} + k_{q1O_2}[Q]}$$

Ecuación 25:

$$\text{Desactivación de } ^1O_2 (\%) = {}^1(RB)^* \text{ formación } (\%) \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]} \times \frac{k_{qT}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[O_2] + k_{qT}[Q]} \times \frac{k_{q1O_2}[Q]}{1/\tau_{1O_2} + k_{q1O_2}[Q]}$$

Desactivación de 1O_2 (%)

$$= (1 - K \times [Q]) \times 100 \times \frac{\frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S}}{\frac{\Phi_F}{\tau_S} + \frac{\Phi_{IC}}{\tau_S} + \frac{\Phi_{ISC}}{\tau_S} + k_{qS}[Q]} \times \frac{k_{qT}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + k_{qT}[O_2] + k_{qT}[Q]} \times \frac{k_{q1O_2}[Q]}{1/\tau_{1O_2} + k_{q1O_2}[Q]}$$

La contribución calculada de cada proceso de desactivación se muestra en la Tabla 4. Como se podía anticipar a partir del tiempo de vida del estado excitado singlete de RB, la contribución de la desactivación del $^1RB^*$ es despreciable. Sin embargo, la asociación entre el RB y los fármacos da lugar a complejos que finalmente alcanzan el estado de excitación singlete y pueden dar lugar a la oxidación de los fármacos por transferencia de electrones. La contribución de esta vía depende del valor de la constante de asociación, por lo que es la más importante para el caso del OFX. No obstante, en casos anteriores sobre riboflavina con constantes de asociación bajas a contaminantes, la formación de complejos fue la única especie responsable de la fotodegradación global [125]; por tanto, no debe despreciarse su contribución en el caso de ACF y DCF. Finalmente, bajo la concentración empleada de los fármacos (5×10^{-5} M) y considerando que el tiempo de vida del 1O_2 en agua es de *ca.* 3.5 μ s, la contribución al mecanismo de Tipo II resulta despreciable.

Tabla 4. Reactividad estimada para las diferentes vías en la fotodegradación de DCF, ACF y OFX.

	Q	[RB ^{••} Q] formación (%)	Tipo I Desactivación de ¹ RB* por Q (%)	Tipo I Desactivación de ³ RB* por Q	Tipo II Desactivación ¹ O ₂ por Q (%)
RB	ACF	0.10	<0.01	0.48	0.013
	DCF	0.08	<0.01	1.58	0.017
	OFX	0.51	<0.01	0.38	0.059
SiO₂-RB	ACF	0.24	<0.01	0.48	0.013
	DCF	0.04	<0.01	1.58	0.017
	OFX	2.18	<0.01	0.38	0.058
Fe₃O₄@SiO₂-RB	ACF	0.26	<0.01	0.48	0.013
	DCF	0.15	<0.01	1.58	0.017
	OFX	4.82	<0.01	0.37	0.057

Es más, la inactivación observada de las bacterias además podría explicarse en base a la también esperada asociación de las bacterias sobre las NPs heterogéneas SiO₂-RB y Fe₃O₄@-SiO₂-RB, que podría producir procesos de transferencia de electrones con el singlete, como se demostró previamente utilizando compuestos de la pared celular de las bacterias [139]. Sin embargo, no se puede descartar la oxidación de las membranas bacterianas por sus reacciones con el ¹O₂ generado a partir del ³RB*. En el caso de la fotodegradación de fármacos, este fenómeno ocurre principalmente a través de la transferencia de electrones al ³RB* y al ¹RB* de vida corta tras la adsorción, como se muestra en la Figura 30. Además, la reutilización de las NPs heterogéneas SiO₂-RB y Fe₃O₄@-SiO₂-RB NPs será óptima tras 1 hora de irradiación en las condiciones evaluadas. Posteriormente, la velocidad en la fotodegradación de los fármacos comienza a descender, asociada a la disminución en la concentración del contaminante donador de electrones, y consecuentemente a una mayor producción de ¹O₂. Finalmente, el ¹O₂ producirá la oxidación del RB, pero después de 1 hora, su degradación aún es insignificante (ver Figura 20 B).

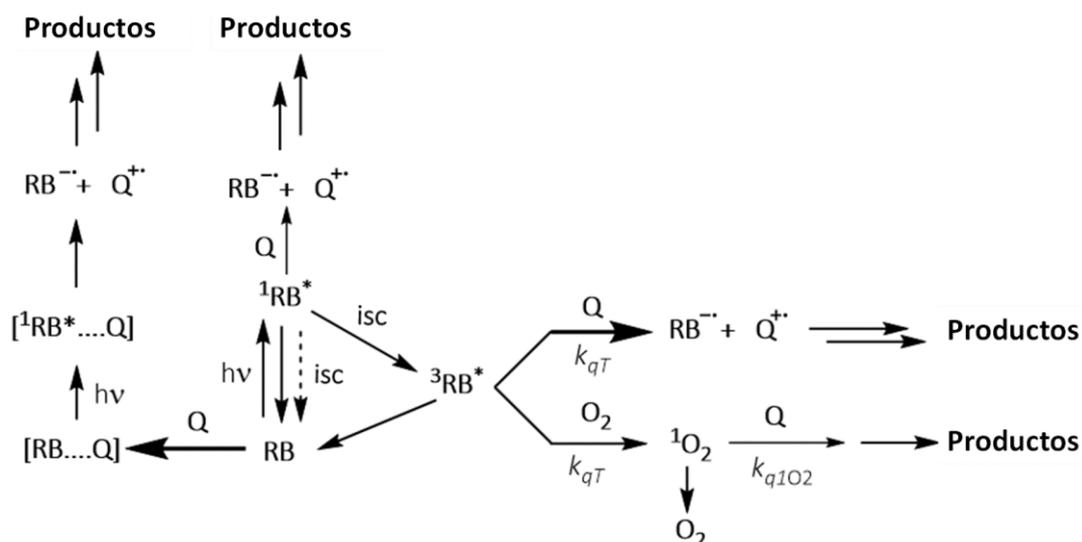


Figura 30. Vía mecánica general propuesta para la fotodegradación de ACF, DCF y OFX por RB, NPs $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{-SiO}_2\text{-RB}$.

Conclusiones

Se han preparado nuevos fotocatalizadores heterogéneos nanoestructurados que incorporan en su superficie RB. El RB fue anclado covalentemente a la superficie de nanopartículas de SiO_2 , y nanopartículas de SiO_2 que incorporan un núcleo de magnetita, respectivamente. Ambos han demostrado ser eficientes en la fotodegradación de ACF, DCF y OFX bajo irradiación con luz visible, con mayor eficacia en el caso del DCF. Curiosamente, las propiedades fotofísicas del RB permanecen inalteradas, aunque la fotoestabilidad del RB anclado a los materiales heterogéneos es mayor que en medios homogéneos. La presencia del núcleo de magnetita en el fotocatalizador heterogéneo facilita su recuperación del medio y aumenta la concentración de RB en la superficie, sin modificar las propiedades fotofísicas del fotocatalizador heterogéneo con RB. Estos nuevos fotocatalizadores también muestran una gran eficacia en la fotoinactivación de bacterias Gram positivas. El análisis de todas las constantes que intervienen en las degradaciones fotosensibilizadas de ACF, DCF y OFX ha evidenciado que los procesos de transferencia electrónica desde los tres fármacos al RB en disoluciones homogéneas y como fotocatalizador heterogéneo, son el paso inicial de sus oxidaciones. Además, en el caso de OFX la asociación inicial a RB juega un papel significativo.

CAPÍTULO II

4.2 Síntesis y caracterización de micropartículas de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB para la degradación de fármacos en aguas

Introducción

En la actualidad se han implementado diversos métodos para el tratamiento de aguas. Uno de los más actuales es la fotocatalisis heterogénea basada en el uso de colorantes orgánicos que es conocida como una de las tecnologías de energía alternativa más prometedoras debido a su capacidad para convertir directamente la luz en energía química [140,141].

La heterogeneización de fotosensibilizadores en micropartículas de sílice es una opción viable para este tipo de aplicaciones [142]. Las micropartículas de sílice se han utilizado como fotocatalizadores en diferentes formas como nanoesferas, partículas magnéticas, fibras de sílica, entre otros [4,107,143].

El Rosa de Bengala (RB) es un colorante orgánico utilizado como fotosensibilizador de uso común que posee una fuerte banda de absorción a $\lambda_{\text{max}} = 550$ nm, además de ser altamente soluble en agua (1 mg/mL), representando una gran ventaja para su uso en la descontaminación de aguas [134]. Tras la exposición a la iluminación de luz visible, el Rosa de Bengala se excita desde un estado fundamental de menor energía a su estado excitado singlete ($^1\text{RB}^{2-*}$) que pasa a su estado triplete ($^3\text{RB}^{2-*}$) con un eficiente cruce entre sistemas ($\Phi_{\text{ISC}} = 0.9$ en agua y metanol). Desde $^3\text{RB}^{2-*}$ puede reaccionar con el oxígeno molecular de su entorno, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) [130,134]. Así, el RB, además de contar con una capacidad para generar $^1\text{O}_2$, su principal ventaja es que al estar anclado covalentemente a una superficie de SiO₂ posee, como se demostró en el capítulo anterior, una considerable resistencia a su degradación, a su liberación en el medio de reacción, así como una más fácil recuperación de la mezcla de reacción una vez finalizado el proceso. Así, un soporte con tamaño micrométrico podría ayudar a mejorar algunas de estas propiedades. Además de implementar un núcleo de magnetita más grande facilitaría aún más su recuperación del

medio de reacción [83]. Así, en este capítulo se planteó estudiar la influencia del tamaño micrométrico del soporte y un mayor campo magnético en la síntesis de fotocatalizadores heterogéneos con recubrimiento de RB unido covalentemente, así como en sus propiedades fotocatalíticas. Para ello, micropartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{SiO}_2\text{-RB}$ se sintetizaron, caracterizaron y se evaluaron en la degradación del DCF en medio acuoso.

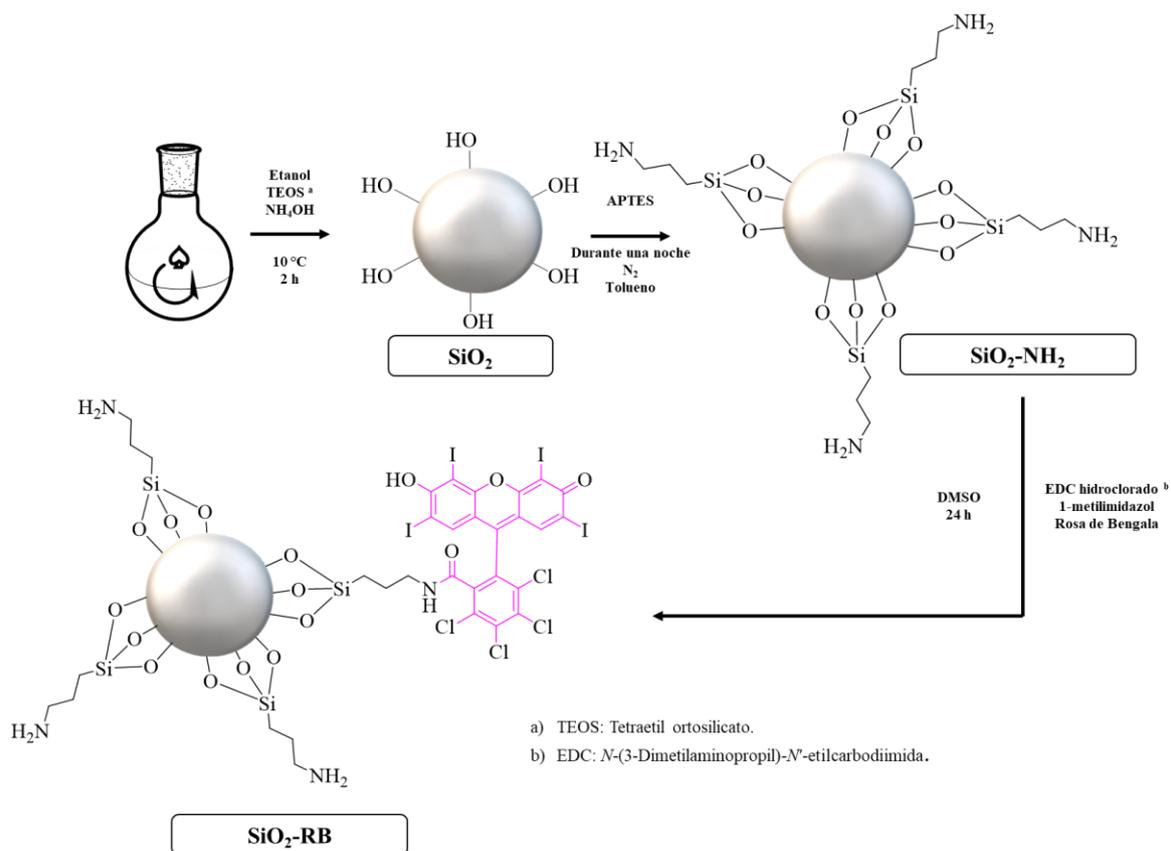
Resultados y discusión

Síntesis de micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$

Las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ fueron realizadas en diferentes etapas como se muestra en los esquemas de la Figura 31. Para las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (Figura 31 A) se utilizó el método de stöber (ver detalles en la sección 3.2 Síntesis de fotocatalizadores), mientras que para las micropartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$, primero se obtuvieron las microesferas de Fe_3O_4 . Describiendo brevemente la síntesis, inicialmente se disolvió $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en etilenglicol para ayudar a la obtención de partículas monodispersas [104], después, se añadió acetato de sodio que genera una estabilización electrostática para evitar la aglomeración de partículas además de ayudar en la reducción mediada por etilenglicol de FeCl_3 a Fe_3O_4 . Posteriormente se añadió polietilenglicol como surfactante y como medida adicional para evitar la aglomeración de las partículas. Finalmente se aumentó la temperatura a $200\text{ }^\circ\text{C}$ [103,104]. Estas microesferas de Fe_3O_4 fueron recubiertas con SiO_2 mediante un tratamiento sonoquímico a temperatura ambiente. Las microesferas de Fe_3O_4 se suspendieron en etanol y se dispersaron en un sonicador, seguido de la adición de amoníaco acuoso y finalmente de TEOS el cual se hidroliza regulando así, el tamaño de la coraza de sílice (Figura 31 B).

La unión covalente de RB a las micropartículas de SiO_2 y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ se realizó en dos pasos (Figura 31 A y B). Como primer paso, las partículas se trataron durante la noche con 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) en tolueno a 150°C para obtener $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, lo que facilita la su posterior unión con el RB dejando una monocapa de grupos aminos libres. El segundo paso fue tratarlas con RB, EDC y 1-metilimidazol como agente de acoplamiento [106].

A)



B)

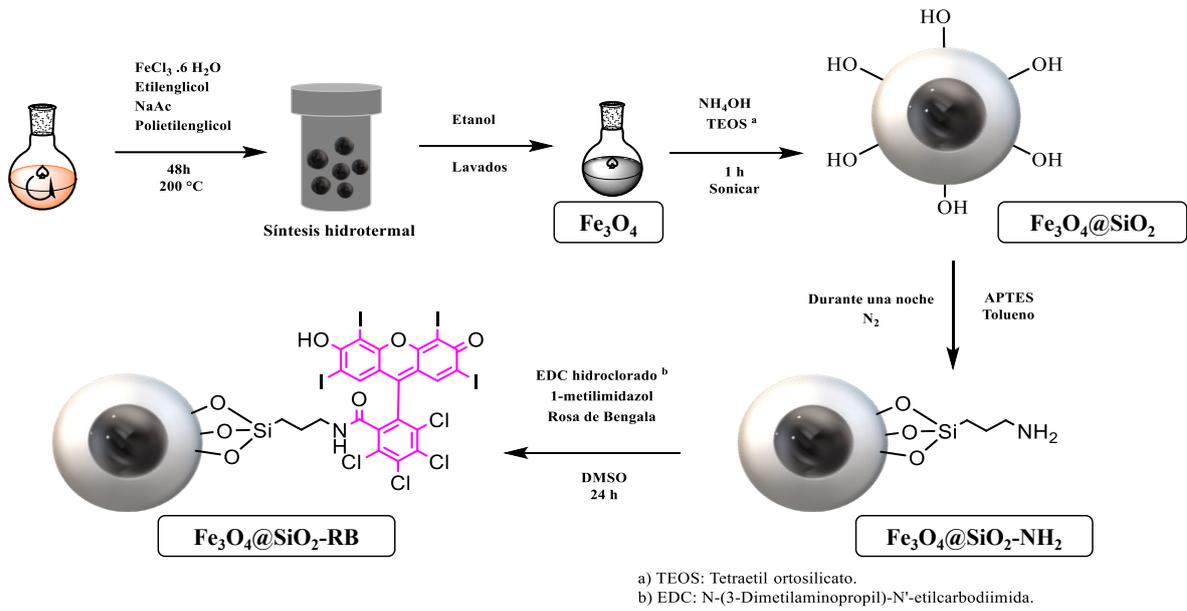


Figura 31. Síntesis de las micropartículas de A) $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y B) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-RB}$.

Caracterización de las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$

En la Figura 32 se observan las imágenes de TEM (Figura 32 A y B) y HRFESEM (Figura 32 C y D) de las micropartículas sintetizadas de $\text{SiO}_2@\text{RB}$ mostrando una dispersión de tamaño medio de *aprox.* 456 ± 46 nm y una morfología esférica.

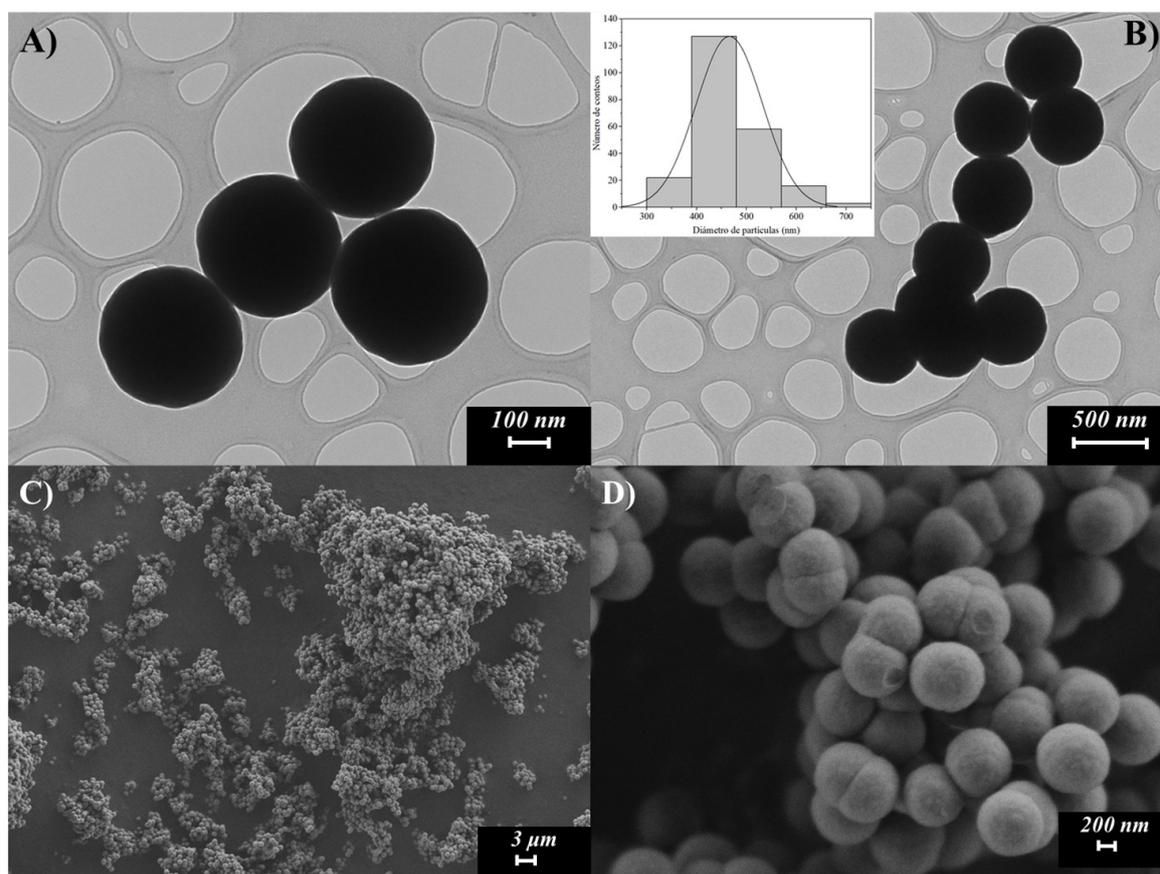


Figura 32. Imágenes de A y B) TEM y C y D) HRFESEM de la síntesis de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y su distribución de tamaños (recuadro de la derecha).

En la Figura 33 se observan las imágenes de TEM de las microesferas sintetizadas de Fe_3O_4 (Figura 33 A y B) mostrando una dispersión de tamaño medio de *aprox.* 404.47 ± 83.56 nm y de las micropartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (Figura 33 C y D) *aprox.* 469.47 ± 77.99 nm. Donde se puede apreciar que las microesferas de Fe_3O_4 tienen una morfología esférica sólida con una superficie rugosa. Posteriormente del recubrimiento con TEOS, el tamaño de las microesferas aumentó y la superficie se observó más uniforme que muestra claramente la estructura de núcleo-coraza (Figura 33 C y D). Lo que demuestra la adición del SiO_2 a la superficie de la Fe_3O_4 .

Se sintetizaron micropartículas con una dispersión de tamaño medio de *aprox.* 456 ± 46 nm para $\text{SiO}_2\text{@RB}$ (Figura 32) y *aprox.* 469.47 ± 77.99 nm, para las micropartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}$ (Figura 33 C y D). Estas últimas tenían un núcleo de Fe_3O_4 (Figura 33 A y B) con un tamaño de *aprox.* 404.47 ± 83.56 nm. Como se puede observar en la Figura 32 y Figura 33 todos los materiales sintetizados muestran una morfología esférica.

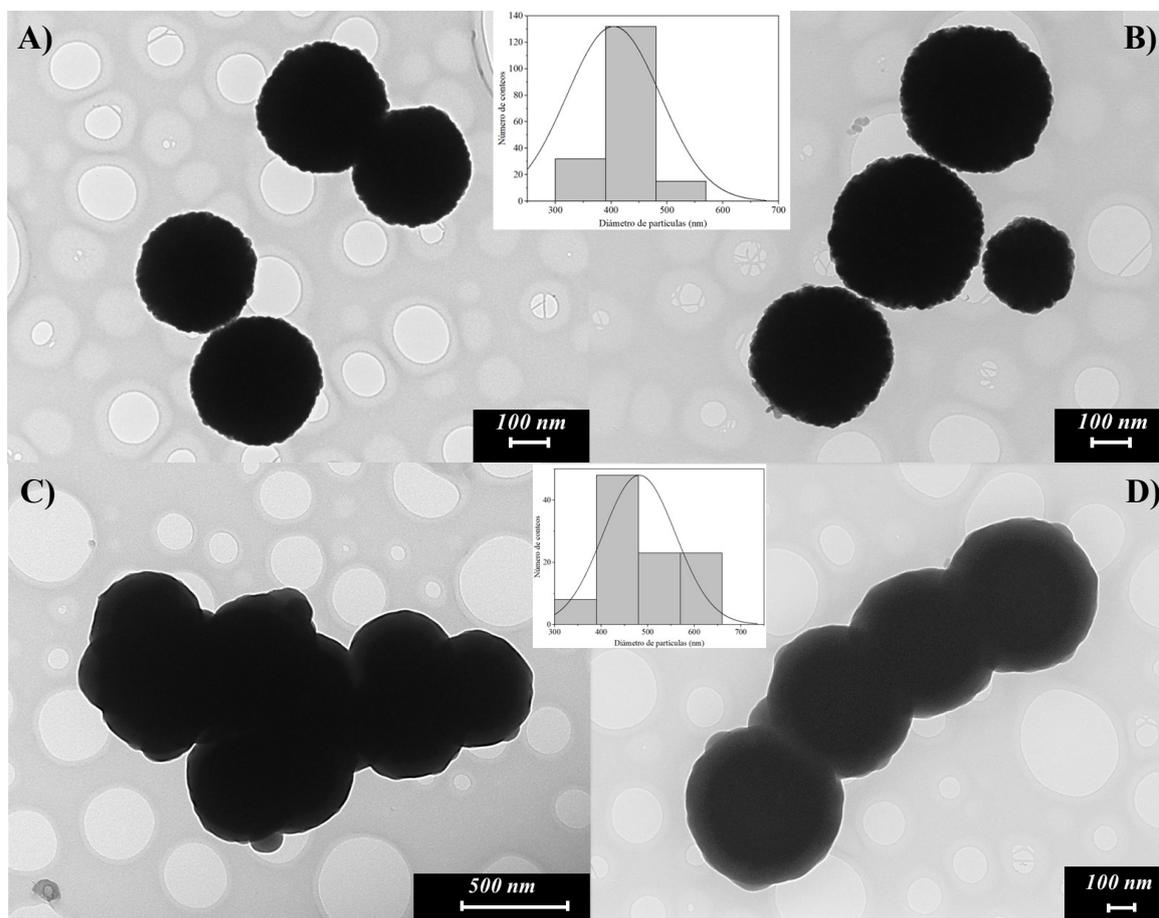


Figura 33. Imágenes de TEM de la síntesis de Fe_3O_4 A y B) y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}$ C y D) y su distribución de tamaños (recuadros al centro).

Para determinar la cantidad de RB unida covalentemente a la superficie de las micropartículas se determinó la cantidad de yodo mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), mostrando valores para las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ de 3.31 ± 0.06 mg I/g de Iodo y para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}$ de 1.46 ± 0.18 mg I/g.

Además, se comprobó la presencia del RB mediante la técnica de espectroscopía de reflectancia difusa. Los espectros obtenidos para las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ mostraron bandas con máximos de absorción a 561 y 526 nm (Figura 34). Estos valores eran muy similares a los obtenidos con el RB en estado sólido (máximos de absorción a

568 y 527 nm. Sin embargo, las micropartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ tenían sus máximos de absorción a 455 y 326 nm. Así, el “core” de magnetita enmascara los máximos del RB. De hecho, a simple vista, las micropartículas de presentan un color negro.

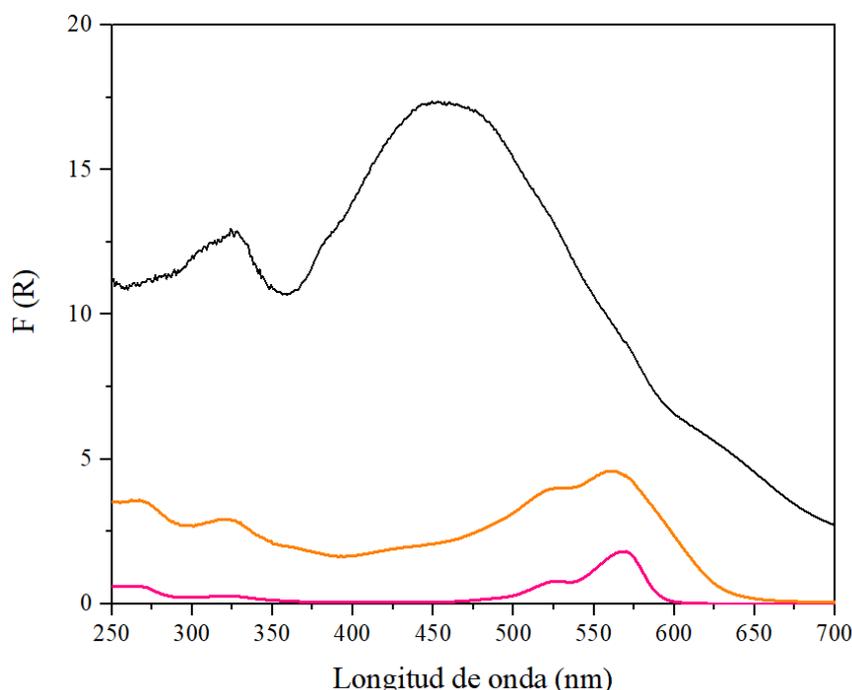


Figura 34. Espectros de reflectancia difusa con corrección de la línea de base de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ (negro), $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (naranja), $\text{SiO}_2\text{-RB}$ (naranja) y RB (rosa).

Para calcular el porcentaje del área cubierta por las moléculas de RB en la superficie de las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones; 1) las micropartículas son esferas perfectas y 2) el área de la molécula de RB se tomó de Pubchem, (Figura 18 C).

A continuación, se describen los cálculos del porcentaje del área superficial cubierta por las moléculas de RB para $\text{SiO}_2\text{-RB}$. A partir de las ecuaciones 1 y 2 (ver en página 63), se calculó el volumen y el área de la esfera, partiendo del diámetro medio de las micropartículas de *aprox.* 456 nm obtenido de los experimentos de TEM. Por lo que una sola partícula de SiO_2 :

$$V_{\text{SiO}_2} = 5 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1}$$

$$A_{\text{SiO}_2} = 6.53 \times 10^5 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}$$

Posteriormente para determinar la masa de una sola micropartícula de SiO_2 (Ecuación 3, ver en página 63), se asume que tiene la misma densidad que el SiO_2 comercial que es de $d_{\text{SiO}_2} = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$, por lo tanto:

$$m_{SiO_2} = 4.96 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1} \times 2.65 \text{ g SiO}_2 \text{ cm}^{-3}$$

$$m_{SiO_2} = 1.31 \times 10^{-13} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}$$

Con los resultados obtenidos del ICP-MS se calculó, la carga de RB es del 0.66% (p/p) en las SiO₂-RB, basándose en la cantidad de yodo tras la digestión por microondas (valores de 3.31 ± 0.06 mg I/g).

Así, la masa de SiO₂ por g de SiO₂-RB es:

$$m_{SiO_2} = 1 - m_{RB} = 1 - \frac{0.66}{100} = 0.9934 \text{ g SiO}_2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \quad \text{Ecuación 26}$$

Posteriormente, se calculó el área superficial a partir de 1 g de las micropartículas de SiO₂-RB descrita de la ecuación 27:

$$A_{SiO_2-RB} = 0.9934 \text{ g SiO}_2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times \frac{6.53 \times 10^5 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}}{1.31 \times 10^{-13} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}} \quad \text{Ecuación 27}$$

$$A_{SiO_2-RB} = 4.95 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

Se calculó el número de moléculas de RB por g de micropartículas de SiO₂-RB descrito por la ecuación 28:

$$\text{Moléculas de RB} = 0.0066 \text{ g de RB} (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times \frac{1 \text{ mol}}{1017.64 \text{ g of RB}} \times \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$\text{Moléculas de RB} = 3.72 \times 10^{18} \text{ moléculas} (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

Una vez obtenida el área superficial y el área de las moléculas de RB sobre las micropartículas de SiO₂-RB, se procedió a calcular el área de las moléculas de RB obtenidas por g de micropartículas de SiO₂-RB, tomando en cuenta el valor del área de la molécula de RB que según los datos descritos en Pubchem es de $0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1}$, por lo que el área fue estimada de esta forma por la ecuación 29:

$$A_{RB} = 3.72 \times 10^{18} \text{ moléculas} (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times 0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1} \quad \text{Ecuación 29}$$

Por lo que el valor del área nos dice que un 66.6% de la micropartícula está cubierta por RB (ecuación 30):

$$A_{RB} = 3.3 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (\text{g SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

$$\frac{A_{RB}}{A_{SiO_2-RB}} \times 100 = 66.6 \% \quad \text{Ecuación 30}$$

Después, para las micropartículas de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB, de igual forma se calculó el volumen y el área de la esfera con las ecuaciones 1 y 2, utilizando el diámetro medio de las micropartículas de *aprox.* 469 nm obtenido de los experimentos de TEM. Por lo que una sola partícula de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB:

$$V_{Fe_3O_4@SiO_2} = 5.4 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1}$$

$$A_{Fe_3O_4@SiO_2} = 7 \times 10^5 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}$$

Para determinar la masa de una sola micropartícula de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB (Ecuación 3), se asume que tiene la misma densidad que el SiO_2 comercial que es de $d_{SiO_2} = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$, por lo tanto:

$$m_{Fe_3O_4@SiO_2} = 5.4 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ esfera}^{-1} \times 2.65 \text{ g SiO}_2 \text{ cm}^{-3}$$

$$m_{Fe_3O_4@SiO_2} = 1.4 \times 10^{-13} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}$$

De acuerdo con lo obtenido por el ICP-MS se calculó, la carga de RB es del 0.29 % (p/p) en las $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB, basándose en la cantidad de yodo tras la digestión por microondas (valores de $1.46 \pm 0.18 \text{ mg I/g}$).

Así, la masa de SiO_2 por g de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB es:

$$m_{Fe_3O_4@SiO_2} = 1 - m_{RB} = 1 - \frac{0.29}{100} = 0.9971 \text{ g SiO}_2 (\text{g Fe}_3\text{O}_4@SiO_2 - RB)^{-1} \quad \text{Ecuación 31}$$

Posteriormente, se calculó el área superficial a partir de 1 g de las micropartículas de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB (ecuación 32):

$$A_{Fe_3O_4@SiO_2-RB} = 0.9971 \text{ g SiO}_2 (\text{g Fe}_3\text{O}_4@SiO_2 - RB)^{-1} \times \frac{7 \times 10^5 \text{ nm}^2 \text{ esfera}^{-1}}{1.4 \times 10^{-13} \text{ g SiO}_2 \text{ esfera}^{-1}} \quad \text{Ecuación 32}$$

$$A_{Fe_3O_4@SiO_2-RB} = 4.9 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (\text{g Fe}_3\text{O}_4@SiO_2 - RB)^{-1}$$

Para el área de RB se calculó primero el número de moléculas de RB por g de micropartículas de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB (ecuación 33):

$$\text{Moléculas de RB} = 0.0029 \text{ g de RB} (\text{g Fe}_3\text{O}_4@SiO_2 - RB)^{-1} \times \frac{1 \text{ mol}}{1017.64 \text{ g of RB}} \times \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \quad \text{Ecuación 33}$$

$$\text{Moléculas de RB} = 1.7 \times 10^{18} \text{ moléculas} (\text{g Fe}_3\text{O}_4@SiO_2 - RB)^{-1}$$

Una vez obtenida el área superficial y el área de las moléculas de RB sobre las micropartículas de $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB, se procedió a calcular el área de las moléculas de

RB obtenidas por g de micropartículas de Fe₃O₄@SiO₂-RB, tomando en cuenta el valor del área de la molécula de RB que según los datos descritos en Pubchem es de 0.892 nm² molécula⁻¹, de esta forma el área fue estimada por la ecuación 34:

$$A_{RB} = 1.7 \times 10^{18} \text{ moléculas } (g \text{ Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2 - \text{RB})^{-1} \times 0.892 \text{ nm}^2 \text{ molécula}^{-1} \quad \text{Ecuación 34}$$

Por lo que el valor del área nos dice que un 30.9 % de la micropartícula de Fe₃O₄@SiO₂-RB está cubierta por RB (ecuación 35):

$$A_{RB} = 1.51 \times 10^{18} \text{ nm}^2 (g \text{ Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2 - \text{RB})^{-1}$$

$$\frac{A_{RB}}{A_{\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2\text{-RB}}} \times 100 = 30.9 \% \quad \text{Ecuación 35}$$

Propiedades Fotofísicas del RB en micropartículas de SiO₂-RB

Las propiedades fotofísicas de las micropartículas de Fe₃O₄@SiO₂-RB debido a que su color negro no permitía analizar las propiedades del RB anclado en su superficie. Por ello solo se estudiaron las propiedades del RB en micropartículas de SiO₂-RB. Además, debido a la dispersión de luz que generaban se tuvieron que estudiar en fase sólida. Así, en la Figura 35 se muestran los espectros de fluorescencia del RB disuelto y soportado en la fase sólida de las micropartículas de SiO₂-RB. Estos se registraron en el rango entre 520 y 800 nm usando como longitud de onda de excitación (λ_{ex}) 500 nm. Así se observó que el espectro de emisión de las micropartículas de SiO₂-RB se desplaza hacia el rojo en comparación con el RB disuelto. Este efecto es habitual cuando el RB esta inmovilizado sobre algún soporte [144,145].

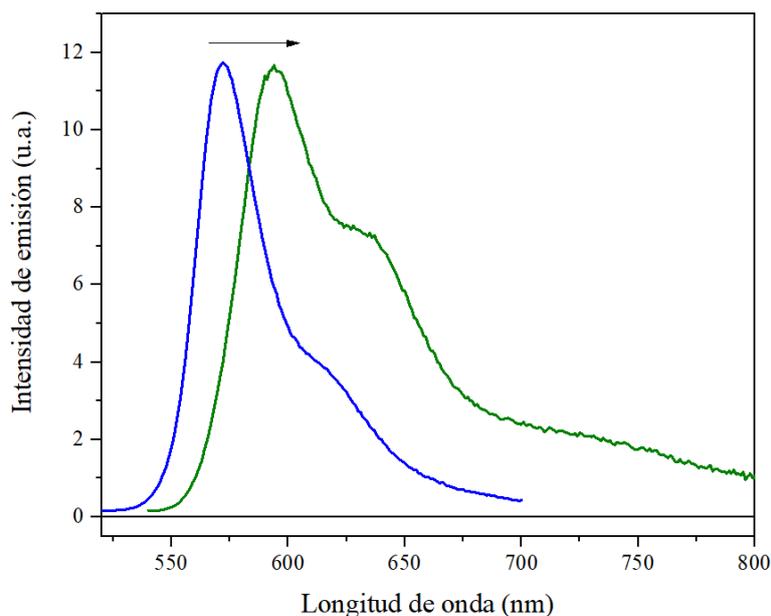


Figura 35. Espectros de emisión de fluorescencia de la SiO₂-RB (verde) y el RB como control en homogéneo (azul) a Abs= 0.7 at λ_{exc} = 500 nm in H₂O.

En la Figura 36 se muestran el resultado de los estudios que se realizaron sobre las micropartículas de SiO₂-RB utilizando la técnica de fotólisis de destello láser. El espectro de absorción transitoria obtenido en el rango de 300-800 nm usando una λ_{exc} = 532 nm sobre las micropartículas de SiO₂ en estado sólido bajo atmósfera de nitrógeno mostró máximos de absorción típicos del estado excitado triplete de RB [134]. Estudiando la desactivación del triplete de RB se pudo determinar un tiempo de vida de aproximadamente $1.13 \pm 0.25 \mu\text{s}$.

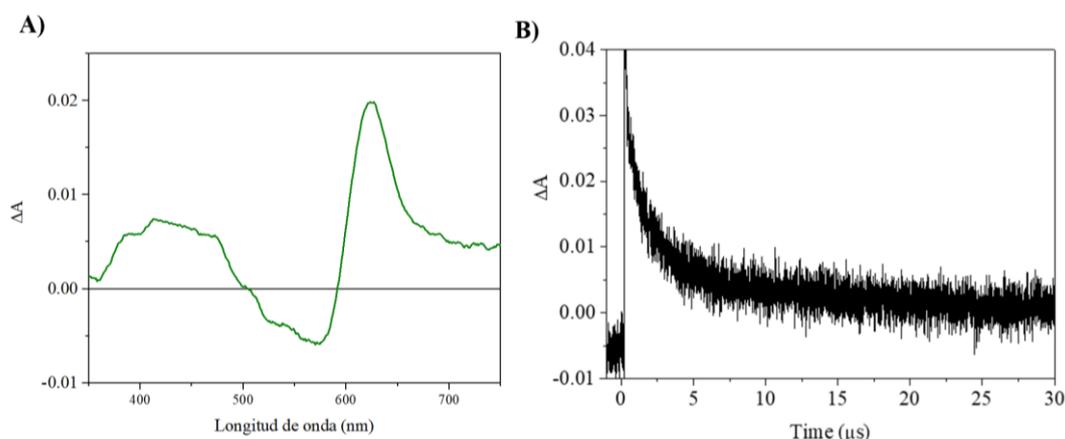


Figura 36. A) Espectros de absorción transitoria de las micropartículas de SiO₂-RB obtenido después del pulso del láser a λ_{exc} = 532 nm en sólido bajo atmósfera de aire. B) Señal correspondiente a la desactivación del ³RB* registradas a 620 nm.

Fotodegradación de contaminantes

La fotodegradación de DCF con las micropartículas de SiO₂-RB, Fe₃O₄@SiO₂-RB y RB en disolución fue monitoreada durante 6 horas bajo atmosfera de aire. Como se muestra en la Figura 37 el DCF se eliminó por completo tras 3 horas de irradiación en presencia de las micropartículas de SiO₂-RB, sin embargo, para las micropartículas de Fe₃O₄@SiO₂-RB solo se logró un 30 % de degradación del DCF en 6 horas. Antes de que comenzara la irradiación, ambas suspensiones de SiO₂-RB y Fe₃O₄@SiO₂-RB se dejaron en agitación durante 20 min en oscuridad mostrando una disminución del 17 % en la concentración inicial del DCF, por lo que se asumió que se produjo una adsorción en la superficie del fotocatalizador. La irradiación usando RB en fase homogénea como control mostraba una degradación del 36 % después de 6 horas de irradiación. Estos resultados mostraron por una parte que Fe₃O₄@SiO₂-RB tiene un “core” de magnetita que filtra mucha luz que deja de aprovechar el RB por lo que la reacción se ralentiza. Por otra parte, comparando estos resultados con los obtenidos con nanopartículas SiO₂-RB, se observa que, a la misma concentración de RB, las nanopartículas con RB fotodegradan menos rápido el DCF que las micropartículas de RB (ver Figura 19B en la página 66 y Figura 37, respectivamente).

La única diferencia que existía en las dos fotodegradaciones era la cantidad de DCF adsorbido al inicio del proceso de fotodegradación, el cual era mayor para las micropartículas que en las nanopartículas (*ca.* 17% y *ca.* 8 %, respectivamente). Esta diferencia de adsorción debe ser la causante de la mayor velocidad de fotodegradación. De hecho, este efecto se puede correlacionar con el área cubierta por RB sobre la superficie de los dos soportes (en las nanopartículas esta se calculó para ser *ca.* 12.5 % mientras en las microesferas era de *ca.* 67 %). Además, al igual que cuando se usaban, se observó que el RB tenía una mayor fotoestabilidad al estar covalentemente unido a la superficie de su soporte [4].

El hecho de que con un mejor recubrimiento de RB hubiera una mayor adsorción del contaminante y que esto produzca una más rápida fotodegradación, indirectamente demuestra que los procesos de transferencia electrónica entre el contaminante y el RB debe ser el mecanismo predominante en la fotodegradación de DCF como ya se había observado en los estudios fotofísicos realizados en el capítulo anterior con nanopartículas como soporte.

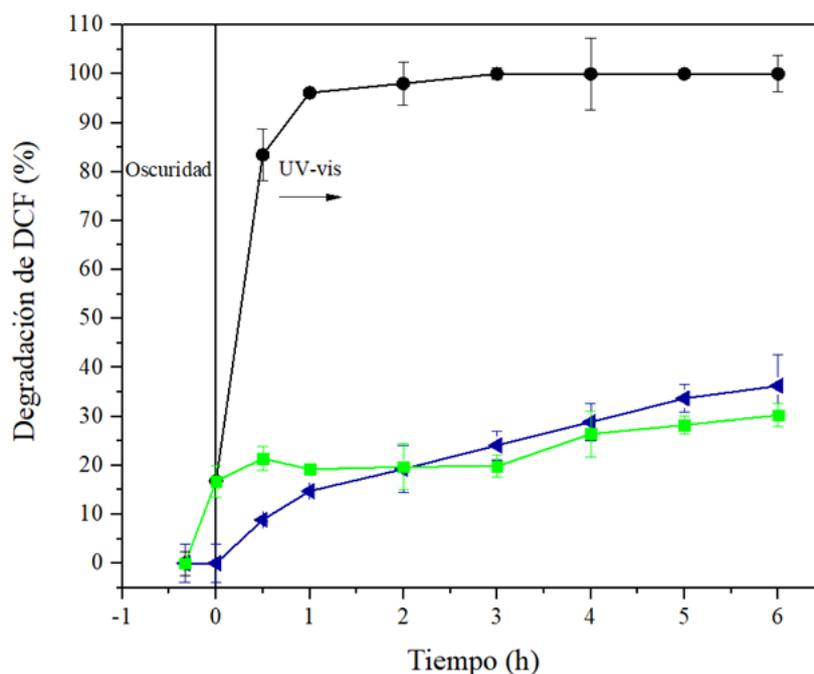


Figura 37. Evaluación de la eliminación de DCF ($C_0 = 5 \times 10^{-5} M$), frente al tiempo de irradiación en presencia de SiO_2 -RB (●), $Fe_3O_4@SiO_2$ -RB (■) y RB-homogéneo (▲) en atmósfera de aire. $[RB] = 5 \times 10^{-6} M$ en disolución acuosa.

Dispersión en diferentes medios de las micropartículas de SiO_2 -RB y $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB

En el proceso de síntesis, caracterización y estudios de fotodegradación con el DCF se observó que algunas propiedades de micropartículas de SiO_2 -RB y $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB no eran iguales. Así se vio que la dispersión de las micropartículas de SiO_2 -RB y $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB en diferentes medios no era la misma. En la Figura 38 se muestra el diferente comportamiento de los dos materiales. La dispersión de las micropartículas de SiO_2 -RB es buena en agua, pero en presencia de un disolvente orgánico como el acetato de etilo se coloca en la interfase, de la cual pasa al medio orgánico cuando el agua se vuelve alcalina (Figura 38 A). Sin embargo, las micropartículas de $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB, demostraron tener propiedades hidrofóbicas, aunque en presencia de mezclas acetato de etilo/agua se comporta como las partículas de SiO_2 -RB (Figura 38 B). Parece que el campo magnético hace que la carga negativa que le queda libre en el RB unido covalente a la sílica mediante la formación de enlaces amida, se debe replegar hacia la superficie de la micropartícula que tiene grupos amino cargados positivamente. Cuando estos grupos amino se desprotonan y pierden su carga se rompe esta asociación y entonces se comportan como las micropartículas de SiO_2 -RB.

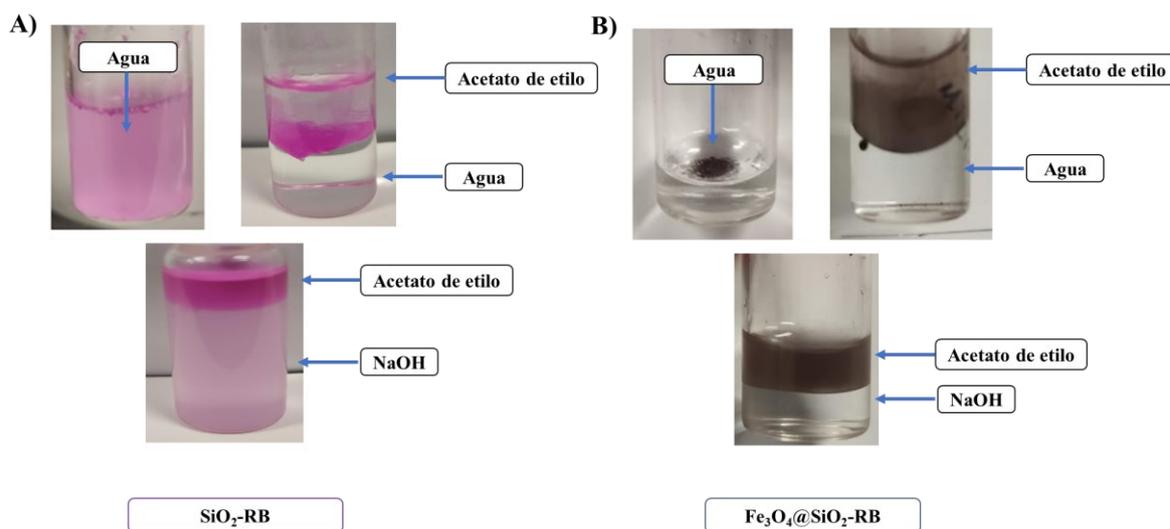


Figura 38. Solubilidad en diferentes medios de las micropartículas de A) $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB y B) SiO_2 -RB.

Conclusiones

Se obtuvieron dos fotocatalizadores heterogéneos (SiO_2 -RB y $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB) de tamaño micrométrico que tenían anclado covalentemente el Rosa de Bengala. Mediante técnicas de microscopía electrónica se determinó su tamaño, morfología esférica, y se comprobó la existencia del núcleo de magnetita. Por espectroscopía de absorción se pudo demostrar la presencia del RB en la superficie del material para las micropartículas de SiO_2 -RB; sin embargo, se tuvo que recurrir a ICP para cuantificar el RB que tenían las micropartículas SiO_2 -RB y $Fe_2O_4@SiO_2$ -RB. Solo las micropartículas de SiO_2 -RB demostraron su eficiencia para degradar el DCF y este fue mejor que el obtenido en los soportes nanométricos. El hecho de conseguir un mejor recubrimiento de RB en el material micrométrico que en el nanométrico produjo una mayor adsorción del contaminante que conducía a una fotodegradación más rápida. Este último hecho indirectamente demostraba que el proceso de transferencia electrónica entre el contaminante y el RB debía ser el mecanismo de fotodegradación predominante.

Por otra parte, se vio que un campo magnético micrométrico puede afectar a las propiedades de colorantes cuando estos están en la superficie de soportes de sílice.

CAPÍTULO III

4.3 Evaluación del porcentaje óptimo de Rosa de Bengala en tejidos de Poliamida para la fotoinactivación de bacterias Gram positivas con luz visible.

Introducción

La contaminación microbiológica de las fuentes de agua sigue representando uno de los principales problemas sanitarios en todo el mundo, con más de 2.000 millones de personas que no tienen acceso a agua potable limpia [146]. Uno de los principales problemas, es la falta de instalaciones adecuadas de tratamiento de aguas residuales en los países en desarrollo, lo que representa un peligro muy alto para la salud, pero también la gestión inadecuada de las aguas residuales, urbanas e industriales que suele dar lugar a una eliminación ineficaz de esos microorganismos patógenos. Por ello se busca implementar nuevas estrategias para desarrollar métodos eficaces e innovadores de desinfección de las aguas residuales.

Recientemente, los Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) que implican fotocatalizadores heterogéneos han ganado atención frente a los procesos tradicionales debido a su simplicidad y rápida oxidación de contaminantes y bacterias en el agua [147]. Existe un gran interés en el uso de fotosensibilizadores orgánicos, como los colorantes en procesos de desinfección, porque pueden ser excitados por la energía solar y generar especies oxidativas que pueden reaccionar con las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos de los microorganismos. Como consecuencia, se produce la ruptura de la pared celular, la alteración de la funcionalidad de las macromoléculas o la inhibición de su metabolismo mediante mecanismos de fotoinactivación de tipo I (transferencia de electrones) y de tipo II (reacción de oxígeno singlete) [148–152]. Sus múltiples ventajas han dado lugar a numerosos estudios sobre la aplicación de procesos fotoquímicos para la inactivación de bacterias. La heterogeneización de los fotosensibilizadores aumenta claramente su fotoestabilidad y, por tanto, su eficacia fotocatalítica, aunque ello supone que pueden operar a través de mecanismos diferentes a los establecidos en condiciones homogéneas [78]. La gran variedad química de los fotosensibilizadores orgánicos ha permitido que sean soportados en diferentes tipos de sustratos como materiales cerámicos, lana de vidrio, resinas de intercambio iónico, poliestireno catiónico, celulosa y fibras de

tejidos naturales o sintéticos [130,131,153–156]. Además, en los últimos años, las fibras textiles se han convertido en una opción interesante debido a sus grandes ventajas, como el bajo coste, la flexibilidad mecánica y la fácil recuperación del medio tras su uso [157]. La bibliografía muestra ejemplos de tejidos con propiedades de inactivación fotodinámica frente a distintos tipos de bacterias mediante la incorporación de colorantes en las fibras textiles. Así, se han descrito tejidos antimicrobianos como el poliéster que contiene azul de metileno, nanofibras de poliestireno y polímeros electrospun teñidos con tetrafenilporfirina y también con Rosa de Bengala (RB), utilizados para teñir fibras de algodón, lana y fibras acrílicas mezcladas [150,157–160]. La elección del fotosensibilizador orgánico es un factor crítico para la eficacia de la inactivación bacteriana. En este sentido, el RB es un muy buen candidato porque tiene un alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) ($\Phi_{\Delta} = 0.76$), el cual provoca la muerte de los microorganismos [161–163]. Sin embargo, aunque diferentes tejidos teñidos con RB han demostrado ser eficaces para inactivar bacterias, especialmente las bacterias Gram positivas, no se han realizado estudios en profundidad que tengan en cuenta factores importantes que permitirían avanzar en el conocimiento para mejorar la eficacia de futuros fotocatalizadores heterogéneos basados en tejidos [150,164–167]. Por ejemplo, se sabe que altas concentraciones de RB en soluciones acuosas producen agregaciones debido a las interacciones hidrofóbicas entre los anillos de xanteno. Este efecto provoca un fenómeno de autodesactivación que induce una disminución de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) [165] y, por tanto, una reducción de la acción bactericida. En este contexto, se ha descrito que la heterogeneización del RB reduce su autodesactivación provocada por la agregación [168]. Además, la falta de fotoinactivación de bacterias Gram negativas por materiales heterogéneos de RB se ha atribuido a su carácter aniónico, pero nunca se ha evaluado la influencia de dicho carácter aniónico en la desinfección de las bacterias Gram positivas. Por estas razones, el objetivo de este capítulo fue determinar la influencia del porcentaje de RB soportado sobre tejidos de poliamida (Figura 39) en la inactivación de bacterias Gram positivas, teniendo en cuenta factores como la generación de oxígeno singlete y la carga negativa global del material.

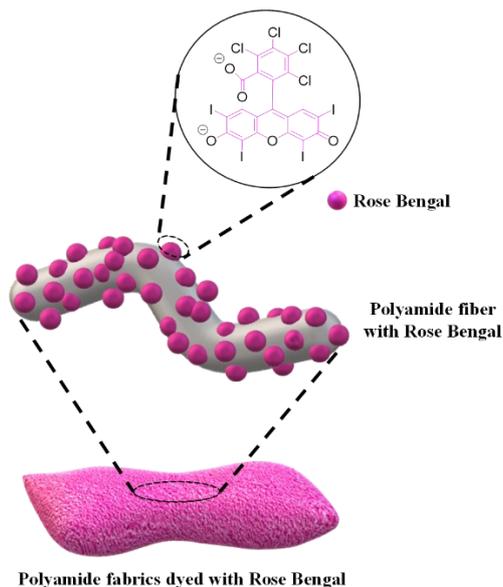


Figura 39. Ilustración esquemática del tejido de poliamida teñida con RB (RB-PAF).

Resultados y discusión

Caracterización de los tejidos de poliamida teñidos con Rosa de Bengala

Los porcentajes de RB incorporados al tejido de poliamida se seleccionaron en el rango de los valores de la mayoría de los tejidos teñidos descritos en la bibliografía. Para ello, se utilizaron las tres concentraciones iniciales diferentes de RB (0.5, 1.0 y 3.0 o.w.f.). Las cargas de RB determinadas para cada tejido de poliamida con RB (RB-PAF) se muestran en la Tabla 5.

El teñido de las fibras de poliamida corresponde a las cargas determinadas espectroscópicamente restando el colorante residual en la disolución post-teñido de la cantidad inicial de colorante (ver procedimiento en la sección 3.5). Aunque este proceso de cuantificación del tinte mediante técnicas espectroscópicas analizando el agua de lavado es ampliamente utilizado en la industria textil, también se llevaron a cabo de forma complementaria, otros dos métodos químicos para extraer y cuantificar el tinte de los tejidos. La Figura 40 muestra la evolución del RB-PAF para extraer químicamente el RB. Tras el primer tratamiento con ácido fórmico, las fibras se rompen debido a la hidrólisis y protonación del RB, dando lugar a una fibra disgregada incolora (imagen no mostrada). Sin embargo, el color se recuperó tras la neutralización (Figura 40 B). Posteriormente, fueron necesarias tres extracciones consecutivas con el disolvente DMSO para producir

una extracción completa del colorante, interrumpiendo la interacción física entre el colorante (RB) y las fibras de poliamida (véanse las imágenes Figura 40 C, D y E después de cada extracción consecutiva) [169]. La absorbancia de los extractos combinados permitió determinar la concentración mediante una curva de calibración de RB en DMSO (Figura 41).

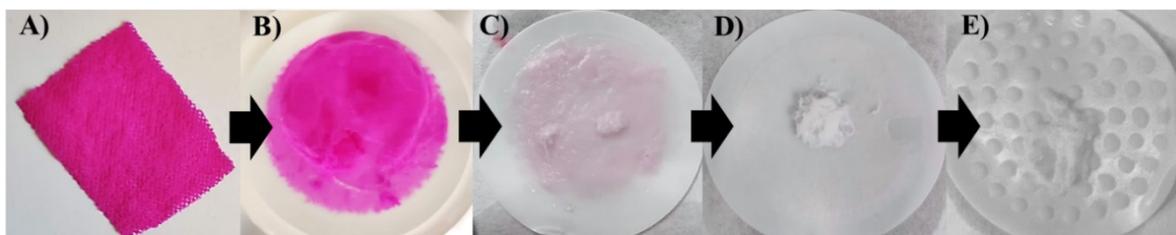


Figura 40. Imágenes del tejido de poliamida en diferentes etapas del proceso aplicado para determinar la carga de colorante. A) Tejido de poliamida teñido original. B) Tejido de poliamida disgregado tras la neutralización y los lavados posteriores. C) Tejido de poliamida disgregado tras la 1ª extracción. D) Tejido de poliamida desagregado después de la 2ª extracción. E) Tejido de poliamida disgregado tras la 3ª extracción. (Se utilizó DMSO como disolvente para los ciclos de extracción, sonicando cada ciclo a 80 °C durante 3 horas).

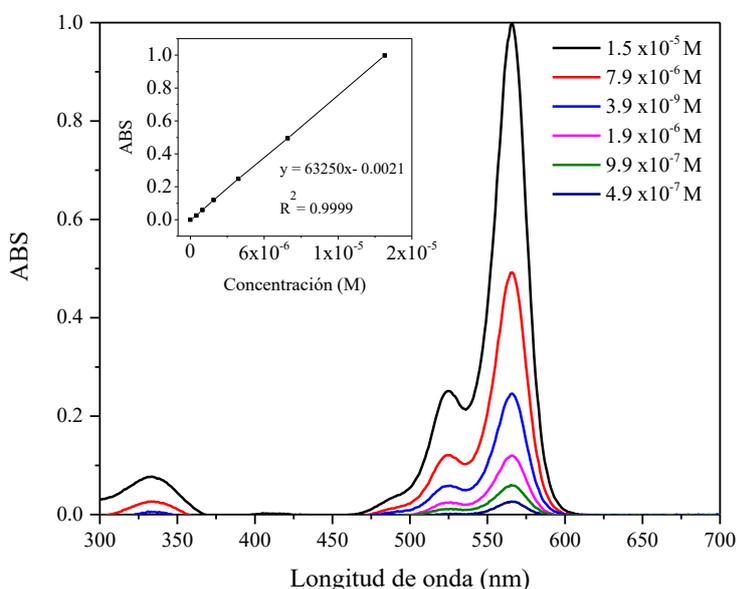


Figura 41. Espectros UV-vis de RB en una disolución homogénea de DMSO (hasta 1.5×10^{-5} M). Recuadro: Curva de calibración de RB en DMSO.

Por último, también se determinó la cantidad de RB en los tejidos mediante ICP-MS. Estos también se muestran en la Tabla 5. Los valores de la carga de RB obtenidas por los tres métodos son ligeramente diferentes; mientras que la cuantificación por diferencia de absorbancia entre el baño de teñido y los lavados parece subestimar la concentración de

RB, la extracción química sobrestima los valores teóricos. No obstante, los valores obtenidos por ICP-MS parecen ofrecer resultados razonables.

Tabla 5. Concentración de RB en los tejidos de poliamida.

Concentración teórica de RB en el tejido de poliamida (% o.w.f.)	Teñido (% o.w.f.)	Extracción (% o.w.f.)	ICP-MS (% o.w.f.)
0.5	0.500	0.59	0.58
1.0	0.985	1.29	0.99
3.0	2.638	3.33	3.00

Una importante característica de las telas evaluadas fue la profundidad de color de los tres RB-PAF, la cual se obtuvo midiendo la reflectancia de la luz. La Figura 42 muestra que los resultados para los tres tejidos de poliamida van en paralelo con la carga nominal de RB. En todos los casos, la absorción máxima de RB en RB-PAF ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$) exhibió un desplazamiento batocrómico de 14 nm en comparación con la disolución acuosa de RB ($\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$, ver Figura 43).

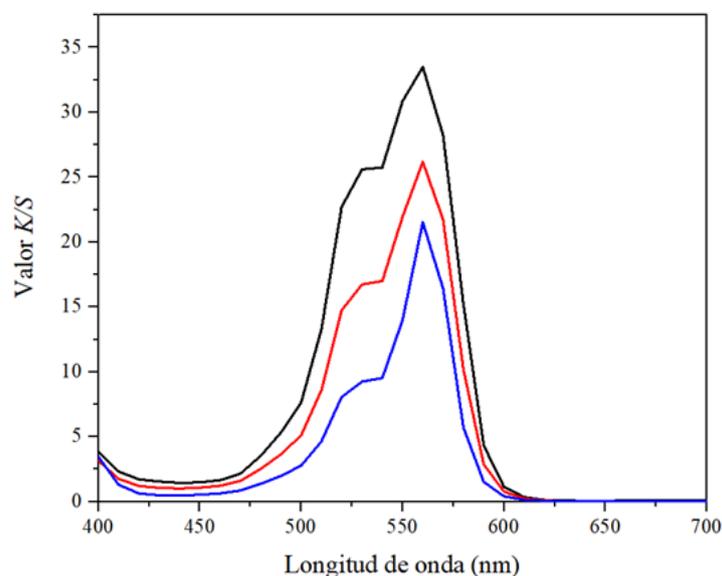


Figura 42. Curvas de K/S vs longitud de onda de RB-PAF al 0.5 % (o.w.f.) (azul), 1 % (o.w.f.) (rojo), y 3 % (o.w.f.) (negro).

Sin embargo, la relación entre el máximo a 525 y el máximo a 560 nm aumenta claramente de RB-PAF a 0.5 % (o.w.f.) (azul) a 1 % (o.w.f.) (rojo) y a 3 % (o.w.f.)

(negro). Este comportamiento puede interpretarse en términos de agregación del colorante, debido a que los tejidos con mayor carga de colorante absorben más la luz [129].

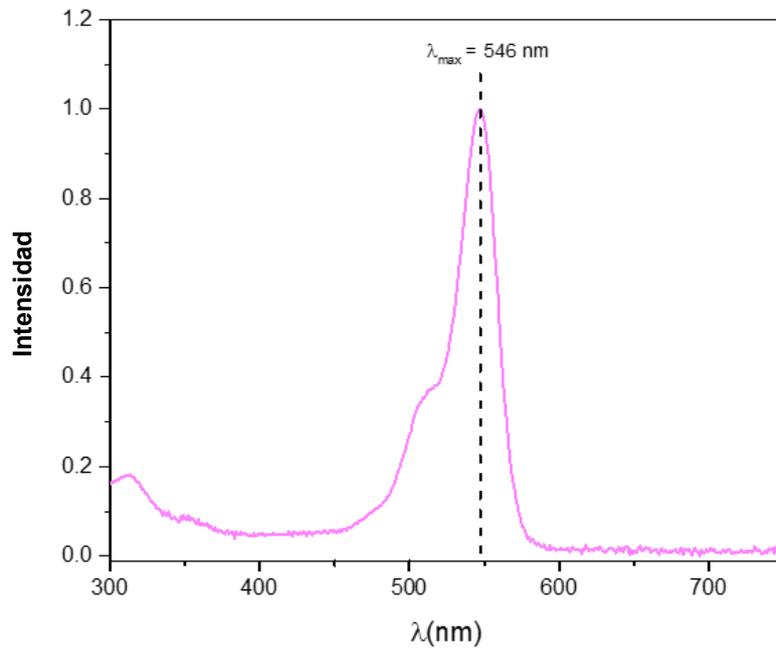


Figura 43. Espectro de absorción normalizado de RB en disolución acuosa.

Otro de los estudios que se llevó a cabo para caracterizar las telas fue el análisis de su morfología superficial mediante la técnica de FESEM para observar la morfología superficial del RB-PAF. La Figura 44 muestra una fibra homogénea típica del tejido sintético con 1% (o.w.f.) antes (Figura 44 A) y después del proceso de teñido (Figura 44 B). Como se puede observar con la comparación de las dos figuras, la asociación de RB a la fibra no afecta a su morfología.

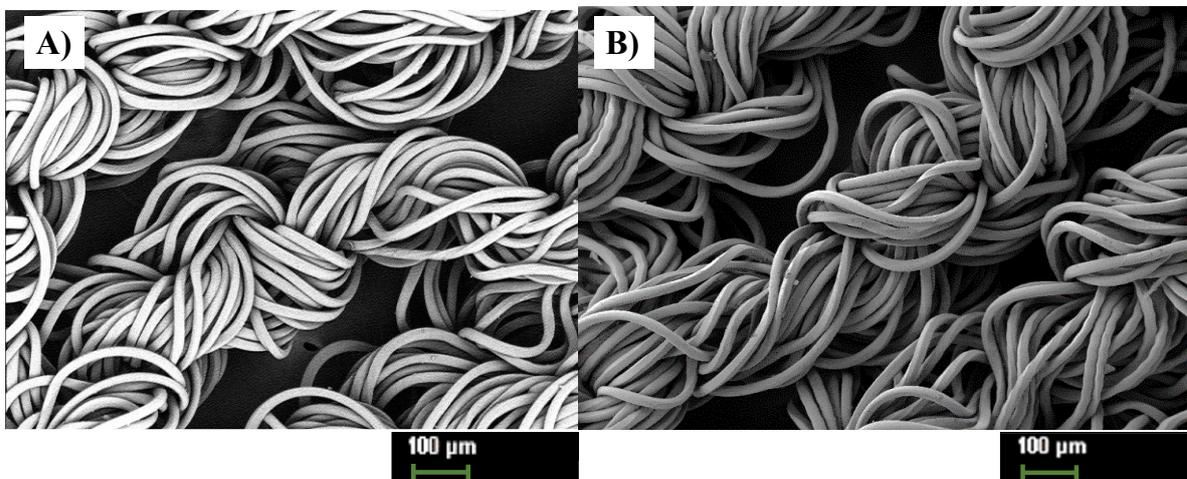


Figura 44. Imágenes de FESEM del tejido de poliamida. A) Tejido sin teñir; B) Tejido teñido al 1 % (o.w.f.).

Propiedades fotofísicas de los tejidos de poliamida teñidos con RB

Para determinar el efecto de los diferentes porcentajes de RB en el tejido de poliamida sobre las propiedades fotofísicas del RB se realizaron mediciones de emisión en estado estacionario y resueltas en el tiempo, así como experimentos de fotólisis de destello láser, incluyendo la detección del estado excitado triplete del RB ($^3\text{RB}^*$) y la generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario del RB-PAF (Figura 45 A) muestran un desplazamiento batocrómico en comparación con el RB en homogéneo ($\lambda_{\text{max}} = 567 \text{ nm}$) en medio acuoso [90,170]. Este desplazamiento al rojo del máximo de fluorescencia depende del porcentaje de carga de RB en el tejido de poliamida ($\lambda_{0.5\%}$ y $\lambda_{1\%}$ *ca.* 610 nm y $\lambda_{3\%} = 628 \text{ nm}$). El efecto batocrómico puede deberse a la dependencia de las propiedades fotofísicas de los fotosensibilizadores a la fijación sobre el tejido y a la distancia entre las unidades cromóforas, que disminuye al aumentar el porcentaje de carga, dificultando así, los cambios conformacionales entre sus estados de transición. Este mismo efecto se ha descrito en varios colorantes xantenos tras su tintura sobre diferentes materiales (tejido de algodón, tejido de lana/acrílico, celulosa, etc.) [129,171,172]. El máximo de emisión observado está desplazado hacia el rojo, y la amplitud del desplazamiento al rojo aumenta con respecto a la banda principal, como era de esperar cuando el aumento del porcentaje de RB conduce a la reabsorción de la luminiscencia [129]. Los resultados de emisión en estado estacionario observados apuntaron a la agregación de RB en los tejidos. No obstante, los experimentos de fluorescencia con resolución temporal (Figura 45 B) realizados en atmósfera de aire ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$) mostraron una disminución de los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) cuando el porcentaje de RB en los diferentes RB-PAF aumentó de 0.5 a 3 % (o.w.f.), (1.5, 1.4 y 1.0 ns respectivamente). Estos datos de tiempo resuelto actuaron como una prueba inequívoca de la interacción de transferencia de carga entre el estado excitado singlete del RB y las moléculas cercanas del RB en estado fundamental, que es la vía de desactivación más probable del primer estado excitado singlete de los fotosensibilizadores soportados en materiales heterogéneos [125]. Por consiguiente, se espera que el rendimiento cuántico del estado excitado triplete del RB sea considerablemente menor para el RB-PAF al 3% que para el RB-PAF al 0.5% (o.w.f.).

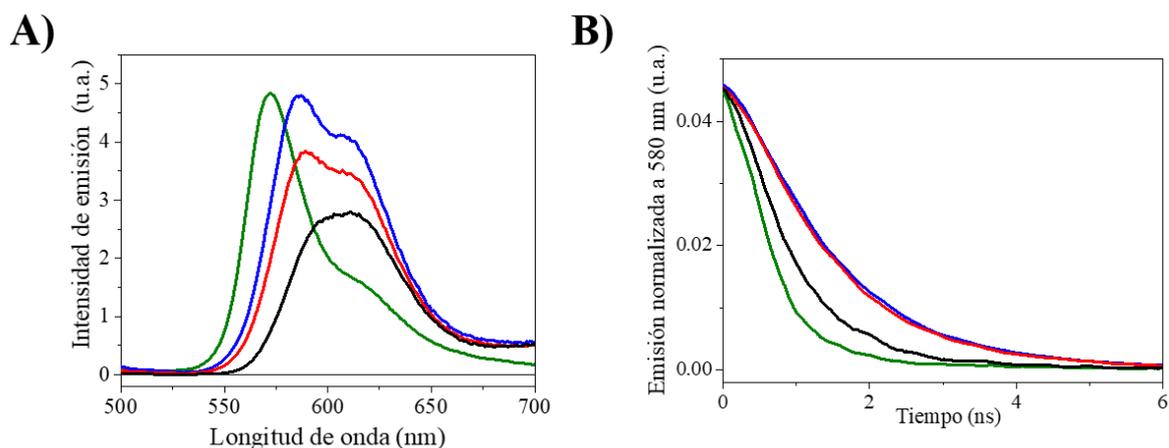


Figura 45. Espectros de fluorescencia en estado estacionario (A) y en tiempo resuelto (B) de RB-PAF al 0.5 % (o.w.f.) (azul), 1 % (o.w.f.) (rojo), y 3 % (o.w.f.) (negro). Se utilizo el RB en homogéneo (verde) como control a una $Abs = 2$ a $\lambda_{exc} = 500$ nm en H_2O .

Se realizaron estudios de fotólisis de destello láser en los tejidos para observar la formación del estado excitado triplete de RB ($^3RB^*$) ya que su detección anticipa la generación de oxígeno singlete. Así, se registró la absorción transitoria de los tejidos de poliamida teñidos con RB 0.5, 1 y 3 % (o.w.f.) en diferentes tiempos tras el pulso láser utilizando el rango de detección espectral de 300 a 800 nm a la longitud de onda de excitación de 532 nm (Figura 46). Los tres RB-PAF mostraron máximos intensos de absorción a *ca.* 475 y 625 nm y blanqueamiento centrado en *ca.* 540 nm. La intensidad del blanqueo disminuye al aumentar la carga de RB en el tejido, pero este hecho puede atribuirse a la mayor absorción de luz por los tejidos más cargados. El espectro de absorción observado en los tres tejidos puede atribuirse al $^3RB^*$ ya que es similar al observado para el RB homogéneo independientemente de la naturaleza del disolvente empleado [134,173]. Curiosamente, el $^3RB^*$ detectado en el RB-PAF muestra tiempos de vida similares (275, 282 y 275 μs para RB 0.5, 1 y 3 % (o.w.f.), respectivamente, bajo atmosfera de aire), que también resultaron ser casi iguales bajo atmósfera de nitrógeno. El hecho de que el $^3RB^*$ no se desactive por el oxígeno en los tres tejidos no se había descrito anteriormente para colorantes heterogéneamente soportados, ya que este tipo de material nunca se había estudiado mediante la técnica de fotólisis de destello láser. En este contexto, se observó un apoyo adicional al comportamiento $^3RB^*$ cuando las medidas de fosforescencia se realizaron al mismo tiempo que los espectros de absorción $^3RB^*$. De este modo, como se muestra en las Figura 46 B y D, el espectro de emisión de la

fosforescencia RB observada (λ_{\max} ca. 737 nm),[174] se desactiva al mismo tiempo que el espectro de absorción de $^3\text{RB}^*$.

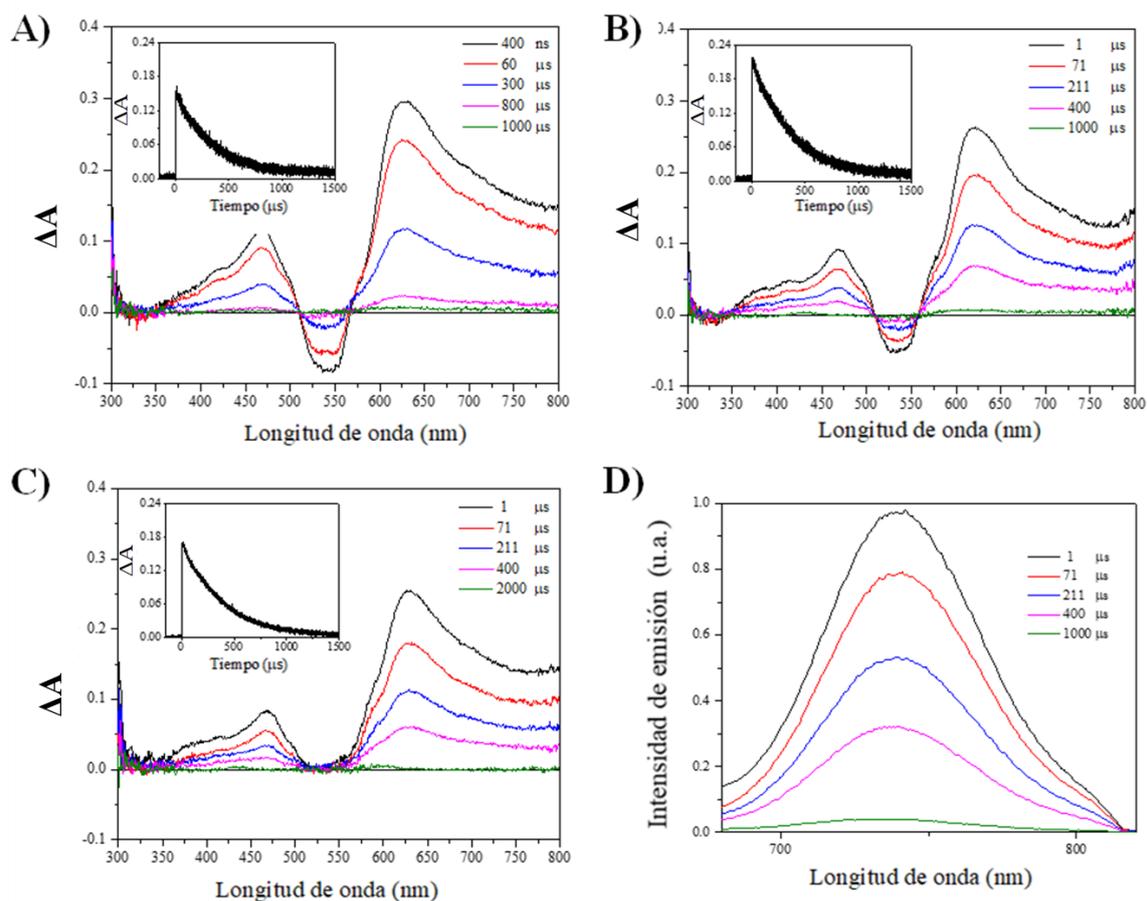


Figura 46. Espectros de absorción transitoria de los tejidos de poliamida teñidos al (A) 0.5 %, (B) 1 %, (C) 3 % (o.w.f.) de RB, y (D) emisión de fosforescencia al 1 % (o.w.f.) de RB obtenidos en diferentes momentos tras el pulso láser a $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm en sólido bajo aire. Los recuadros muestran la desactivación de $^3\text{RB}^*$ registradas a 600 nm.

La generación de oxígeno singlete a partir de los tejidos se monitorizó mediante la típica fosforescencia de oxígeno singlete a $\lambda = 1270$ nm generada por la irradiación de pulso del láser en medios aireados. Así, todas las desactivaciones mostraron tiempos de vida de ca. 270 μs , que concuerdan con los obtenidos para el tiempo de vida del $^3\text{RB}^*$ (recuadros de la Figura 46).

Estudios fotodinámicos

Aunque las técnicas espectroscópicas han evidenciado la implicación de $^3\text{RB}^*$ en la generación de $^1\text{O}_2$, fue imposible cuantificar la eficiencia de los procesos en los tres RB-PAFs. Por lo tanto, se llevó a cabo un método químico para cuantificar indirectamente la generación de oxígeno singlete del fotosensibilizador (ver sección 3.4). Este método

químico se basa en la fotooxigenación del 9,10-dimetil antraceno (DMA) a su endoperóxido correspondiente (Esquema de la Figura 47). Este experimento reveló que la generación de oxígeno singlete depende del porcentaje de RB en los tejidos, en el orden: de 1 % > 3 % > 0.5 % (o.w.f.) (véanse los resultados en la Figura 48).

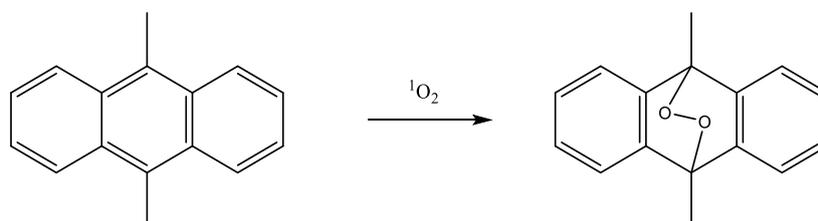


Figura 47. Oxidación con oxígeno singlete del 9,10-dimetil antraceno (DMA) a su endoperóxido correspondiente.

Por lo tanto, el porcentaje más bajo de RB produce una fotooxigenación DMA muy baja, mientras que el porcentaje más alto de RB no muestra mejores resultados que el obtenido utilizando RB al 1%. El resultado obtenido con RB al 3 % puede atribuirse al apilamiento y agregación π - π de RB, [175] lo que concuerda con los resultados fotofísicos comentados anteriormente. La proximidad entre los estados $^1\text{RB}^*$ y RB da lugar a un efecto de autodesactivación del estado excitado que disminuye la eficiencia del cruce intersistema y, en consecuencia, la generación de $^1\text{O}_2$. Así, el porcentaje de colorante soportado en un proceso de heterogeneización sigue siendo un factor crítico para optimizar la eficiencia de la actividad fotodinámica.

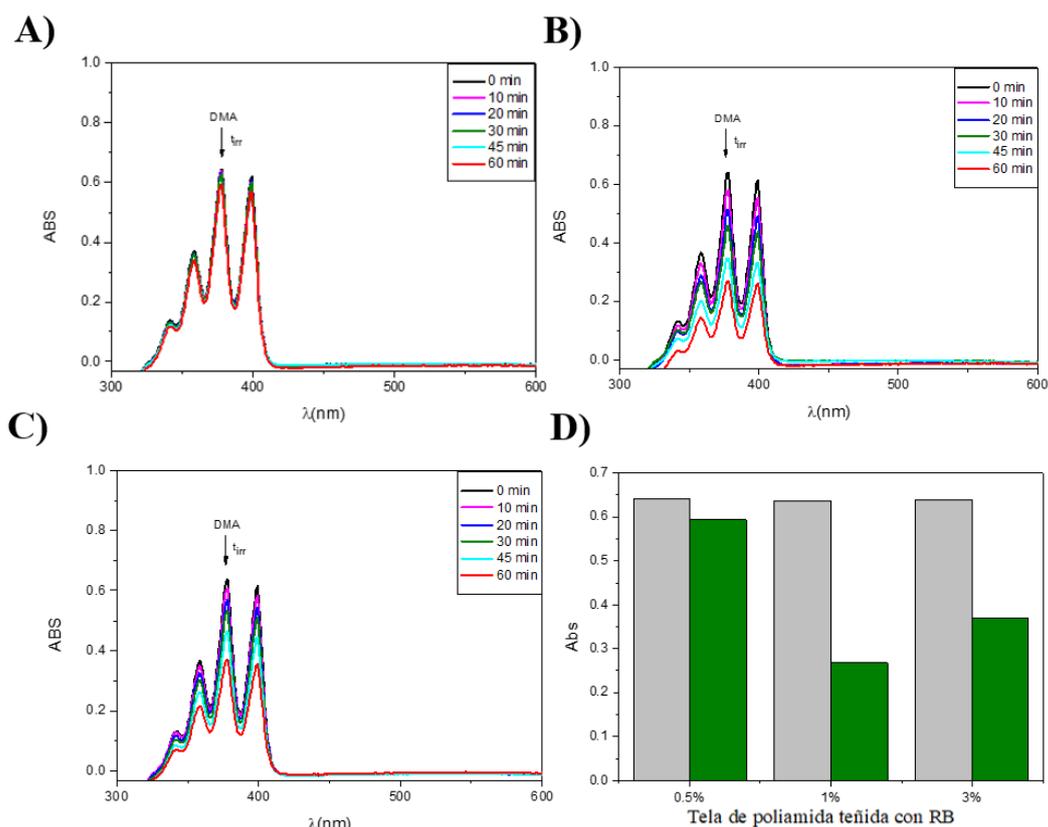


Figura 48. Absorbancia del DMA (80 μM, en MeCN) en presencia de RB-PAF al 0.5 % (A), 1 % (B) y 3 % o.w.f. (C), $V = 3$ mL, en función del tiempo de irradiación, con luz LED verde bajo atmosfera de aire. Comparación de la disminución de la absorbancia DMA (registrada a 376 nm) a 0 (gris) y tras 60 minutos de irradiación (verde) con todos los tejidos (D).

Inactivación de bacterias por RB-PAF

Tras determinar las propiedades fotofísicas del RB-PAF y realizar estudios fotodinámicos de DMA, queda claro que estos materiales soportados con RB son capaces de generar oxígeno singlete y, en consecuencia, serían capaces de producir fotoinactivación bacteriana. Por lo tanto, se realizaron experimentos frente a la bacteria Gram positiva, *E. faecalis*, para valorar el efecto del porcentaje de RB en el tejido y la utilización de diferentes cantidades de irradiación de luz verde.

Las cinéticas de actividad antibacteriana obtenidas con las suspensiones bacterianas que contenían RB-PAF 1% o.w.f. a diferentes cantidades de irradiación se muestran en la Figura 49. La actividad antibacteriana del tejido aumentó proporcionalmente al incrementarse tanto la irradiancia como el tiempo. Para cada tiempo registrado, se realizó un ANOVA unidireccional de Welch para determinar si el cambio de actividad debido al

factor de irradiación era estadísticamente significativo. Se eligió esta prueba estadística porque, aunque en todos los casos los datos se distribuían normalmente, se violaba el supuesto de homogeneidad de las varianzas según se comprobó con la Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Levene (Tabla 6). El análisis de varianza reveló que, tras 5 min de tratamiento, las tres dosis diferentes de irradiación fueron capaces de activar el tejido, provocando reducciones de la supervivencia bacteriana estadísticamente diferentes a la del control no irradiado, según el análisis post-hoc de Games-Howell, (Tabla 6 y Tabla 7). Además, el tejido expuesto a 8 lámparas durante 5 min fue capaz de reducir la supervivencia en casi 3 unidades \log_{10} y fue estadísticamente más activo que los otros dos tejidos irradiados con 2 y 4 lámparas, que obtuvieron resultados similares ($P = 0.056$). A partir de los 10 min, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6. Estadística descriptiva de la prueba de Welch para los diferentes tiempos de irradiación a lo largo del tratamiento bactericida.

Tempo (min)	Estadística de Levene's (gl1, gl2)	Sig.	Estadística de Welch (gl1, gl2)	Sig.
5	4.082 (3, 12)	0.033	225.2 (3, 5.88)	0.000
10	7.788 (3, 12)	0.004	385.4 (3, 5.25)	0.000
15	6.629 (2, 9)	0.017	1728.4 (2, 4.16)	0.000
20	26.514 (2, 9)	0.000	1217.1 (2, 4.72)	0.000

Tabla 7. Análisis post-hoc de Games-Howell para los diferentes tiempos de irradiación a lo largo de los tratamientos bactericidas.

Tiempo (min)	Lampara (A)	Lampara (B)	Diferencia de medias (A-B)	Error Standard	Sig.	95% Intervalo de Confianza
5	0	2	0.0425*	0.0111	0.039	0.0025; 0.0825
		4	0.2800*	0.0530	0.037	0.0290; 0.5310
		8	2.6050*	0.0923	0.000	2.1626; 3.0474
	2	4	0.2375	0.0534	0.056	-0.0105; 0.4855
		8	2.5625*	0.0925	0.000	2.1221; 3.0029
		4	2.3250*	0.1061	0.000	1.9264; 2.7236
10	0	2	0.4350*	0.0326	0.002	0.2853; 0.5847
		4	1.1150*	0.0316	0.000	0.9705; 1.2595
		8	4.5925*	0.6390	0.017	1.5091; 7.6759
	2	4	0.6800*	0.0445	0.000	0.5259; 0.8341
		8	4.1575*	0.6398	0.022	1.0807; 7.2343
		4	3.4775*	0.6398	0.036	0.4002; 6,5548
15	0	2	0.8100*	0.0609	0.002	0.5589; 1.0611
		4	2.2675*	0.0365	0.000	2.1206; 2.4144
	2	4	1.4575*	0.0746	0.000	1.2262; 1.6888
20	0	2	2.3075*	0.0461	0.000	2.1479; 2.4671
		4	4.1250*	0.2259	0.001	3.1904; 5.0596
	2	4	1.8118*	0.2288	0.007	0.9004; 2.7346

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

De este modo, RB-PAF 1% o.w.f. mostró una potente eficacia antibacteriana. De hecho, no se registraron colonias de bacterias en los recuentos viables (actividad de inactivación del 100%) tras la exposición a una irradiancia de 6.75 mW/cm², en sólo 15 min (Figura 49 trazo rosa oscuro). Sin embargo, el tejido cargado con la concentración más baja (RB-PAF 0.5% o.w.f.) no mostró inactivación bacteriana en ninguna de las condiciones de irradiación probadas, incluida la dosis de irradiación más alta (6.75 mW/m² durante un periodo prolongado de 60 min). Curiosamente, el RB-PAF al 3% o.w.f. sólo mostró una reducción de 1 unidad logarítmica (90% de actividad) a la dosis de irradiación más alta. Todas las muestras se evaluaron también en la oscuridad, y no se detectó actividad bactericida en ningún caso.

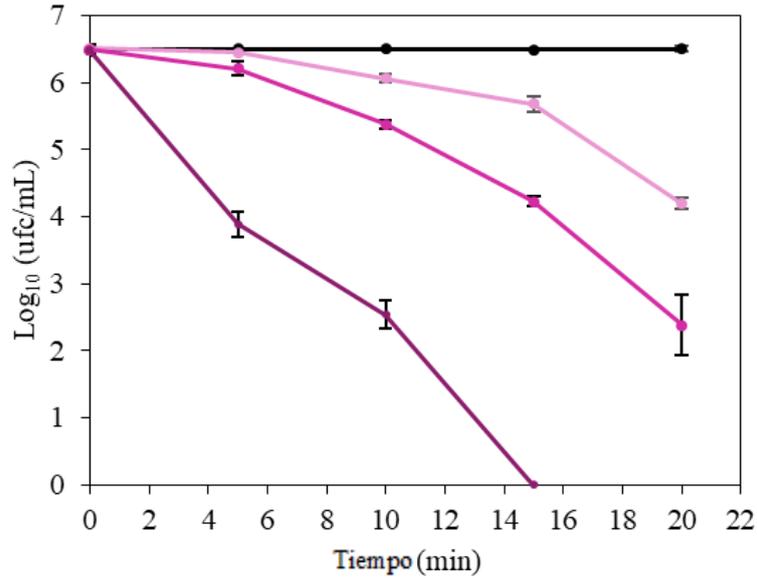


Figura 49. Reducción de la supervivencia de *Enterococcus faecalis* expuestos a Tejido de Rosa de Bengala-Poliamida al 1 % (o.w.f.) irradiado a 1.66 (rosa pálido), 3.34 (rosa) y 6.75 mW/cm² (rosa oscuro). El experimento de control en condiciones de oscuridad se muestra en negro.

Aunque no se recuperaron bacterias viables de la suspensión bacteriana que contenía RB-PAF 1% después de 15 min de irradiación con una irradiancia de 6.75 mW/m², para confirmar la completa inactivación bacteriana, los tejidos procedentes de este experimento se incubaron en PCA. El objetivo de este ensayo fue evaluar si todas las bacterias que permanecían adheridas a la superficie del tejido habían sido realmente eliminadas por la acción fotodinámica. Los resultados mostraron que el tejido no contenía ninguna bacteria viable, ya que no se registró ningún crecimiento tras 24-48 h de incubación (Figura 50). Este resultado nos permite concluir inequívocamente que el RB-PAF 1% (o.w.f.) es capaz de reducir la concentración bacteriana en más de 6 unidades logarítmicas lo que, en nuestras condiciones experimentales, supone una inactivación bacteriana del 100%.

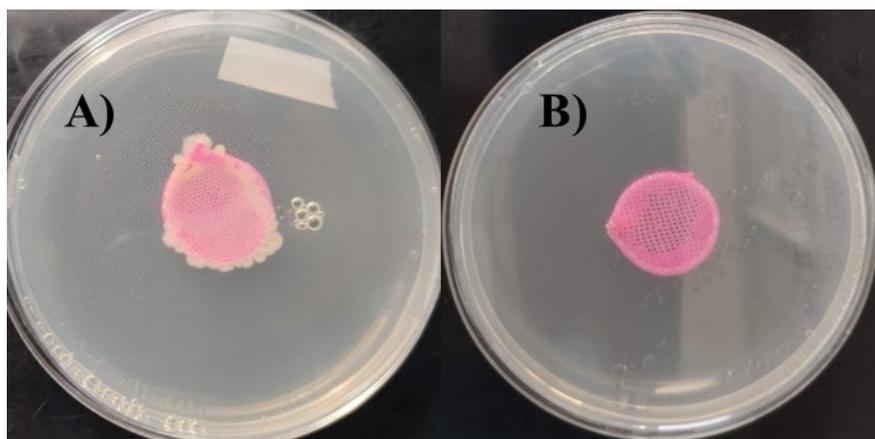


Figura 50. RB-PAF tras 24 h de cultivo. A) Control en la oscuridad. B) Irradiado a 67.5 mW/cm^2 durante 20 min.

Los resultados anteriores han demostrado que la concentración de RB en el tejido es un factor crucial para determinar su actividad bactericida fotodinámica y que existe un estrecho margen de concentraciones activas. Así, mientras que el RB-PAF 1 % (o.w.f.) tiene una notable actividad antibacteriana, una reducción de sólo la mitad de la concentración (0.5 % (o.w.f.)) produjo una pérdida completa de su actividad bacteriana. Por otra parte, un aumento de aproximadamente 3 veces la concentración activa redujo notablemente la actividad antimicrobiana.

Los resultados de la actividad bactericida correlacionan adecuadamente con las determinaciones de $^1\text{O}_2$, donde la cantidad de oxígeno singlete generado para RB-PAF sigue el orden: 1.0 % > 3.0 % > 0.5 % (o.w.f.). Por lo tanto, la actividad antibacteriana del RB-PAF podría atribuirse a su capacidad de generar $^1\text{O}_2$ [168]. Sin embargo, aunque la falta de actividad mostrada por el RB-PAF 0.5 % puede atribuirse claramente al hecho de que la cantidad de colorante en este tejido no es capaz de generar suficiente $^1\text{O}_2$ para matar las bacterias, la muy baja actividad del RB-PAF 3 % no puede atribuirse únicamente a la menor generación de oxígeno singlete, ya que su valor está relativamente próximo al determinado para el RB-PAF 1 %.

Capacidad de los tejidos funcionalizados para adsorber bacterias

Como se ha comentado anteriormente, la pérdida de actividad bactericida en RB-PAF 3% no puede entenderse claramente sólo por la pequeña disminución de generación de oxígeno singlete observada para RB-PAF 3% al compararla con la de RB-PAF 1%. Por lo tanto, debería estar ocurriendo otro hecho y, por ello, se hipotetizó que las cantidades

crecientes de RB en la superficie del tejido aumentarían su carga neta negativa debido al carácter aniónico del colorante. Este hecho podría impedir que las bacterias, que poseen una superficie cargada negativamente, se acercaran a la superficie del tejido. Para demostrar esta hipótesis, se cuantificó el número de bacterias adsorbidas en RB-PAF 1.0% y 3.0%, en condiciones de oscuridad, utilizando una suspensión bacteriana que contenía 1×10^3 ufc/mL. Se utilizó esta baja concentración bacteriana para obtener mediciones más precisas que las que se obtienen cuando las concentraciones son elevadas y pueden producirse efectos de saturación en la superficie del tejido.

La Figura 51 muestra el porcentaje de bacterias adsorbidas en RB-PAF 1% y 3% cuando se exponen a la suspensión bacteriana durante 1 y 2 horas en la oscuridad. Como era de esperar, el RB-PAF 1% mostró niveles más altos de adsorción de bacterias que los exhibidos por el RB-PAF 3% en ambos tiempos de exposición. Así, tras 1 h de tratamiento, el RB-PAF 1% fue capaz de adsorber el 86.6% de las bacterias contenidas en la suspensión, mientras que el RB-PAF 3% sólo alcanzó un valor medio de adsorción del 58.8%, estadísticamente inferior al primero ($t = 16.13$; $P = 0.00008$). Además, tras 2 h de exposición, la diferencia estadística se hizo mayor a medida que el nivel de adsorción en RB-PAF 1% aumentaba hasta el 98.9%, pero el de RB-PAF 3% permanecía inalterado ($t = 20.71$; $P = 0.00003$). El comportamiento de adsorción de las bacterias en RB-PAF 3% sería compatible con un fenómeno de repulsión electrostática mayor potenciado por una mayor carga del colorante aniónico. Este hecho es importante desde el punto de vista de la pérdida de actividad fotodinámica, ya que el tiempo de vida del oxígeno singlete en el agua es muy corto ($3.45 \mu\text{s}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), [138] y es el contacto estrecho lo que facilita que el oxígeno singlete inactive las bacterias. Por lo tanto, al aumentar la repulsión electrostática, la actividad fotodinámica debería disminuir notablemente.

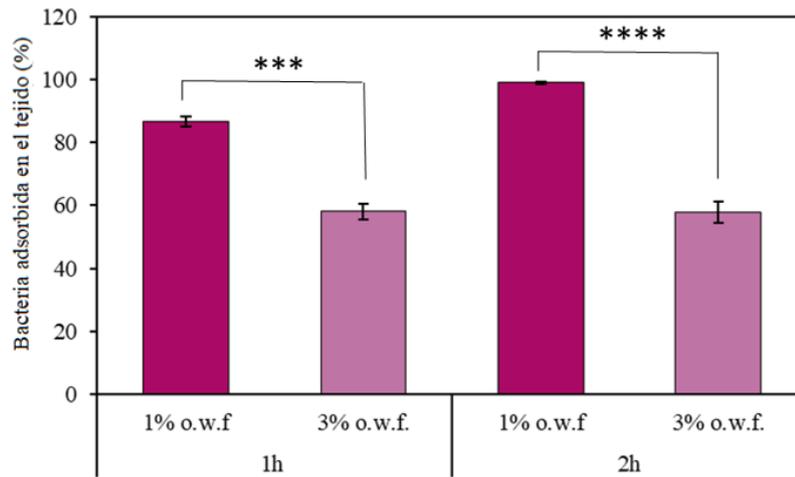


Figura 51. Porcentaje de bacterias adsorbidas (media \pm desviación estándar; $n=3$) en tejido de poliamida teñido al 1% (o.w.f.) y al 3% (o.w.f.) en condiciones de oscuridad. Los experimentos se realizaron utilizando una concentración de *E. faecalis* de 1×10^3 ufc/mL. Valores medios estadísticamente diferentes: *** ($P < 0.0005$) y **** ($P < 0.00005$).

Teniendo en cuenta todos los resultados de este trabajo, la actividad bactericida puede atribuirse a la capacidad de los RB-PAF de generar oxígeno singlete durante la irradiación. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la ocurrencia de fotorreacciones RB-Tipo I, bajo determinadas condiciones, podría ser destacada y podrían estar jugando un papel importante en alcanzar una actividad antibacteriana más potente [139,176]. Con esta evidencia, la implicación de fotorreacciones Tipo I en nuestros experimentos no debería ser descartada.

Basándonos en el importante nivel de actividad antibacteriana obtenida, los RB-PAFs podrían suponer un punto de partida en el desarrollo de una herramienta adecuada para la desinfección de aguas residuales. El tejido de poliamida presenta diferentes ventajas, como ser un material de bajo coste y altamente resistente al desgaste. Sin embargo, esa opción sólo será viable si el espectro de actividad bactericida de los RB-PAF puede ampliarse abarcando también a las bacterias Gram negativas, ya que los RB-PAF resultaron inactivos frente a nuestra bacteria Gram negativa representativa (*Escherichia coli*) cuando se realizaron experimentos en las mismas condiciones que las utilizadas frente a *E. faecalis* (datos no mostrados). En este sentido, esta falta de actividad contra las bacterias Gram negativas podría resolverse fácilmente introduciendo en el tejido funcionalidades catiónicas procedentes de materiales poliméricos o no poliméricos. Estos productos antimicrobianos establecen sinergias con el fotosensibilizador, incrementando drásticamente la actividad fotodinámica frente a bacterias Gram negativas [131,164].

Siguiendo esta línea, se está trabajando para optimizar las RB-PAF hasta conseguir una nueva herramienta para la desinfección de aguas residuales.

Conclusiones

Se prepararon tejidos de poliamida teñidos con el fotosensibilizador aniónico Rosa de Bengala, a tres concentraciones diferentes de 0.5, 1 y 3 % (o.w.f.). Cuando se probaron los tres tejidos de poliamida frente a bacterias Gram positivas (*E. faecalis*), sólo el tejido teñido con un 1 % de RB (o.w.f.) alcanzó una alta capacidad de fotoinactivación de *E. faecalis*, registrando una fotoinactivación de 6 unidades logarítmicas de reducción en ufc/mL bajo luz visible a 6.75 mW/cm² en 15 min. Sin embargo, los tejidos con 0.5 y 3 % (o.w.f.) no mostraron una buena eficacia para la inactivación bacteriana. Los estudios fotofísicos y fotodinámicos con bacterias han determinado que la cantidad de fotosensibilizador sobre el soporte desempeña un papel crucial en la inactivación bacteriana. Una cantidad menor de RB sobre el soporte no genera suficiente oxígeno singlete, mientras que una cantidad mayor puede ser contraproducente al provocar la agregación del fotosensibilizador, lo que también conduce a una disminución del oxígeno singlete. En este último caso, se produce un aumento apreciable de la carga negativa neta del tejido debido al carácter aniónico del RB que induce una mayor repulsión electrostática con las bacterias y contribuye a perjudicar la respuesta fotodinámica antibacteriana del tejido. Este trabajo abre la oportunidad de diseñar y desarrollar tejidos fotodinámicos más eficientes para la desinfección del agua, en los que se controle mejor el porcentaje de fotosensibilizador o se creen sinergias con otros elementos que reduzcan la repulsión electrostática con las bacterias.

CAPÍTULO IV

4.4 Síntesis, caracterización y evaluación de la lana de vidrio con Rosa de Bengala para la desinfección de aguas residuales urbanas

Introducción

Este capítulo se centra en la desinfección fotocatalítica de aguas residuales urbanas, utilizando aguas modelo con *E. coli* y *E. faecalis* como contaminantes.

Dentro de los procesos de oxidación avanzada la fotocatalisis heterogénea, utilizando fotosensibilizadores orgánicos anclados a su superficie, destaca por su uso en el tratamiento de aguas. Los fotosensibilizadores al ser expuestos a una longitud de onda específica son capaces de producir especies reactivas de oxígeno, incluidos aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicales OH^{\cdot} y oxígeno singlete (1O_2), especies citotóxicas para los microorganismos que indirecta o directamente causan la apoptosis, y posteriormente su muerte [177,178].

El uso de fotosensibilizadores como el RB en fase heterogénea, ha permitido mejorar el uso de este fotosensibilizador para la inactivación de bacterias y también mejorar la separación y su recuperación del medio de reacción [179].

En este capítulo se realizó el anclaje del RB sobre lana de vidrio (GW), para la fotoinactivación de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se sintetizó y caracterizó el material y posteriormente se comprobó el anclaje covalente entre el agente de acoplamiento de silano en la lana de vidrio y el RB, así como la carga de RB sobre el material, para finalmente ser evaluado frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas a una concentración inicial de 10^6 ufc/mL.

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo de trabajo de la unidad de tratamientos solares de agua en la Plataforma Solar de Almería-CIEMAT (Tabernas, Almería, España). Allí se realizaron los ensayos fotocatalíticos y microbiológicos para evaluar la capacidad de diferentes fotocatalizadores en la desinfección de aguas residuales de origen urbano entre ellos se encuentra la lana de vidrio con RB (GW-RB) en la cual nos centraremos en este capítulo.

Resultados y discusión

El nuevo fotocatalizador se obtuvo a partir de la lana de vidrio (GW) con Rosa de Bengala (RB) como fotosensibilizador orgánico soportado en su superficie. La síntesis del fotocatalizador (ver detalles en la sección 3.2) se muestra en el esquema de la Figura 52. El proceso para unir covalentemente el RB a la lana de vidrio se llevó a cabo en dos pasos, primeramente, durante la síntesis se realizó la activación de los grupos hidroxilo de la lana de vidrio con HCL y NH₄OH, para obtener así la superficie de la lana hidroxilada; posteriormente, fue derivatizada con APTES para cubrir la superficie de grupos aminos libres, facilitando así, consecutivamente, la unión covalente del RB a la GW, utilizando el EDC e imidazol como agentes de acoplamiento y dando lugar a la formación de GW-RB.

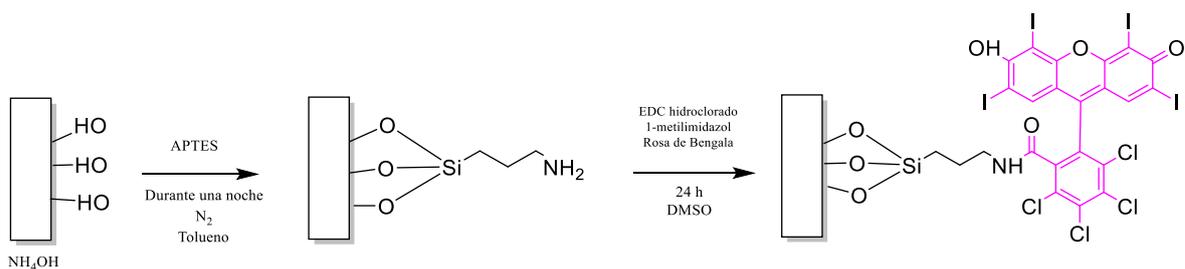


Figura 52. Síntesis del fotocatalizador heterogéneo GW-RB.

Carga de RB en la GW

La caracterización de la carga de RB sobre GW (Figura 53) se llevó a cabo mediante Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), mostrando valores de 1.121 ± 0.014 mg I/g. A partir de este valor se determinó que la carga del RB en GW es de 0.22 % (w/w) y, posteriormente, se calculó el porcentaje del área cubierta por las moléculas de RB descrito a continuación.

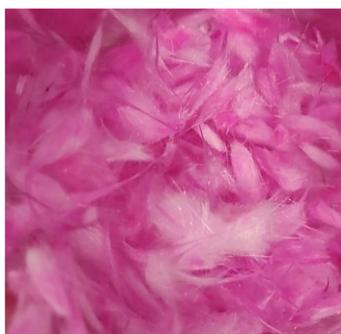


Figura 53. Lana de vidrio con RB anclado (GW-RB).

Para la determinación del porcentaje del área cubierta por las moléculas de RB, primero se determinó la cantidad de RB sobre la superficie de la GW tomando en cuenta las siguientes consideraciones; 1) asumiendo que es la GW es un cilindro y 2) un radio de 10 μm de GW.

Para determinar el área del RB en la GW se calculó a partir de la carga calculada a partir del ICP-MS del 2.2×10^{-3} g RB/g GW basándose en la cantidad de yodo tras la digestión por microondas que equivale a un 0.22% (p/p) en la GW.

Así, la masa de GW por g de GW-RB es (ecuación 4):

$$m_{GW} = 1 - m_{RB} = 1 - \frac{0.22}{100} = 0.9978 \text{ g GW (g GW - RB)}^{-1}$$

Luego, para determinar el volumen de una fibra de GW (ecuación 3 despejada), asumimos que tiene la misma densidad que el SiO_2 comercial ($d_{\text{SiO}_2} = 2.65 \text{ g cm}^{-3}$):

$$V_{GW} = \frac{m_{GW}}{d_{\text{SiO}_2}}$$

$$V_{GW} = \frac{0.9978 \text{ g}}{2.65 \text{ g/cm}^3}$$

$$V_{GW} = 0.3765 \text{ cm}^3 = 3.765 \times 10^{11} \mu\text{m}^3$$

Para la GW-RB, primeramente, se calculó la altura y el área de la GW calculándolo con las siguientes ecuaciones 36 y 37:

$$h_{GW} = \frac{V}{\pi (r)^2} \frac{3.765 \times 10^{11} \mu m^3}{\pi (10 \mu m)^2} = 1.199 \times 10^9 \mu m \quad \text{Ecuación 36}$$

$$A_{GW} = 2\pi r^2 + 2\pi r h = 2\pi (10)^2 + 2\pi(10)(1.199 \times 10^9) = 7.532 \times 10^{10} \mu m^2 \quad \text{Ecuación 37}$$

A continuación, se puede determinar el número de moléculas de RB por g de GW-RB mediante la ecuación 6:

$$\text{Moléculas de RB} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ g de RB } (g \text{ GW} - \text{RB})^{-1} \times \frac{1 \text{ mol}}{1017.64 \text{ g of RB}} \times \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}}$$

$$\text{Moléculas de RB} = 1.30 \times 10^{18} \text{ moléculas } (g \text{ GW} - \text{RB})^{-1}$$

Posteriormente, para obtener el área de las moléculas de RB se consideró que cada molécula es de $8.92 \times 10^7 \mu m^2$. A continuación, el área de las moléculas de RB obtenidas por g de GW-RB se estimaron a partir de la ecuación 7.

$$A_{RB} = 1.30 \times 10^{18} \text{ moléculas } (g \text{ GW} - \text{RB})^{-1} \times 8.92 \times 10^7 \mu m^2 \text{ molécula}^{-1}$$

Finalmente, se obtiene el valor del área del RB, por lo tanto, el valor del área es:

$$A_{RB} = 1.1 \times 10^{12} \text{ nm}^2 (g \text{ GW} - \text{RB})^{-1}$$

$$\frac{A_{RB}}{A_{SiO_2-RB}} = 1.1 \times 10^{12} \text{ nm}^2 (g \text{ GW} - \text{RB})^{-1} / 7.532 \times 10^{10} \mu m^2$$

Los cálculos obtenidos muestran que el área de las moléculas del RB sobre la superficie de la GW es superior al área superficial de la GW calculada.

También se registró el espectro de reflectancia UV-vis (Cary 500 de Agilent Technologies) que comprueba la presencia del RB en la superficie de la GW (Figura 54), esto comparando su espectro de adsorción con el RB sin anclar teniendo un máximo a 558 nm [180].

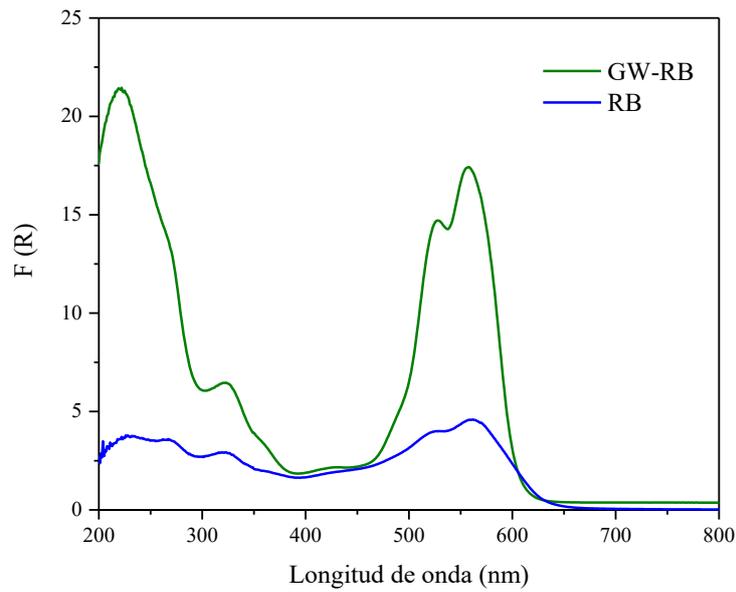


Figura 54. $F(R)$ vs longitud de onda de la GW-RB (verde) y RB (azul).

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (HRFESEM).

La morfología de la superficie de las muestras de GW con y sin RB se observaron mediante SEM de alta resolución utilizando un microscopio de barrido, para todas las muestras se utilizó un disco de 1 cm diámetro.

En la Figura 55 se puede observar que la GW comercial está compuesta por fibras homogéneas con una media de diámetro de *ca.* 20 μm .

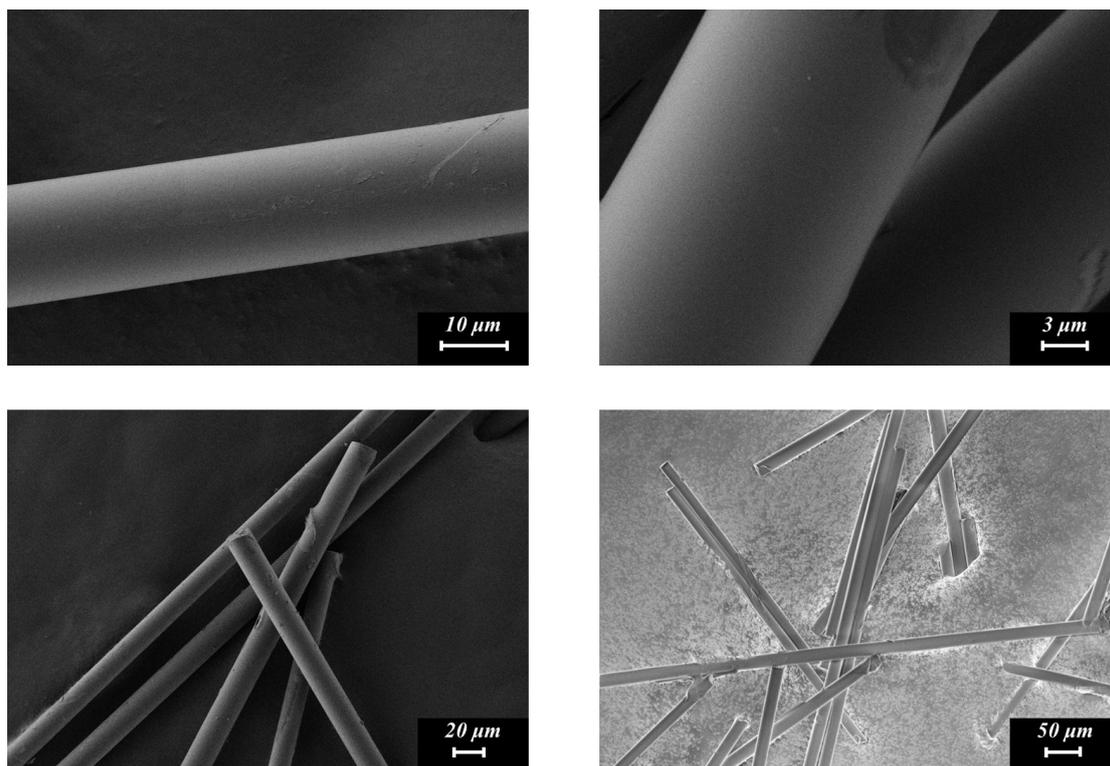


Figura 55. Imágenes de HRFSEM de la GW sin RB.

Tras la derivatización y anclaje del RB a las fibras de GW se puede distinguir visiblemente en la Figura 56, que una gran parte de la superficie de las fibras presenta rugosidades que se deben haber generado por la aglomeración de APTES sobre la superficie de la lana de vidrio. Estas rugosidades se encontraban cubiertas por el RB. Estas rugosidades deben de aumentar considerablemente la superficie de las fibras, lo cual podría explicar por qué en los cálculos de superficie de GW recubierta por RB mostraban un exceso de RB para recubrir toda la lana de vidrio.

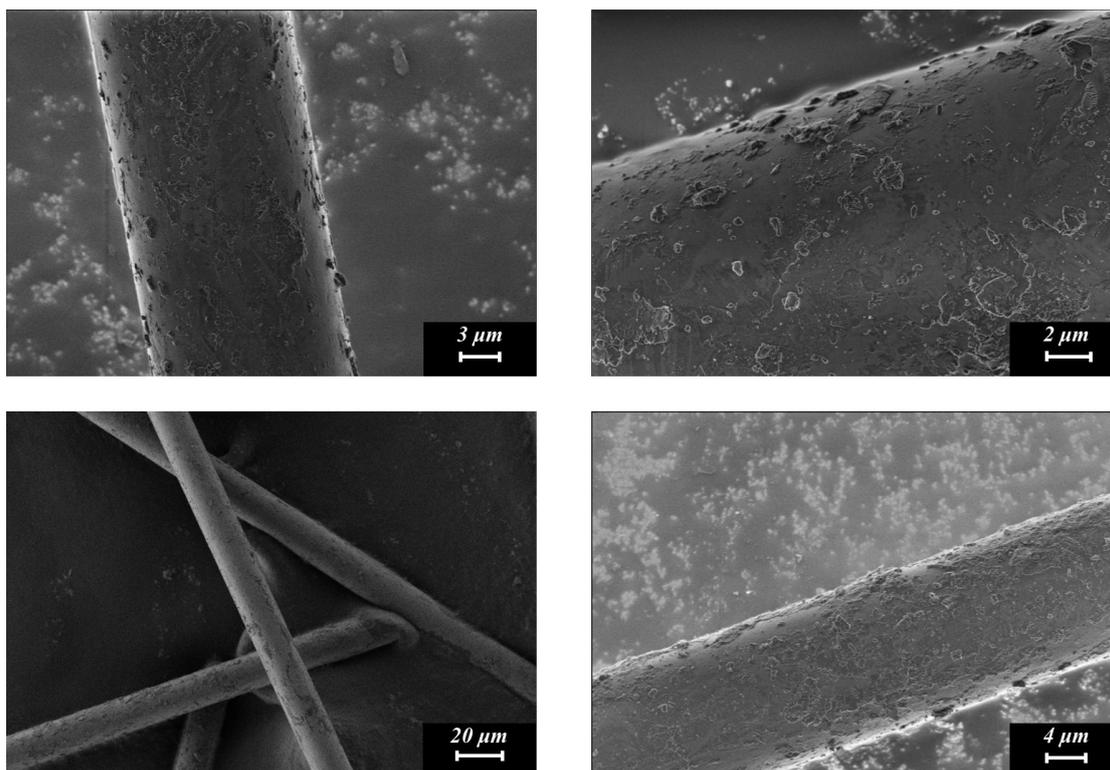


Figura 56. Imágenes de HRFSEM de la GW con RB anclado.

Espectroscopía de fluorescencia

La Figura 57 muestra los espectros de fluorescencia del RB en disolución y la GW-RB registrados en un rango de 520–800 nm. Se observó que la emisión GW-RB en comparación con el RB en disolución se desplaza hacia el rojo de 572 nm a 589 nm [180]. Este desplazamiento espectral hacia el rojo se debe principalmente al proceso de reabsorción, a medida que aumenta la concentración de agregados, también aumenta su capacidad para absorber la luz emitida [181]. Este efecto se ha observado tanto en RB inmovilizado en un soporte y también en disoluciones de agua y en disolventes polares y próticos [150,182], así como en otro tipo de colorantes como pironina B (PyB), la pironina Y (PyY) o la rodamina B [183,184].

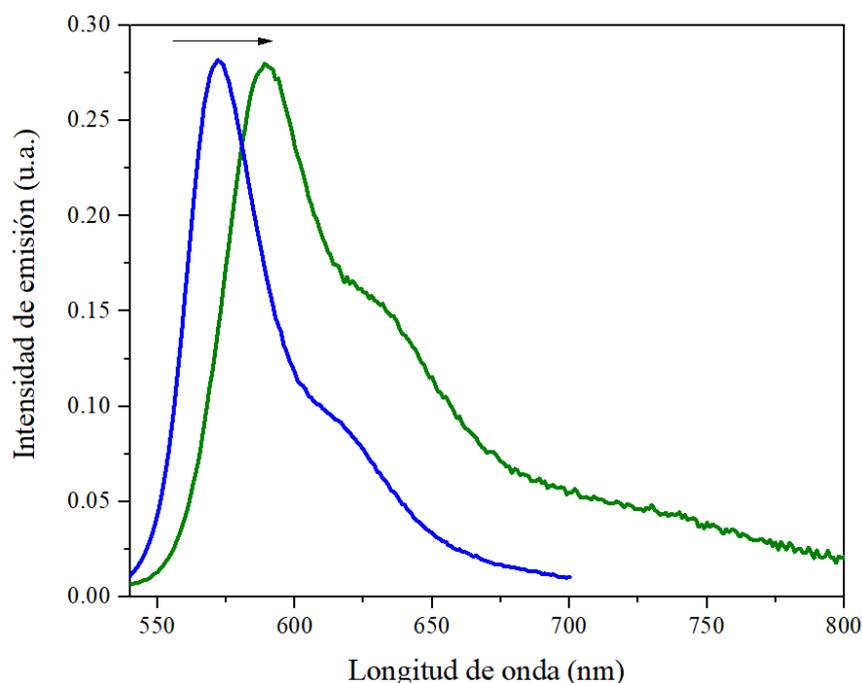


Figura 57. Espectros de emisión de fluorescencia de la GW-RB (verde) y el RB como control en homogéneo (azul) a $Abs=0.7$ at $\lambda_{exc}=500$ nm in H_2O .

Desinfección fotocatalítica

Los ensayos de desinfección se llevaron a cabo en un simulador solar (ver sección 3.6), con el fotocatalizador de GW-RB (1 g/L) y, paralelamente, el control de GW-RB que se evaluó en oscuridad (Figura 58). Los resultados no mostraron ningún efecto sobre la viabilidad de *E. coli* (Figura 58 A) ya que la concentración inicial permaneció constante a lo largo del tiempo de tratamiento. Sin embargo, para *E. faecalis* (Figura 58 B) se obtuvo una inactivación significativa (10^5 ufc/mL en 120 min de tratamiento). La mayor susceptibilidad de las bacterias Gram positivas a los fotosensibilizadores ha sido ampliamente reportada en la literatura y se atribuye a la diferente estructura de su pared celular.

Las bacterias Gram positivas son más fáciles de inactivar debido a que cuentan con una alta porosidad en su membrana externa (para permitir transferencia de nutrientes, glucopéptidos, polisacáridos y también fotosensibilizadores), ya que tienen una capa gruesa de peptidoglicano y no tienen una membrana lipídica externa [185]. Mientras que, en las bacterias Gram negativas, tienen una ligera capa de peptidoglicano y tienen una membrana lipídica externa, lo que hace que la transferencia de moléculas de bajo peso

molecular se produzca a través de canales específicos (porinas), limitando así, la internalización de los fotosensibilizadores [186].

Además, la alta carga superficial negativa con la que cuentan las bacterias Gram negativas, se debe a la capa de lipopolisacáridos que limita o impide la adsorción de colorantes aniónicos [187,188] como el RB, lo que explica perfectamente los resultados obtenidos en este estudio. Por otro lado, los resultados mostraron que la carga del catalizador es un factor clave en el comportamiento de inactivación de *E. faecalis*. Por lo que, es posible concluir que las fuerzas de atracción/repulsión entre *E. faecalis* y los fotocatalizadores, pueden ser responsables de la diferente inactivación observada en oscuridad, siendo que a mayor concentración de RB sobre el fotocatalizador se esté generando una mayor fuerza de atracción/ repulsión con *E. faecalis* y así provocando la inactivación de la bacteria. Sin embargo, este aspecto específico no es el objetivo de este estudio, y se necesitan otras investigaciones en el futuro para aclarar este comportamiento. Para *E. coli*, el fotocatalizador de GW-RB no mejoró la cinética de inactivación en comparación con solo el efecto de la radiación solar (Figura 58 A), logrando los mismos valores de reducción de 5 unidades logarítmicas (10^5 ufc/mL) en 90 min. Por el contrario, la cinética de inactivación de *E. faecalis* mejoró significativamente en comparación con solo el efecto de la radiación solar (10^6 ufc/mL en 60 min) (Figura 58 B). El orden de reactividad de inactivación tanto en la GW-RB irradiada como en el control en oscuridad concuerdan con trabajos reportados en la literatura basándose en la carga de RB inmovilizado. Por ejemplo Cooper *et al.*, [189], reportó el uso de bajas concentraciones de RB (a 0.1 y 1 mg/L) en agua desionizada a pH 7, obteniendo una inactivación total de *E. coli* de 10^3 a 10^4 ufc/mL de concentración inicial en 60 min. Nakonechny *et al.*, [190] estudiaron la actividad antibacteriana del RB homogéneo y el RB inmovilizado a una concentración de 50 mg/L en ambos casos, frente a *S. aureus* a 10^5 ufc/mL de concentración inicial, obteniendo la inactivación total de bacterias en 1 min para el RB en homogéneo y 10 min para el RB inmovilizado.

La rápida inactivación de *E. faecalis* en comparación con *E. coli* en presencia del RB se ha reportado desde finales de los años 80 por Dahl *et al.*, [191] donde reportaron una cinética de inactivación un 200% más rápida para bacterias Gram positivas (*Streptococcus salivarius*, *S. faecalis*, *S. aureus*) en comparación con una bacteria Gram negativa (*Salmonella typhimurium*) mediante RB irradiada. Recientemente, Gurianov *et*

al., [192] demostraron una mayor actividad antibacteriana de RB inmovilizado en sílice usando luz blanca visible, contra *S. aureus* en comparación con *E. coli*.

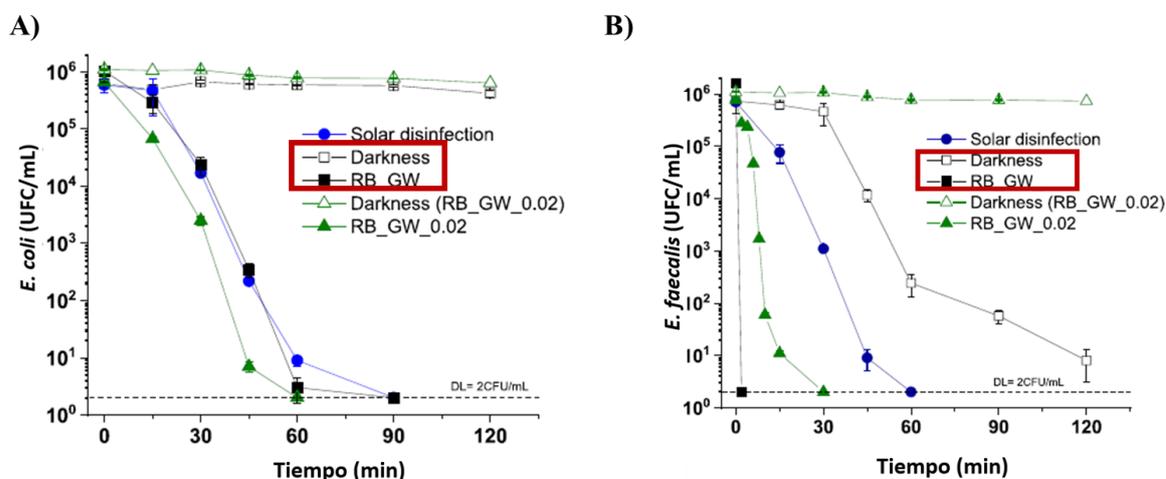


Figura 58. Perfiles de inactivación de *E. coli* (A) y *E. faecalis* (B) con GW-RB como fotocatalizador bajo irradiación y controles en oscuridad con Rosa de Bengala (1 g/L).

Estudios fotodinámicos

A partir de los estudios fotofísicos se obtuvieron los espectros de absorción transitoria en el rango de 300-800 nm a una longitud de onda de excitación de 532 nm sobre la GW-RB (Figura 59), registrado a diferentes tiempos después del pulso del láser. Los espectros de absorción de la GW-RB muestran la formación de $^3\text{RB}^{2-}$ (λ_{max} ca. 625 nm) [134,193]. También se midió la formación de tripletes de RB en la GW bajo atmósfera de nitrógeno y aire, comprobando que la formación de tripletes no se ve afectada. La desactivación de los espectros de absorción registrada a 620 nm mostró un tiempo de vida de aproximadamente $55.62 \pm 0.47 \mu\text{s}$. Con ello parece claro que el tiempo de vida del RB es muy largo, por lo que será capaz de generar oxígeno singlete, especie activa que será la especie responsable mayoritariamente de la desactivación de las bacterias.

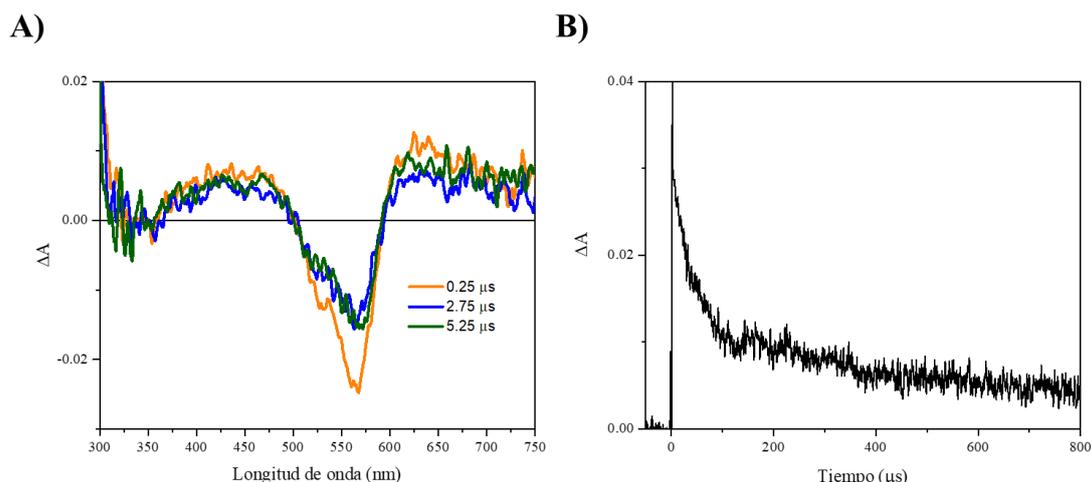


Figura 59. A) Espectros de absorción transitoria de GW-RB obtenidos a diferentes tiempos después del pulso del láser a $\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$ en sólido bajo atmosfera de aire. B) Señal corresponde a la desactivación del $^3\text{RB}^*$ registrada a 620 nm.

Conclusiones

Se ha sintetizado un nuevo fotocatalizador mediante la unión covalente de RB a la GW. Su caracterización se efectuó mediante reflectancia difusa, ICP-MS y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo y determinando también sus propiedades fotofísicas por espectroscopía de fluorescencia y pruebas de fotólisis de destello láser. Así se pudo determinar la carga de RB en la lana de vidrio y observar que las propiedades fotofísicas de RB soportado eran bastante similares a las descritas en homogéneo. Se detectó el estado excitado triplete con un tiempo de vida largo a partir del cual se debe generar el oxígeno singlete que debe ser la especie oxidante responsable de la desactivación de bacterias, aunque no se puede descartar la participación de reacciones de transferencia electrónica. Así, con la GW con RB cargada al 0.22 % (w/w) se realizaron estudios preliminares sobre la desinfección de aguas con RB anclado a la GW, observando una inactivación significativa particularmente sobre la bacteria Gram positiva *E. faecalis*, teniendo así, una prometedora aplicación en los procesos de desinfección de aguas.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis doctoral ha estado enfocada en demostrar que fotocatalizadores heterogéneos con colorantes orgánicos como el rosa bengala RB pueden ser aplicados en la desinfección y descontaminación de aguas. El objetivo principal de esta tesis se ha cumplido, el RB es capaz de fotodegradar contaminantes cuando está soportado y además presenta una estabilidad mayor que en disolución. Se ha visto que el RB puede servir para desinfección de aguas con bacterias Gram positivas. También se ha demostrado que el RB unido tanto covalentemente como iónicamente tiene una buena actividad fotocatalítica tanto para desinfección como para fotodegradación. Los estudios fotofísicos del RB en los diferentes soportes han demostrado que se genera el triplete del RB y tiene tiempos de vida largos, lo cual indica que en todos los soportes estudiados e independientemente del tipo de unión que se use, es capaz de generar oxígeno singlete y de desencadenar reacciones de transferencia electrónica. Las reacciones de transferencia electrónica parecen ser los procesos más favorables para fotodegradación de contaminantes en agua y la formación de oxígeno singlete, el mecanismo mayoritario para desinfección. También se ha visto que, si la carga de RB en el soporte es muy alta, como se vio en la tela, el RB puede perder eficiencia por autodesactivación.

Las conclusiones de cada capítulo fueron las siguientes:

- Capítulo I. Fotorreactividad de nuevos fotocatalizadores heterogéneos de Rosa de Bengala-SiO₂ con y sin núcleo de magnetita para la degradación de fármacos y la desinfección de aguas:

Se han preparado nuevos fotocatalizadores heterogéneos nanoestructurados que incorporan en su superficie RB. El RB fue anclado covalentemente a la superficie de nanopartículas de SiO₂, y nanopartículas de SiO₂ que incorporan un núcleo de magnetita, respectivamente. Ambos han demostrado ser eficientes en la fotodegradación de ACF, DCF y OFX bajo irradiación con luz visible, con mayor eficacia en el caso del DCF. Curiosamente, las propiedades fotofísicas del RB permanecen inalteradas, aunque la fotoestabilidad del RB anclado a los materiales heterogéneos es mayor que en medios homogéneos. La presencia del núcleo de magnetita en el fotocatalizador heterogéneo facilita su recuperación del medio y aumenta la concentración de RB en la superficie, sin modificar las propiedades

fotofísicas del fotocatalizador heterogéneo con RB. Estos nuevos fotocatalizadores también muestran una gran eficacia en la fotoinactivación de bacterias Gram positivas. El análisis de todas las constantes que intervienen en las degradaciones fotosensibilizadas de ACF, DCF y OFX ha evidenciado que los procesos de transferencia electrónica desde los tres fármacos al RB en disoluciones homogéneas y como fotocatalizador heterogéneo, son el paso inicial de sus oxidaciones. Además, en el caso de OFX la asociación inicial a RB juega un papel significativo.

- Capítulo II. Síntesis y caracterización de micropartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$ para la degradación de fármacos en aguas:

Se obtuvieron dos fotocatalizadores heterogéneos ($\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$) de tamaño micrométrico que tenían anclado covalentemente el Rosa de Bengala. Mediante técnicas de microscopía electrónica se determinó su tamaño, morfología esférica, y se comprobó la existencia del núcleo de magnetita. Por espectroscopía de absorción se pudo demostrar la presencia del RB en la superficie del material para las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$; sin embargo, se tuvo que recurrir a ICP para cuantificar el RB que tenían las micropartículas $\text{SiO}_2\text{-RB}$ y $\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-RB}$. Solo las micropartículas de $\text{SiO}_2\text{-RB}$ demostraron su eficiencia para degradar el DCF y este fue mejor que el obtenido en los soportes nanométricos. El hecho de conseguir un mejor recubrimiento de RB en el material micrométrico que en el nanométrico produjo una mayor adsorción del contaminante que conducía a una fotodegradación más rápida. Este último hecho indirectamente demostraba que el proceso de transferencia electrónica entre el contaminante y el RB debía ser el mecanismo de fotodegradación predominante.

Por otra parte, se vio que un campo magnético micrométrico puede afectar a las propiedades de colorantes cuando éstos están en la superficie de soportes de sílice.

- Capítulo III. Evaluación del porcentaje óptimo de Rosa de Bengala en tejidos de Poliamida para la fotoinactivación de bacterias Gram positivas con luz visible:

Se prepararon tejidos de poliamida teñidos con el fotosensibilizador aniónico Rosa de Bengala, a tres concentraciones diferentes de 0.5, 1 y 3 % (o.w.f.). Cuando se probaron los tres tejidos de poliamida frente a bacterias Gram positivas (*E. faecalis*), sólo el tejido teñido con un 1 % de RB (o.w.f.) alcanzó una alta capacidad de fotoinactivación de *E. faecalis*, registrando una fotoinactivación de 6 log₁₀ unidades de reducción en ufc/mL bajo luz visible a 6.75 mW/cm² en 15 min. Sin embargo, los tejidos con 0.5 y 3 % (o.w.f.) no mostraron una buena eficacia para la inactivación bacteriana. Los estudios fotofísicos y fotodinámicos con bacterias han determinado que la cantidad de fotosensibilizador sobre el soporte desempeña un papel crucial en la inactivación bacteriana. Una cantidad menor de RB sobre el soporte no genera suficiente oxígeno singlete, mientras que una cantidad mayor puede ser contraproducente al provocar la agregación del fotosensibilizador, lo que también conduce a una disminución del oxígeno singlete. En este último caso, se produce un aumento apreciable de la carga negativa neta del tejido debido al carácter aniónico del RB que induce una mayor repulsión electrostática con las bacterias y contribuye a perjudicar la respuesta fotodinámica antibacteriana del tejido. Este trabajo abre la oportunidad de diseñar y desarrollar tejidos fotodinámicos más eficientes para la desinfección del agua, en los que se controle mejor el porcentaje de fotosensibilizador o se creen sinergias con otros elementos que reduzcan la repulsión electrostática con las bacterias.

- Capítulo IV. Síntesis, caracterización y evaluación de la lana de vidrio con Rosa de Bengala para la desinfección de aguas residuales urbanas:

Se ha sintetizado un nuevo fotocatalizador mediante la unión covalente de RB a la GW. Su caracterización se efectuó mediante reflectancia difusa, ICP-MS y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo y determinando también sus propiedades fotofísicas por espectroscopía de fluorescencia y pruebas de fotólisis de destello láser. Así se pudo determinar la carga de RB en la lana de vidrio y observar que las propiedades fotofísicas de RB soportado eran bastante similares a las descritas en homogéneo. Se detectó el estado excitado triplete con

un tiempo de vida largo a partir del cual se debe generar el oxígeno singlete que debe ser la especie oxidante responsable de la desactivación de bacterias, aunque no se puede descartar la participación de reacciones de transferencia electrónica. Así, con la GW con RB cargada al 0.22 % (w/w) se realizaron estudios preliminares sobre la desinfección de aguas con RB anclado a la GW, observando una inactivación particularmente sobre la bacteria Gram positiva *E. faecalis*, teniendo así, una prometedora aplicación en los procesos de desinfección de aguas.

6. REFERENCIAS

- [1] M. Boix, L. Montastruc, C. Azzaro-Pantel, S. Domenech, Optimization methods applied to the design of eco-industrial parks: A literature review, *J. Clean. Prod.* 87 (2015) 303–317. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.032>.
- [2] A.L. Arce Velázquez., C.G. Calderón Mólgora, A.C. Tomasini Ortiz, *Fundamentos Técnicos Para El Muestreo Y Análisis De Aguas Residuales*, 2007.
- [3] M.L. Marin, L. Santos-Juanes, A. Arques, A.M. Amat, M.A. Miranda, Organic Photocatalysts for the Oxidation of Pollutants and Model Compounds, *Chem. Rev.* 112 (2012) 1710–1750. <https://doi.org/10.1021/cr2000543>.
- [4] J. Flores, P. Moya, F. Bosca, M.L. Marin, Photoreactivity of new rose bengal-SiO₂ heterogeneous photocatalysts with and without a magnetite core for drug degradation and disinfection, *Catal. Today.* 413–415 (2023) 113994. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2023.01.001>.
- [5] J. Ali, M. Ali, I. Khan, A. Khan, Z. Rafique, H. Waseem, Advances in biodegradation and bioremediation of emerging contaminants in the environment, in: *Biol. Approaches to Control. Pollut.*, Woodhead Publishing, 2022: pp. 121–138. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824316-9.00013-6>.
- [6] L. Fernández, Z. Lin, R.J. Schneider, V.I. Esteves, Â. Cunha, J.P.C. Tomé, Antimicrobial Photodynamic Activity of Cationic Nanoparticles Decorated with Glycosylated Photosensitizers for Water Disinfection, *ChemPhotoChem.* 2 (2018) 596–605. <https://doi.org/10.1002/cptc.201700169>.
- [7] C.A. Del Valle, V. Pérez-Laguna, I.M. Resta, R. Gavara, C. Felip-León, J.F. Miravet, A. Rezusta, F. Galindo, A cost-effective combination of Rose Bengal and off-the-shelf cationic polystyrene for the photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa.*, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 117 (2020) 111302. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111302>.
- [8] O. Planas, R. Bresolí-Obach, J. Nos, T. Gallavardin, R. Ruiz-González, M. Agut, S. Nonell, Synthesis, photophysical characterization, and photoinduced antibacterial activity of methylene blue-loaded amino- and mannose-targeted mesoporous silica nanoparticles., *Molecules.* 20 (2015) 6284–98.

<https://doi.org/10.3390/molecules20046284>.

- [9] S. Sharma, A. Bhattacharya, Drinking water contamination and treatment techniques, *Appl. Water Sci.* 7 (2017) 1043–1067. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0455-7>.
- [10] Y. Zhao, Z.X. Low, Y. Pan, Z. Zhong, G. Gao, Universal water disinfection by piezoelectret aluminium oxide-based electroporation and generation of reactive oxygen species, *Nano Energy.* 92 (2022) 106749. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2021.106749>.
- [11] N.M. Daud, S.R.S. Abdullah, H.A. Hasan, N.I. Ismail, Y. Dhokhikah, Integrated physical-biological treatment system for batik industry wastewater: A review on process selection, *Sci. Total Environ.* 819 (2022) 152931. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.152931>.
- [12] X. Garcia, D. Pargament, Reusing wastewater to cope with water scarcity: Economic, social and environmental considerations for decision-making, *Resour. Conserv. Recycl.* 101 (2015) 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.05.015>.
- [13] F. Pedrero, I. Kalavrouziotis, J.J. Alarcón, P. Koukoulakis, T. Asano, Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture—Review of some practices in Spain and Greece, *Agric. Water Manag.* 97 (2010) 1233–1241. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2010.03.003>.
- [14] M. Pedro-Monzonís, A. Solera, J. Ferrer, T. Estrela, J. Paredes-Arquiola, A review of water scarcity and drought indexes in water resources planning and management, *J. Hydrol.* 527 (2015) 482–493. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.05.003>.
- [15] R.R. Brown, N. Keath, T.H.F. Wong, Urban water management in cities: historical, current and future regimes, *Water Sci. Technol.* 59 (2009) 847–855. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.029>.
- [16] E. Nieuwenhuis, E. Cuppen, J. Langeveld, H. de Bruijn, Towards the integrated management of urban water systems: Conceptualizing integration and its uncertainties, *J. Clean. Prod.* 280 (2021) 124977. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124977>.

- [17] A.S. Sánchez, Toward “Zero Liquid Discharge” industrial facilities: Reducing the impact on freshwater resources by reusing industrial and urban wastewaters, in: *Concepts Adv. Zero Waste Tools Present Emerg. Waste Manag. Pract.*, Elsevier, 2020: pp. 215–246. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822183-9.00009-X>.
- [18] M.A. Ramos, M. Boix, D. Aussel, L. Montastruc, S. Domenech, Water integration in eco-industrial parks using a multi-leader-follower approach, *Comput. Chem. Eng.* 87 (2016) 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2016.01.005>.
- [19] A.M. Maszenan, Y. Liu, W.J. Ng, Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.09.004>.
- [20] T. Nandy, S.N. Kaul, Anaerobic pre-treatment of herbal-based pharmaceutical wastewater using fixed-film reactor with recourse to energy recovery, *Water Res.* 35 (2001) 351–362. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00263-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00263-3).
- [21] B. Tiwari, P. Drogui, R.D. Tyagi, Removal of emerging micro-pollutants from pharmaceutical industry wastewater, *Curr. Dev. Biotechnol. Bioeng.* (2020) 457–480. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819594-9.00018-8>.
- [22] C. Gadipelly, A. Pérez-González, G.D. Yadav, I. Ortiz, R. Ibáñez, V.K. Rathod, K. V. Marathe, Pharmaceutical industry wastewater: Review of the technologies for water treatment and reuse, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 11571–11592. <https://doi.org/10.1021/ie501210j>.
- [23] M. Klavarioti, D. Mantzavinos, D. Kassinos, Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes, *Environ. Int.* 35 (2009) 402–417. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2008.07.009>.
- [24] N. Vieno, T. Tuhkanen, L. Kronberg, Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland, *Water Res.* 41 (2007) 1001–1012. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.12.017>.
- [25] S. Castiglioni, R. Bagnati, R. Fanelli, F. Pomati, D. Calamari, E. Zuccato, Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 357–363. <https://doi.org/10.1021/ES050991M>.
- [26] R.H. Lindberg, U. Olofsson, P. Rendahl, M.I. Johansson, M. Tysklind, B.A.V.

- Andersson, Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1042–1048. <https://doi.org/10.1021/ES0516211>.
- [27] X.S. Miao, J.J. Yang, C.D. Metcalfe, Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 7469–7475. <https://doi.org/10.1021/ES050261E>.
- [28] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, R. Marotta, N. Paxéus, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*. 50 (2003) 1319–1330. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00769-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00769-5).
- [29] L. Shi, X. Zou, T. Wang, D. Wang, M. Fan, Z. Gong, Sunlight photocatalytic degradation of ofloxacin using UiO-66/wood composite photocatalysts, *Chinese Chem. Lett.* 33 (2022) 442–446. <https://doi.org/10.1016/J.CCLET.2021.06.048>.
- [30] P. Attri, Y.H. Kim, D.H. Park, J.H. Park, Y.J. Hong, H.S. Uhm, K.-N. Kim, A. Fridman, E.H. Choi, Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9332. <https://doi.org/10.1038/srep09332>.
- [31] J.L. Wang, L.J. Xu, Advanced oxidation processes for wastewater treatment: Formation of hydroxyl radical and application, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42 (2012) 251–325. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.507698>.
- [32] W. Lin, X. Liu, A. Ding, H.H. Ngo, R. Zhang, J. Nan, J. Ma, G. Li, Advanced oxidation processes (AOPs)-based sludge conditioning for enhanced sludge dewatering and micropollutants removal: A critical review, *J. Water Process Eng.* 45 (2022) 102468. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2021.102468>.
- [33] H. SIES, Strategies of antioxidant defense, *Eur. J. Biochem.* 215 (1993) 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>.
- [34] P. Liu, Z. Wu, A. V. Abramova, G. Cravotto, Sonochemical processes for the degradation of antibiotics in aqueous solutions: A review, *Ultrason. Sonochem.* 74 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2021.105566>.
- [35] D. Ghime, P. Ghosh, Fenton and Fenton-like processes for improving the

- dewaterability of refractory organic compounds, *Food, Medical, Environ. Appl. Polysaccharides*. (2021) 555–580. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819239-9.00010-5>.
- [36] Q.Q. Cai, L. Jothinathan, S.H. Deng, S.L. Ong, H.Y. Ng, J.Y. Hu, Fenton- and ozone-based AOP processes for industrial effluent treatment, *Adv. Oxid. Process. Effl. Treat. Plants*. (2021) 199–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821011-6.00011-6>.
- [37] W. Hua, E.R. Bennett, R.J. Letcher, Ozone treatment and the depletion of detectable pharmaceuticals and atrazine herbicide in drinking water sourced from the upper Detroit River, Ontario, Canada, *Water Res.* 40 (2006) 2259–2266. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.04.033>.
- [38] S. Nélieu, L. Kerhoas, J. Einhorn, Degradation of Atrazine into Ammeline by Combined Ozone/Hydrogen Peroxide Treatment in Water, *Environ. Sci. Technol.* 34 (1999) 430–437. <https://doi.org/10.1021/ES980540K>.
- [39] M.J. Quero-Pastor, M.C. Garrido-Perez, A. Acevedo, J.M. Quiroga, Ozonation of ibuprofen: A degradation and toxicity study, *Sci. Total Environ.* 466–467 (2014) 957–964. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.07.067>.
- [40] Y.L. Zhang, W.L. Wang, M.Y. Lee, Z.W. Yang, Q.Y. Wu, N. Huang, H.Y. Hu, Promotive effects of vacuum-UV/UV (185/254 nm) light on elimination of recalcitrant trace organic contaminants by UV-AOPs during wastewater treatment and reclamation: A review, *Sci. Total Environ.* 818 (2022) 151776. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151776>.
- [41] D.B. Miklos, W.L. Wang, K.G. Linden, J.E. Drewes, U. Hübner, Comparison of UV-AOPs (UV/H₂O₂, UV/PDS and UV/Chlorine) for TOC removal from municipal wastewater effluent and optical surrogate model evaluation, *Chem. Eng. J.* 362 (2019) 537–547. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.041>.
- [42] L. Varanasi, E. Coscarelli, M. Khaksari, L.R. Mazzoleni, D. Minakata, Transformations of dissolved organic matter induced by UV photolysis, Hydroxyl radicals, chlorine radicals, and sulfate radicals in aqueous-phase UV-Based advanced oxidation processes, *Water Res.* 135 (2018) 22–30. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.015>.

- [43] P.B. Patil, S. Raut-Jadhav, Intensification of degradation of acetamiprid by the combination of ultrasonic cavitation with other advanced oxidation processes (AOPs), *J. Indian Chem. Soc.* 99 (2022) 100353. <https://doi.org/10.1016/J.JICS.2022.100353>.
- [44] P.B. Patil, S. Raut-Jadhav, A.B. Pandit, Effect of intensifying additives on the degradation of thiamethoxam using ultrasound cavitation, *Ultrason. Sonochem.* 70 (2021) 105310. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2020.105310>.
- [45] N. Golash, P.R. Gogate, Degradation of dichlorvos containing wastewaters using sonochemical reactors, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 1051–1060. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2012.02.011>.
- [46] E. De Bel, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, C. Janssen, Influence of pH on the sonolysis of ciprofloxacin: Biodegradability, ecotoxicity and antibiotic activity of its degradation products, *Chemosphere.* 77 (2009) 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.033>.
- [47] T. Fang, L. Liao, X. Xu, J. Peng, Y. Jing, Removal of COD and colour in real pharmaceutical wastewater by photoelectrocatalytic oxidation method, <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/09593330.2012.715760>. 34 (2012) 779–786. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.715760>.
- [48] G.G. Bessegato, J.C. Cardoso, M.V.B. Zanoni, Enhanced photoelectrocatalytic degradation of an acid dye with boron-doped TiO₂ nanotube anodes, *Catal. Today.* 240 (2015) 100–106. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2014.03.073>.
- [49] J. Georgieva, E. Valova, S. Arnyanov, N. Philippidis, I. Poulis, S. Sotiropoulos, Bi-component semiconductor oxide photoanodes for the photoelectrocatalytic oxidation of organic solutes and vapours: A short review with emphasis to TiO₂–WO₃ photoanodes, *J. Hazard. Mater.* 211–212 (2012) 30–46. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2011.11.069>.
- [50] S. Yang, Y. Feng, D. Gao, X. Wang, N. Suo, Y. Yu, S. Zhang, Electrocatalysis degradation of tetracycline in a three-dimensional aeration electrocatalysis reactor (3D-AER) with a flotation-tailings particle electrode (FPE): Physicochemical properties, influencing factors and the degradation mechanism, *J. Hazard. Mater.* 407 (2021) 124361. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124361>.

- [51] C.A. Martínez-Huitle, M. Panizza, Electrochemical oxidation of organic pollutants for wastewater treatment, *Curr. Opin. Electrochem.* 11 (2018) 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2018.07.010>.
- [52] C. Zhang, Y. Jiang, Y. Li, Z. Hu, L. Zhou, M. Zhou, Three-dimensional electrochemical process for wastewater treatment: A general review, *Chem. Eng. J.* 228 (2013) 455–467. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2013.05.033>.
- [53] R. Chakraborty, M. Pradhan, Phosphides and nitrides for visible light photocatalysis, *Nanostructured Mater. Visible Light Photocatal.* (2022) 197–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823018-3.00020-8>.
- [54] S. Singh, B.K. Singh, Nanomaterials aspects for photocatalysis, in: *Nanostructured Mater. Visible Light Photocatal.*, Elsevier, 2022: pp. 23–46. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823018-3.00015-4>.
- [55] T.K. Sinha, Morphology-dependent visible light photocatalysis, in: *Nanostructured Mater. Visible Light Photocatal.*, Elsevier, 2022: pp. 375–412. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823018-3.00012-9>.
- [56] J.J. Rueda-Marquez, I. Levchuk, P. Fernández Ibañez, M. Sillanpää, A critical review on application of photocatalysis for toxicity reduction of real wastewaters, *J. Clean. Prod.* 258 (2020) 120694. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.120694>.
- [57] A.M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2011 83. 8 (2011) 649–666. <https://doi.org/10.1007/BF03326250>.
- [58] Y. Zhang, J. Zhou, W. Cai, J. Zhou, Z. Li, Enhanced photocatalytic performance and degradation pathway of Rhodamine B over hierarchical double-shelled zinc nickel oxide hollow sphere heterojunction, *Appl. Surf. Sci.* 430 (2018) 549–560. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2017.06.325>.
- [59] D. Rajkumar, K. Palanivelu, Electrochemical treatment of industrial wastewater, *J. Hazard. Mater.* 113 (2004) 123–129. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2004.05.039>.

- [60] M.A. Shannon, P.W. Bohn, M. Elimelech, J.G. Georgiadis, B.J. Mariñas, A.M. Mayes, A.M. Mayes, Science and technology for water purification in the coming decades, *Nanosci. Technol. A Collect. Rev. from Nat. Journals.* (2009) 337–346. https://doi.org/10.1142/9789814287005_0035.
- [61] M.N. Chong, B. Jin, C.W.K.K. Chow, C. Saint, Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review, *Water Res.* 44 (2010) 2997–3027. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.039>.
- [62] U.I. Gaya, Heterogeneous photocatalysis using inorganic semiconductor solids, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7775-0>.
- [63] Y. Ye, H. Bruning, D. Yntema, M. Mayer, H. Rijnaarts, Homogeneous photosensitized degradation of pharmaceuticals by using red light LED as light source and methylene blue as photosensitizer, *Chem. Eng. J.* 316 (2017) 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.053>.
- [64] C. Chen, W. Ma, J. Zhao, Semiconductor-mediated photodegradation of pollutants under visible-light irradiation, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4206–4219. <https://doi.org/10.1039/B921692H>.
- [65] E. Polat, K. Kang, Natural photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy, *Biomedicines.* 9 (2021) 584. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060584>.
- [66] R. Martinez-Haya, M.A. Miranda, M.L. Marin, Type I vs Type II photodegradation of pollutants, *Catal. Today.* 313 (2018) 161–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.10.034>.
- [67] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.07.049>.
- [68] C. Wang, J. Li, G. Mele, G.-M. Yang, F.-X. Zhang, L. Palmisano, G. Vasapollo, Efficient degradation of 4-nitrophenol by using functionalized porphyrin-TiO₂ photocatalysts under visible irradiation, *Appl. Catal. B Environ.* 76 (2007) 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2007.05.028>.
- [69] R. Rahimi, S. Zargari, A. Yousefi, M. Yaghoubi Berijani, A. Ghaffarinejad, A.

- Morsali, Visible light photocatalytic disinfection of *E. coli* with TiO₂-graphene nanocomposite sensitized with tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin, *Appl. Surf. Sci.* 355 (2015) 1098–1106. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.07.115>.
- [70] Z. Youssef, L. Colombeau, N. Yesmurzayeva, F. Baros, R. Vanderesse, T. Hamieh, J. Toufaily, C. Frochot, T. Roques-Carmes, Dye-sensitized nanoparticles for heterogeneous photocatalysis: Cases studies with TiO₂, ZnO, fullerene and graphene for water purification, *Dye. Pigment.* 159 (2018) 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.06.002>.
- [71] A. Corma, V. Fornés, H. Garcia, M.A. Miranda, M.J. Sabater, Highly Efficient Photoinduced Electron Transfer with 2, 4, 6-Triphenylpyrylium Cation Incorporated inside Extra Large Pore Zeotype MCM-41, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 9767–9768. <https://doi.org/10.1021/ja00100a059>.
- [72] B.M. Estevao, F. Cucinotta, N. Hioka, M. Cossi, M. Argeri, G. Paul, L. Marchese, E. Gianotti, Rose Bengal incorporated in mesostructured silica nanoparticles: structural characterization, theoretical modeling and singlet oxygen delivery, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 26804–26812. <https://doi.org/10.1039/c5cp03564c>.
- [73] C. Mendoza, N. Emmanuel, C.A. Páez, L. Dreesen, J.M. Monbaliu, B. Heinrichs, Improving Continuous Flow Singlet Oxygen Photooxygenation Reactions with Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles, *ChemPhotoChem.* 2 (2018) 890–897. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800148>.
- [74] A. Kumar, P. Raizada, P. Singh, R. V. Saini, A.K. Saini, A. Hosseini-Bandegharai, Perspective and status of polymeric graphitic carbon nitride based Z-scheme photocatalytic systems for sustainable photocatalytic water purification, *Chem. Eng. J.* 391 (2020) 123496. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123496>.
- [75] P. Raizada, A. Sudhaik, P. Singh, P. Shandilya, A.K. Saini, V.K. Gupta, J.H. Lim, H. Jung, A. Hosseini-Bandegharai, Fabrication of Ag₃VO₄ decorated phosphorus and sulphur co-doped graphitic carbon nitride as a high-dispersed photocatalyst for phenol mineralization and *E. coli* disinfection, *Sep. Purif. Technol.* 212 (2019) 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.12.007>.
- [76] P. Singh, A. Sudhaik, P. Raizada, P. Shandilya, R. Sharma, A. Hosseini-Bandegharai, Photocatalytic performance and quick recovery of BiOI/Fe₃O₄

- @graphene oxide ternary photocatalyst for photodegradation of 2,4-dinitrophenol under visible light, *Mater. Today Chem.* 12 (2019) 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.12.006>.
- [77] V. Hasija, A. Sudhaik, P. Raizada, A. Hosseini-Bandegharai, P. Singh, Carbon quantum dots supported AgI /ZnO/phosphorus doped graphitic carbon nitride as Z-scheme photocatalyst for efficient photodegradation of 2, 4-dinitrophenol, *J. Environ. Chem. Eng.* 7 (2019) 103272. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103272>.
- [78] A. Blázquez-Moraleja, O. Cabezuelo, R. Martinez-Haya, L.C. Schmidt, F. Bosca, M.L. Marin, Organic photoredox catalysts: tuning the operating mechanisms in the degradation of pollutants, *Pure Appl. Chem.* (2023) 1–14. <https://doi.org/10.1515/pac-2022-1206>.
- [79] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.* 233 (2002) 351–371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- [80] R. Boltes Cecatto, L. Siqueira de Magalhães, M. Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, C. Pavani, A. Lino-dos-Santos-Franco, M. Teixeira Gomes, D. Fátima Teixeira Silva, Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: The state of the art, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 31 (2020) 101828. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2020.101828>.
- [81] X.L. Yan, T. Ohno, K. Nishijima, R. Abe, B. Ohtani, Is methylene blue an appropriate substrate for a photocatalytic activity test? A study with visible-light responsive titania, *Chem. Phys. Lett.* 429 (2006) 606–610. [doi:10.1016/j.cpl.2006.06.010](https://doi.org/10.1016/j.cpl.2006.06.010). [isi:000241097900050](https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2020.101828).
- [82] F. Cieplik, D. Deng, W. Crielaard, W. Buchalla, E. Hellwig, A. Al-Ahmad, T. Maisch, Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't, *Crit. Rev. Microbiol.* 44 (2018) 571–589. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467876>.
- [83] J.S. Miller, Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated light, *Water Res.* 39 (2005) 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.09.019>.
- [84] X. Li, J.L. Shi, H. Hao, X. Lang, Visible light-induced selective oxidation of

- alcohols with air by dye-sensitized TiO₂ photocatalysis, *Appl. Catal. B Environ.* 232 (2018) 260–267. <https://doi.org/10.1016/J.APCATB.2018.03.043>.
- [85] K. Hirakawa, H. Ito, Rhodamine-6G can photosensitize folic acid decomposition through electron transfer, *Chem. Phys. Lett.* 627 (2015) 26–29. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2015.03.030>.
- [86] B.M. Estevao, I. Miletto, L. Marchese, E. Gianotti, Optimized Rhodamine B labeled mesoporous silica nanoparticles as fluorescent scaffolds for the immobilization of photosensitizers: a theranostic platform for optical imaging and photodynamic therapy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 9042–9052. <https://doi.org/10.1039/c6cp00906a>.
- [87] D. Magde, G.E. Rojas, P.G. Seybold, Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 737–744. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.1999.TB08277.X>.
- [88] W.S. Kuo, Y.H. Chiang, L.S. Lai, Solar photocatalysis of carbaryl rinsate promoted by dye photosensitization, *Dye. Pigment.* 76 (2008) 82–87. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2006.08.015>.
- [89] S. Demartis, A. Obinu, E. Gavini, P. Giunchedi, G. Rassu, Nanotechnology-based rose Bengal: A broad-spectrum biomedical tool, *Dye. Pigment.* 188 (2021) 109236. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109236>.
- [90] M.A. Rauf, J.P. Graham, S.B. Bukallah, M.A.S. Al-Saedi, Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 72 (2009) 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.08.018>.
- [91] J.S. Miller, Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated, *Water Res.* 39 (2005) 412–422. [isi:000226727600016](https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.016).
- [92] E. Panzarini, V. Inguscio, L. Dini, Overview of cell death mechanisms induced by rose bengal acetate-photodynamic therapy, *Int. J. Photoenergy.* 2011 (2011). <https://doi.org/10.1155/2011/713726>.
- [93] C. Spagnul, L.C. Turner, R.W. Boyle, Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 150 (2015) 11–30.

- <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.04.021>.
- [94] M. Varghese, M. Balachandran, Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 106821. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106821>.
- [95] M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker, Brock biology of micro-organisms, Benjamin Cummings, 2015. https://books.google.com/books/about/Brock_Biology_of_Microorganisms.html?hl=id&id=mwUpAQAAMAAJ (accessed July 5, 2023).
- [96] M.Q. Mesquita, C.J. Dias, M.G.P.M.S. Neves, A. Almeida, M.A.F. Faustino, Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy, *Molecules*. 23 (2018). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23102424>.
- [97] R. Youf, M. Müller, A. Balasini, F. Thétiot, M. Müller, A. Hascoët, U. Jonas, H. Schönherr, G. Lemerrier, T. Montier, T. Le Gall, Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1995. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13121995>.
- [98] K. Hirakawa, K. Ota, J. Hirayama, S. Oikawa, S. Kawanishi, Nile Blue Can Photosensitize DNA Damage through Electron Transfer, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 649–655. <https://doi.org/10.1021/tx400475c>.
- [99] L. Sobotta, P. Skupin-mrugalska, J. Piskorz, J. Mielcarek, Dyes and Pigments Non-porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria, *Dye. Pigment.* 163 (2019) 337–355. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.12.014>.
- [100] H.L. Ding, Y.X. Zhang, S. Wang, J.M. Xu, S.C. Xu, G.H. Li, Fe₃O₄@SiO₂ core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses, *Chem. Mater.* 24 (2012) 4572–4580. <https://doi.org/10.1021/cm302828d>.
- [101] J. Park, K. An, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, N.-M. Hwang, T. Hyeon, Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals, *Nat. Mater.* 3 (2004) 891–895. <https://doi.org/10.1038/nmat1251>.
- [102] R. Mohammadpour, M. Yazdimamaghani, D.L. Cheney, J. Jedrzkiewicz, H.

- Ghandehari, Subchronic toxicity of silica nanoparticles as a function of size and porosity, *J. Control. Release.* 304 (2019) 216–232. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.041>.
- [103] H. Deng, H. Chen, H. Li, Synthesis of crystal MFe_2O_4 ($M=Mg, Cu, Ni$) microspheres, *Mater. Chem. Phys.* 101 (2007) 509–513. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2006.10.002>.
- [104] H. Deng, X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen, Y. Li, Monodisperse Magnetic Single-Crystal Ferrite Microspheres, *Angew. Chemie Int. Ed.* 44 (2005) 2782–2785. <https://doi.org/10.1002/anie.200462551>.
- [105] G. Shi, B. Sun, Z. Jin, J. Liu, M. Li, Synthesis of SiO_2/Fe_3O_4 nanomaterial and its application as cataluminescence gas sensor material for ether, *Sensors Actuators B Chem.* 171–172 (2012) 699–704. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.059>.
- [106] Y. Wang, F. Gayet, P. Guillo, D. Agustin, Organic solvent-free olefins and alcohols (ep)oxidation using recoverable catalysts based on $[PM12O40]^{3-}$ ($M = Mo$ or W) ionically grafted on amino functionalized silica nanobeads, *Materials (Basel)*. 12 (2019) 3278. <https://doi.org/10.3390/ma12203278>.
- [107] A. Elhage, B. Wang, N. Marina, M.L. Marin, M. Cruz, A.E. Lanterna, J.C. Scaiano, Glass wool: a novel support for heterogeneous catalysis, *Chem. Sci.* 9 (2018) 6844–6852. <https://doi.org/10.1039/C8SC02115E>.
- [108] M.M. Bello, A.A.A. Raman, Adsorption and Oxidation Techniques to Remove Organic Pollutants from Water, in: 2018: pp. 249–300. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92111-2_8.
- [109] Y. Mameri, N. Debbache, M.E.M. Benacherine, N. Seraghni, T. Sehili, Heterogeneous photodegradation of paracetamol using Goethite/ H_2O_2 and Goethite/oxalic acid systems under artificial and natural light, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 315 (2016) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.09.019>.
- [110] C.R. Ohoro, A.O. Adeniji, A.I. Okoh, O.O. Okoh, Distribution and Chemical Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Environmental Systems: A Review, *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* 2019, Vol. 16, Page 3026. 16 (2019) 3026. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16173026>.

- [111] Y. Valcárcel, S.G. Alonso, J.L. Rodríguez-Gil, R.R. Maroto, A. Gil, M. Catalá, Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain, *Chemosphere*. 82 (2011) 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.041>.
- [112] A. Nasiri, F. Tamaddon, M.H. Mosslemin, M. Amiri Gharaghani, A. Asadipour, Magnetic nano-biocomposite CuFe₂O₄@methylcellulose (MC) prepared as a new nano-photocatalyst for degradation of ciprofloxacin from aqueous solution, *Environ. Heal. Eng. Manag.* 6 (2019) 41–51. <https://doi.org/10.15171/ehem.2019.05>.
- [113] X. Ren, Y. Zhang, L. Yang, Z. Chen, Degradation of ofloxacin by peroxymonosulfate activated with cobalt-doped graphitic carbon nitride: Mechanism and performance, *Inorg. Chem. Commun.* 133 (2021) 108863. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.108863>.
- [114] J. Radjenović, M. Petrović, D. Barceló, Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment, *Water Res.* 43 (2009) 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>.
- [115] G. Maniakova, M.I. Polo-López, I. Oller, M.J. Abeledo-Lameiro, S. Malato, L. Rizzo, Simultaneous disinfection and microcontaminants elimination of urban wastewater secondary effluent by solar advanced oxidation sequential treatment at pilot scale, *J. Hazard. Mater.* 436 (2022) 129134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129134>.
- [116] P. Fernández-Castro, M. Vallejo, M.F. San Román, I. Ortiz, Insight on the fundamentals of advanced oxidation processes. Role and review of the determination methods of reactive oxygen species, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 796–820. <https://doi.org/10.1002/JCTB.4634>.
- [117] A.R. Ribeiro, O.C. Nunes, M.F.R. Pereira, A.M.T. Silva, An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU, *Environ. Int.* 75 (2015) 33–51. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.027>.

- [118] S. Giannakis, S. Rtimi, C. Pulgarin, Light-Assisted Advanced Oxidation Processes for the Elimination of Chemical and Microbiological Pollution of Wastewaters in Developed and Developing Countries, *Mol.* 2017, Vol. 22, Page 1070. 22 (2017) 1070. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22071070>.
- [119] M.R. Hoffmann, S.T. Martin, W.Y. Choi, D.W. Bahnemann, Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis, *Chem. Rev.* 95 (1995) 69–96. <https://doi.org/10.1021/cr00033a004>.
- [120] R. Martinez-Haya, J. Gomis, A. Arques, A.M. Amat, M.A. Miranda, M.L. Marin, Direct detection of the triphenylpyrylium-derived short-lived intermediates in the photocatalyzed degradation of acetaminophen, acetamiprid, caffeine and carbamazepine, *J. Hazard. Mater.* 356 (2018) 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.05.023>.
- [121] J.A. Rengifo-Herrera, J. Sanabria, F. Machuca, C.F. Dierolf, C. Pulgarin, G. Orellana, A comparison of solar photocatalytic inactivation of waterborne *E. coli* using tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II), Rose bengal, and TiO₂, *J. Sol. Energy Eng. Trans. ASME.* 129 (2007) 135–140. <https://doi.org/10.1115/1.2391319>.
- [122] E.A. Serna-Galvis, J.A. Troyon, S. Giannakis, R.A. Torres-Palma, C. Minero, D. Vione, C. Pulgarin, Photoinduced disinfection in sunlit natural waters: Measurement of the second order inactivation rate constants between *E. coli* and photogenerated transient species, *Water Res.* 147 (2018) 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.011>.
- [123] S. Wang, Z. Zhang, B. Liu, J. Li, Silica coated magnetic Fe₃O₄ nanoparticles supported phosphotungstic acid: A novel environmentally friendly catalyst for the synthesis of 5-ethoxymethylfurfural from 5-hydroxymethylfurfural and fructose, *Catal. Sci. Technol.* 3 (2013) 2104–2112. <https://doi.org/10.1039/c3cy00223c>.
- [124] D. Palma, A.B. Prevot, M. Brigante, D. Fabbri, G. Magnacca, C. Richard, G. Mailhot, R. Nisticò, New Insights on the Photodegradation of Caffeine in the Presence of Bio-Based Substances-Magnetic Iron Oxide Hybrid Nanomaterials, *Mater.* 2018, Vol. 11, Page 1084. 11 (2018) 1084. <https://doi.org/10.3390/MA11071084>.
- [125] O. Cabezuelo, R. Martinez-Haya, N. Montes, F. Bosca, M.L. Marin,

- Heterogeneous riboflavin-based photocatalyst for pollutant oxidation through electron transfer processes, *Appl. Catal. B Environ.* 298 (2021) 120497. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2021.120497>.
- [126] Y. Liu, X. Liu, Y. Xiao, F. Chen, F. Xiao, A multifunctional nanoplatform based on mesoporous silica nanoparticles for imaging-guided chemo/photodynamic synergetic therapy, *RSC Adv.* 7 (2017) 31133–31141. <https://doi.org/10.1039/C7RA04549B>.
- [127] M. Khan, C.S.L. Fung, A. Kumar, I.M.C. Lo, Magnetically separable BiOBr/Fe₃O₄@SiO₂ for visible-light-driven photocatalytic degradation of ibuprofen: Mechanistic investigation and prototype development, *J. Hazard. Mater.* 365 (2019) 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.053>.
- [128] S.M. Soria-Castro, B. Lebeau, M. Cormier, S. Neunlist, T.J. Daou, J.P. Goddard, Organic/Inorganic Heterogeneous Silica-Based Photoredox Catalyst for Aza-Henry Reactions, *European J. Org. Chem.* 2020 (2020) 1572–1578. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901382>.
- [129] H.B. Rodríguez, M.G. Lagorio, E. San Román, Rose Bengal adsorbed on microgranular cellulose: evidence on fluorescent dimers, *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (2004) 674–680. <https://doi.org/10.1039/b402484b>.
- [130] Y. Guo, S. Rogelj, P. Zhang, Rose Bengal-decorated silica nanoparticles as photosensitizers for inactivation of gram-positive bacteria, *Nanotechnology.* 21 (2010) 065102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/21/6/065102>.
- [131] A. Blázquez-Moraleja, P. Moya, M.L. Marin, F. Bosca, Synthesis of Novel Heterogeneous Photocatalysts based on Rose Bengal for effective Wastewater Disinfection and Decontamination, *Catal. Today.* (2022). <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.11.009>.
- [132] N.A. Romero, D.A. Nicewicz, Organic Photoredox Catalysis, *Chem. Rev.* 116 (2016) 10075–10166. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00057>.
- [133] P. Talay Pinar, Electrochemical behaviour of ofloxacin in pharmaceutical and biological samples using a boron-doped diamond electrode in using anionic surfactant, *Gazi Univ. J. Sci.* 31 (2018) 66–80.

- [134] L. Ludvíková, P. Friš, D. Heger, P. Šebej, J. Wirz, P. Klán, Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: A comprehensive kinetic analysis, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 16266–16273. <https://doi.org/10.1039/c6cp01710j>.
- [135] S.L. Murov, I. Carmichael, G.L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, 2009.
- [136] L. Qin, G.N.R. Tripathi, R.H. Schüler, Radiation Chemical Studies of the Oxidation of Aniline in Aqueous Solution, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. A J. Phys. Sci.* 40 (1985) 1026–1039. <https://doi.org/10.1515/ZNA-1985-1009/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [137] R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂(¹Δ_g) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 79 (1994) 11–17. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/1010-6030\(93\)03746-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/1010-6030(93)03746-4).
- [138] M. Bregnhøj, M. Westberg, F. Jensen, P.R. Ogilby, Solvent-dependent singlet oxygen lifetimes: Temperature effects implicate tunneling and charge-transfer interactions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 22946–22961. <https://doi.org/10.1039/c6cp01635a>.
- [139] I. Berruti, M. Inmaculada Polo-López, I. Oller, J. Flores, M. Luisa Marin, F. Bosca, Sulfate radical anion: Laser flash photolysis study and application in water disinfection and decontamination, *Appl. Catal. B Environ.* 315 (2022) 121519. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2022.121519>.
- [140] J. Low, C. Zhang, J. Ma, D.Y. Murzin, Y. Xiong, Heterogeneous photocatalysis: what is being overlooked?, *Trends Chem.* 5 (2023) 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2022.11.007>.
- [141] D. Friedmann, Transient absorption spectroscopy insights into heterogeneous photocatalysis for water pollution remediation, *Appl. Catal. A Gen.* 649 (2023) 118943. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2022.118943>.
- [142] N. Body, C. Lefebvre, P. Eloy, T. Haynes, S. Hermans, O. Riant, Impact of silica nanoparticles architectures on the photosensitization of O₂ by immobilized Rose Bengal, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 440 (2023) 114648. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEM.2023.114648>.

- [143] E. Gianotti, B. Martins Estevão, F. Cucinotta, N. Hioka, M. Rizzi, F. Renò, L. Marchese, An efficient rose bengal based nanoplatform for photodynamic therapy, *Chem. - A Eur. J.* 20 (2014) 10921–10925. <https://doi.org/10.1002/chem.201404296>.
- [144] M. Scholz, R. Džedić, T. Breitenbach, J. Hála, Singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence of common water-soluble photosensitizers, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12 (2013) 1873–1884. <https://doi.org/10.1039/c3pp50170a>.
- [145] A. Hernández-Zanoletty, I. Oller, M.I. Polo-López, A. Blazquez-Moraleja, J. Flores, M. Luisa Marín, F. Boscá, S. Malato, Assessment of new immobilized photocatalysts based on Rose Bengal for water and wastewater disinfection, *Catal. Today*. 413–415 (2023) 113941. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.11.002>.
- [146] Drinking-water, (n.d.). <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (accessed March 9, 2023).
- [147] R. Dewil, D. Mantzavinos, I. Poullos, M.A. Rodrigo, New perspectives for Advanced Oxidation Processes., *J. Environ. Manage.* 195 (2017) 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.010>.
- [148] E. Koh, R. Fluhr, Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations, *Plant Signal. Behav.* 11 (2016) 1–5. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1192742>.
- [149] O. Legrini, E. Oliveros, A.M. Braun, Photochemical Processes for Water Treatment, *Chem. Rev.* 93 (1993) 671–698. <https://doi.org/10.1021/cr00018a003>.
- [150] W. Chen, J. Chen, L. Li, X. Wang, Q. Wei, R.A. Ghiladi, Q. Wang, Wool/Acrylic Blended Fabrics as Next-Generation Photodynamic Antimicrobial Materials, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 11 (2019) 29557–29568. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09625>.
- [151] I. Okamoto, H. Miyaji, S. Miyata, K. Shitomi, T. Sugaya, N. Ushijima, T. Akasaka, S. Enya, S. Saita, H. Kawasaki, Antibacterial and Antibiofilm Photodynamic Activities of Lysozyme-Au Nanoclusters/Rose Bengal Conjugates, *ACS Omega.* 6 (2021) 9279–9290. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00838>.
- [152] F. Vázquez-Ortega, I. Lagunes, Á. Trigos, Cosmetic dyes as potential

- photosensitizers of singlet oxygen generation, *Dye. Pigment.* 176 (2020) 108248. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108248>.
- [153] A. SOLEIMANIGORGANI, J. TAYLOR, Dyeing of nylon with reactive dyes. Part 1. The effect of changes in dye structure on the dyeing of nylon with reactive dyes, *Dye. Pigment.* 68 (2006) 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2005.01.014>.
- [154] Y. Zhang, W. Wang, X. He, A. Sang, Rose Bengal immobilized on wool as an efficiently “green” sensitizer for photooxygenation reactions, *Chem. Lett.* 41 (2012) 1500–1502. <https://doi.org/10.1246/cl.2012.1500>.
- [155] V. Cardoso, T. Rittmeyer, R.J. Correa, G.C. Brêda, R.V. Almeida, G. Simões, B.M. de França, P.N. de Azevedo, J.S. Bello Forero, Photoactive cotton fabric: Synthesis, characterization and antibacterial evaluation of anthraquinone-based dyes linked to cellulose, *Dye. Pigment.* 161 (2019) 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.09.029>.
- [156] J. Diaz-Angulo, J.A. Lara-Ramos, F. Machuca-Martínez, Dye photosensitization on heterogeneous photocatalysis process, fundamentals, and applications, Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823007-7.00002-x>.
- [157] and Z.G. Shiguo Chen, Shaojun Chen, Song Jiang, Meiling Xiong, Junxuan Luo, Jiaoning Tang, Environmentally Friendly Antibacterial Cotton Textiles Finished with Siloxane Sulfopropylbetaine, *Fiber Soc. Spring 2011 Conf.* 3 (2011) 263–264. <https://doi.org/10.1021/am101275d>.
- [158] W. Chen, W. Wang, X. Ge, Q. Wei, R.A. Ghiladi, Q. Wang, Photooxidation Properties of Photosensitizer/Direct Dye Patterned Polyester/Cotton Fabrics, *Fibers Polym.* 19 (2018) 1687–1693. <https://doi.org/10.1007/s12221-018-8068-4>.
- [159] P. Henke, H. Kozak, A. Artemenko, P. Kubát, J. Forstová, J. Mosinger, Superhydrophilic polystyrene nanofiber materials generating $O_2(1\Delta_g)$: Postprocessing surface modifications toward efficient antibacterial effect, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 13007–13014. <https://doi.org/10.1021/am502917w>.
- [160] J. Mosinger, O. Jirsák, P. Kubát, K. Lang, B. Mosinger, Bactericidal nanofabrics based on photoproduction of singlet oxygen, *J. Mater. Chem.* 17 (2006) 164–166.

<https://doi.org/10.1039/B614617A>.

- [161] M. Schäfer, C. Schmitz, R. Facius, G. Horneck, B. Milow, K.H. Funken, 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 (2000) 514–523. [isi:000086989700004](https://doi.org/10.1039/B614617A).
- [162] T. Maisch, J. Baier, B. Franz, M. Maier, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, W. Bäuml, The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 7223–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611328104>.
- [163] H.-S. Kim, E.J. Cha, H.-J. Kang, J.-H. Park, J. Lee, H.-D. Park, Antibacterial application of covalently immobilized photosensitizers on a surface., *Environ. Res.* 172 (2019) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.002>.
- [164] P. Tang, Z. Zhang, A.Y. El-Moghazy, N. Wisuthiphaet, N. Nitin, G. Sun, Daylight-Induced Antibacterial and Antiviral Cotton Cloth for Offensive Personal Protection, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 12 (2020) 49442–49451. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15540>.
- [165] K. Liu, Y. Liu, Y. Yao, H. Yuan, S. Wang, Z. Wang, X. Zhang, Supramolecular photosensitizers with enhanced antibacterial efficiency, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 8285–8289. <https://doi.org/10.1002/anie.201303387>.
- [166] F. Jin, S. Liao, Q. Wang, H. Shen, C. Jiang, J. Zhang, Q. Wei, R.A. Ghiladi, Dual-functionalized luminescent/photodynamic composite fabrics: Synergistic antibacterial activity for self-disinfecting textiles, *Appl. Surf. Sci.* 587 (2022) 152737. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.152737>.
- [167] T. Zhang, H. Yu, J. Li, H. Song, S. Wang, Z. Zhang, S. Chen, Green light-triggered antimicrobial cotton fabric for wastewater disinfection, *Mater. Today Phys.* 15 (2020) 100254. <https://doi.org/10.1016/j.mtphys.2020.100254>.
- [168] P. Tang, A.Y. El-Moghazy, B. Ji, N. Nitin, G. Sun, Unique “posture” of rose Bengal for fabricating personal protective equipment with enhanced daylight-induced biocidal efficiency, *Mater. Adv.* 2 (2021) 3569–3578. <https://doi.org/10.1039/d1ma00100k>.

- [169] B. Mu, Y. Yang, Complete separation of colorants from polymeric materials for cost-effective recycling of waste textiles, *Chem. Eng. J.* 427 (2022) 131570. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131570>.
- [170] S. Lacombe, T. Pigot, Materials for selective photo-oxygenation vs. photocatalysis: Preparation, properties and applications in environmental and health fields, *Catal. Sci. Technol.* 6 (2016) 1571–1592. <https://doi.org/10.1039/c5cy01929j>.
- [171] D. Staneva, S. Yordanova, E. Vasileva-Tonkova, S. Stoyanov, I. Grabchev, Photophysical and antibacterial activity of light-activated quaternary eosin Y, *Open Chem.* 17 (2019) 1244–1251. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0135>.
- [172] D.C. Neckers, Rose Bengal, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 47 (1989) 1–29. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)85002-6](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)85002-6).
- [173] C.R. Lambert, I.E. Kochevar, Electron Transfer Quenching of the Rose Bengal Triplet State, *Photochem. Photobiol.* 66 (1997) 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03133.x>.
- [174] A. Penzkofer, M. Simmel, D. Riedl, Room temperature phosphorescence lifetime and quantum yield of erythrosine B and rose bengal in aerobic alkaline aqueous solution, *J. Lumin.* 132 (2012) 1055–1062. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.12.030>.
- [175] J.C. Peterson, E. Arrieta, M. Ruggeri, J.D. Silgado, K.J. Mintz, E.H. Weisson, R.M. Leblanc, I. Kochevar, F. Manns, J.-M. Parel, Detection of singlet oxygen luminescence for experimental corneal rose bengal photodynamic antimicrobial therapy, *Biomed. Opt. Express.* 12 (2021) 272. <https://doi.org/10.1364/BOE.405601>.
- [176] E. Fuentes-Lemus, M. Mariotti, P. Hägglund, F. Leinisch, A. Fierro, E. Silva, C. López-Alarcón, M.J. Davies, Binding of rose bengal to lysozyme modulates photooxidation and cross-linking reactions involving tyrosine and tryptophan, *Free Radic. Biol. Med.* 143 (2019) 375–386. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.023>.
- [177] H. Choi, W. Lim, J.E. Kim, I. Kim, J. Jeong, Y. Ko, J. Song, S. You, D. Kim, M. Kim, B.K. Kim, O. Kim, Cell Death and Intracellular Distribution of

- Hematoporphyrin in a KB Cell Line, <https://Home.Liebertpub.Com/Pho>. 27 (2009) 453–460. <https://doi.org/10.1089/PHO.2008.2334>.
- [178] R. Cahan, R. Schwartz, Y. Langzam, Y. Nitzan, Light-activated Antibacterial Surfaces Comprise Photosensitizers, *Photochem. Photobiol.* 87 (2011) 1379–1386. <https://doi.org/10.1111/J.1751-1097.2011.00989.X>.
- [179] D. Gryglik, J.S. Miller, S. Ledakowicz, Solar energy utilization in degradation of 2-chlorophenol by immobilized, photo sensitizers, *Sol. Energy.* 77 (2004) 615–623. [isi:000225694200018](https://doi.org/10.1016/j.solener.2004.05.018).
- [180] S.M. El-Bashir, I.S. Yahia, M.A. Binhussain, M.S. AlSalhi, Designing of PVA/Rose Bengal long-pass optical window applications, *Results Phys.* 7 (2017) 1238–1244. [https://doi.org/10.1016/J.RINP.2017.03.033](https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.03.033).
- [181] M. Kubista, R. Sjöback, S. Eriksson, B. Albinsson, Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra, *Analyst.* 119 (1994) 417–419. <https://doi.org/10.1039/AN9941900417>.
- [182] D. Xu, D.C. Neckers, Aggregation of rose bengal molecules in solution, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 40 (1987) 361–370. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(87\)85013-X](https://doi.org/10.1016/1010-6030(87)85013-X).
- [183] B. Gür, K. Meral, The effect of poly(vinyl alcohol) on the photophysical properties of pyronin dyes in aqueous solution: A spectroscopic study, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 101 (2013) 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.09.098>.
- [184] H.H. Rao, Z.H. Xue, G.H. Zhao, S.Y. Li, X. Du, Fluorescence emission properties of rhodamine B encapsulated organic-inorganic hybrid mesoporous silica host, *J. Non. Cryst. Solids.* 450 (2016) 32–37. <https://doi.org/10.1016/J.JNONCRY SOL.2016.07.037>.
- [185] N. Kashef, Y.-Y. Huang, M.R. Hamblin, Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale, *Nanophotonics.* 6 (2017) 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- [186] A.C. Tedesco, F.L. Primo, P. da C.C. de Jesus, Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers, Elsevier Inc.,

2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52725-5.00002-2>.

- [187] N. Kömerik, M. Wilson, S. Poole, The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 676. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)072<0676:TEOPA0>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)072<0676:TEOPA0>2.0.CO;2).
- [188] J.A. Lacey, D. Phillips, The photosensitisation of *Escherichia coli* using disulphonated aluminium phthalocyanine, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 142 (2001) 145–150. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(01\)00508-1](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(01)00508-1).
- [189] A.T. Cooper, D.Y. Goswami, Evaluation of Methylene Blue and Rose Bengal for Dye Sensitized Solar Water Treatment, *J. Sol. Energy Eng.* 124 (2002) 305–310. <https://doi.org/10.1115/1.1498850>.
- [190] F. Nakonechny, M. Barel, A. David, S. Koretz, B. Litvak, E. Ragozin, A. Etinger, O. Livne, Y. Pinhasi, G. Gellerman, M. Nisnevitch, Dark Antibacterial Activity of Rose Bengal., *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 3196. <https://doi.org/10.3390/ijms20133196>.
- [191] T.A. Dahl, W.R. Midden, D.C. Neckers, Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria., *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 607–12. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02870.x>.
- [192] Y. Gurianov, M. Meistelman, Y. Albo, M. Nisnevitch, F. Nakonechny, Antibacterial Activity of Rose Bengal Entrapped in Organically Modified Silica Matrices., *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 3716. <https://doi.org/10.3390/ijms23073716>.
- [193] C.R. Lambert, I.E. Kochevar, Electron Transfer Quenching of the Rose Bengal Triplet State, *Photochem. Photobiol.* 66 (1997) 15–25. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1997.tb03133.x>.