



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

RADIACIÓN UVC: ¿GERMICIDA E INOCUA A LA VEZ?

Autor: Diego Caro García

Tutor/es: Pilar Iñiguez de la Torre Bayo

Índice general

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Interacción de la luz UV con la piel y los ojos	7
2.1. Estructura de la piel	7
2.2. Lesiones producidas por la radiación UV	9
2.3. Estructura ocular	11
2.4. Daños oculares debido a la luz UV	12
3. Emisión de UV-C mediante lámparas de excímeros	14
4. Análisis de los estudios sobre la luz UV-C 222 nm como germicida seguro	18
4.1. Estudios iniciales: 2013-2016	18
4.2. Luz 222 nm en patógenos comunes: 2017-2018	23
4.3. Estudios de otros grupos: 2018-2020	27
4.4. Epidemia de Sars-CoV-2: 2020-2021	34
4.5. Estudios oculares	45
5. Uso práctico de la esterilización UV	52
6. Conclusiones	56
Índice de figuras	58
Bibliografía	61

Resumen

En el presente trabajo se realiza un estudio del uso de longitudes de onda cercanas a 200 nanómetros como germicida no dañino. Esta zona del espectro electromagnético, denominada UV-C lejano, es objeto de estudio debido a su capacidad de inactivación de organismos patógenos, de la misma forma que el resto del espectro UV-C, pero con la característica de no ser dañino para el ser humano.

En el capítulo 1 se realiza una breve introducción de la radiación, desde su descubrimiento hasta la parte del espectro de interés. En el capítulo 2 se exponen los conceptos biológicos necesarios para el entendimiento de los experimentos. En el capítulo 3 se explica brevemente la física de las fuentes que emiten en estas longitudes de onda. En el capítulo 4, se recopila y analiza en detalle los estudios, de carácter experimental, de las últimas décadas. Finalmente, en el capítulo 5 se propone un método de instalación y puesta en práctica de estas fuentes fuera de entornos habituales de investigación.

Abstract

In this work, the use of wavelengths close to 200 nanometers as innocuous germicide was studied. This part of the spectrum called far UV-C is currently under study due to its capability to successfully inactivate pathogenic organisms just as the rest of the UV-C spectrum while being harmless to the human beings.

Chapter 1 is dedicated to a brief introduction to the radiation, from its discovery to the part of the spectrum of interest. Chapter 2 focuses on the biological concepts that are required in order to understand the experiments. Chapter 3 is dedicated to briefly explain the physics to obtain the lamps that emit at those wavelengths. Chapter 4 collects and analyses in detail the main experimental studies during the last few decades. Finally, Chapter 5 discusses a method to install the UV technology outside of laboratories.

Capítulo 1

Introducción

Desde su descubrimiento en 1801 por Johann Wilhelm Ritter, la radiación ultra violeta, inicialmente conocida como rayos químicos debido a su alta reactividad química, ha sido objeto de estudio. La luz UV se clasifica en UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm), UV-C (200-280 nm) y UV de vacío (10-200 nm), cuyas características y aplicaciones varían notablemente. La radiación UV-A y UV-B son ampliamente conocidas debido a su relación con el Sol; aproximadamente el 10 % del espectro de radiación del Sol es radiación UV, del cual el 77 % es bloqueada por la atmósfera terrestre. El 96 % de la radiación que logra alcanzar la superficie es UV-A, mientras que el 4 % restante es UV-B, relacionada con el bronceado y los daños provocados en la piel.

Pese a que el 0,5 % del espectro del sol es UV-C, esta no alcanza la superficie de la tierra debido a la composición de la atmósfera. Los fotones de menor longitud de onda son absorbidos por las diversas capas. Las longitudes menores de 100 nanómetros tiene una baja capacidad de penetración, siendo opacos al agua y absorbidas por los gases del aire, recibiendo el nombre de ultra violeta de vacío [1]. La radiación de longitudes mayores tiene la capacidad de penetrar el nitrógeno, llegando a la ozonósfera, donde es absorbida en el ciclo de ozono: Las moléculas de oxígeno reaccionan con fotones cuya longitud de onda es menor a 242 nm, disociándose en átomos que posteriormente se asocian con otras moléculas de oxígeno, formando ozono. Estas moléculas reaccionarán con otras longitudes de onda mayores (240-310 nm) u otros átomos de oxígeno, obteniéndose moléculas de oxígeno, completándose un ciclo en el que se bloquea la radiación UV-C.

Pese a que de forma natural la luz UV-C no llega a la superficie de la Tierra, este intervalo de longitud de onda se produce artificialmente para diversas aplicaciones relacionadas con esterilización, debido a la capacidad de inactivación de microorganismos. Los estudios indican que entre longitudes entre 200 y 280 nanómetros, la radiación es capaz de atravesar medios acuosos y gaseosos sin ser absorbida por el medio [1]. El efecto dañino sobre el microorganismo se debe a la interacción entre la radiación y el ADN o ARN de este [2].

Tradicionalmente se han utilizado lámparas de mercurio a baja presión como germicidas. El pico de emisión (254 nm) es próximo al pico de absorción de los ácidos nucleicos, entre 260 y 265 nm (Figura 1.1) [3]. Esto da a lugar a una inactivación eficaz de microorganismos, con el inconveniente de dañar igualmente células de los seres vivos cercanos, convirtiéndose en un riesgo para la salud.

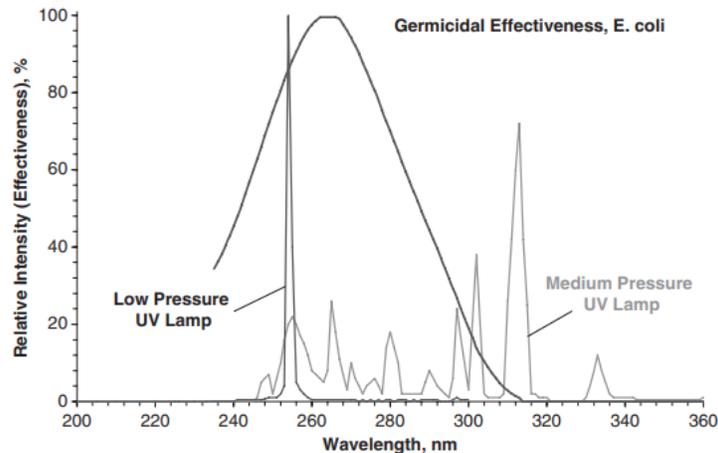


Figura 1.1: Eficacia germicida de las longitudes de onda en el UV, relacionada con el daño en el ADN.

En este trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica de investigaciones relacionadas con longitudes de onda entre 200 y 230 nanómetros, conocido como UV-C lejano, como potencial alternativa a la longitud de onda 254 nm. Puesto que las radiaciones usadas tradicionalmente son dañinas para los seres humanos, su uso se reduce a la esterilización de instrumental y espacios vacíos. La medida de protección principal frente a patógenos se basa en la producción masiva de antibióticos y vacunas, método que progresivamente ha ido perdiendo eficacia debido a la aparición de bacterias resistentes a los medicamentos. Por otra parte, las infecciones quirúrgicas siguen presentando un problema en los hospitales, y la globalización ha resultado en una mayor probabilidad de pandemias. Es por ello que la radiación UV-C lejana puede ser una alternativa en potencia, ya que permitiría una esterilización de los espacios e instrumentos sin la necesidad de aislar la zona, reduciendo la transmisión entre las personas que compartan dichos espacios.

El estudio se centra principalmente en el trabajo del grupo de investigación de David. J Brenner, director del Centro de Investigación Radiológica en la Universidad de Columbia, pionero de la investigación [4–9]. También se analizan trabajos posteriores de otros grupos [10–17].

Capítulo 2

Interacción de la luz UV con la piel y los ojos

2.1. Estructura de la piel

La piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La capa de interés para este estudio es la epidermis, la cual es la más externa y penetrada por la radiación UV. Esta capa está compuesta mayoritariamente por queratinocitos, células cilíndricas que producen queratina con el fin de proteger e impermeabilizar la piel. Se divide en diversas subcapas, como se muestra en la figura 2.1:

1. Estrato córneo: Es la capa con más hileras, de células planas y muertas, donde el núcleo se ha degenerado completamente y se desescaman continuamente. El espesor depende de la zona de la piel (10-30 μm).
2. Estrato lúcido: Es una zona de transición de células planas y muertas. Solo se encuentra en las partes más gruesas del cuerpos.
3. Estrato granuloso: Las hileras que lo componen tiene células aplanadas que han comenzado a perder el núcleo, debido a la granulación interna de queratina.
4. Estrato espinoso: Está formada por numerosas hileras de células unidas que se comienzan a unir mediante desmosomas.
5. Estrato basal: Contiene las células precursoras que se multiplican por mitosis, emigrando hacia arriba y sustituyendo al resto de células. Contiene melanocitos, que protegen de la radiación UV.

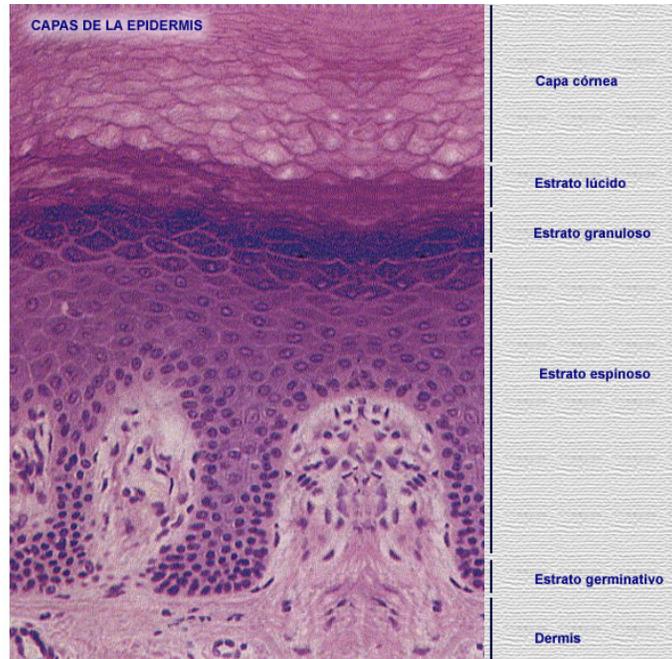


Figura 2.1: Estructura de la epidermis.

En el proceso de emigración a la superficie, los queratinocitos se van aplastando, perdiendo el núcleo y produciendo queratina. En este ciclo continuo, la capa más interna renueva el resto de las capas, siendo las últimas compuestas por células ya muertas con única función protectora. Debido a este mecanismo, los diversos daños en la epidermis son reparables mientras no sea dañado el estrato basal. Un mal funcionamiento puede provocar cáncer.

Los tipos de piel se clasifican según la capacidad de asimilación de la radiación debida a la melanina. Se categorizan en la escala Fitzpatrick desde tipo I a tipo VI, siendo el tipo I el que tiene menor capacidad de resistencia a esta, y tipo VI el que mayor.

2.2. Lesiones producidas por la radiación UV

El principal efecto de la radiación UV en los seres vivos es la aparición de daño en el ADN. La radiación UV-A tiene una mayor capacidad de penetración, alcanzando la dermis, produciendo reacciones químicas que pueden dañar indirectamente el ADN [18]. En contraste, la luz UV-B y UV-C penetran únicamente la epidermis, aunque con la energía capaz de producir una unión mediante enlaces covalentes entre bases pertenecientes a la misma cadena, normalmente citosina y timina, alterando la estructura. En función del enlace covalente, se diferencian dos tipos, el dímero de pirimidina ciclobutano (CPD), y el foto producto 6-4 (6-4 PP), mostrados en la figura 2.2. Son ampliamente utilizadas en la detección de daños en este espectro de longitudes de onda [19].

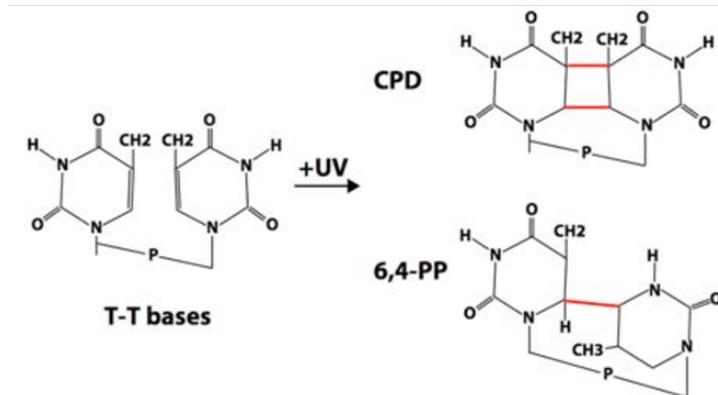


Figura 2.2: Formación de CPDs y 6-4 PP entre dos pirimidinas timinas. 6-4 PP une la cuarta y sexta posiciones, provocando una distorsión mayor.

Los organismos tienen mecanismos de reparación de daño, siendo la fotorreactivación el más eficaz [20]. En ausencia de radiación, la enzima reparadora fotoliasa se adhiere al dímero. Al absorber un fotón con una longitud de onda en el intervalo 300-500 nm, dona un electrón, reorganizándose atómicamente el sistema, y eliminando los enlaces entre bases. Es por ello que las dosis de radiación deben ser suficientemente altas para evitar una posible reparación. Sin embargo, esta enzima no se encuentra en el ser humano, por lo que la reparación se debe a un proceso menos eficaz nombrado Re-

paración por Escisión de Nucleótidos, donde diversas proteínas participan en el reconocimiento, verificación, escisión y sustitución de la zona dañada. En consecuencia, la reparación de daño por radiación ultravioleta en seres humanos es notablemente más lenta que en otros organismos.

El estudio de la absorción de la radiación UV en diversas moléculas biológicas tiene una larga trayectoria. Los estudios sugieren una mayor absorción de la radiación por proteínas y enlaces peptídicos cerca de los 200 nanómetros [21–25] (Figura 2.3).

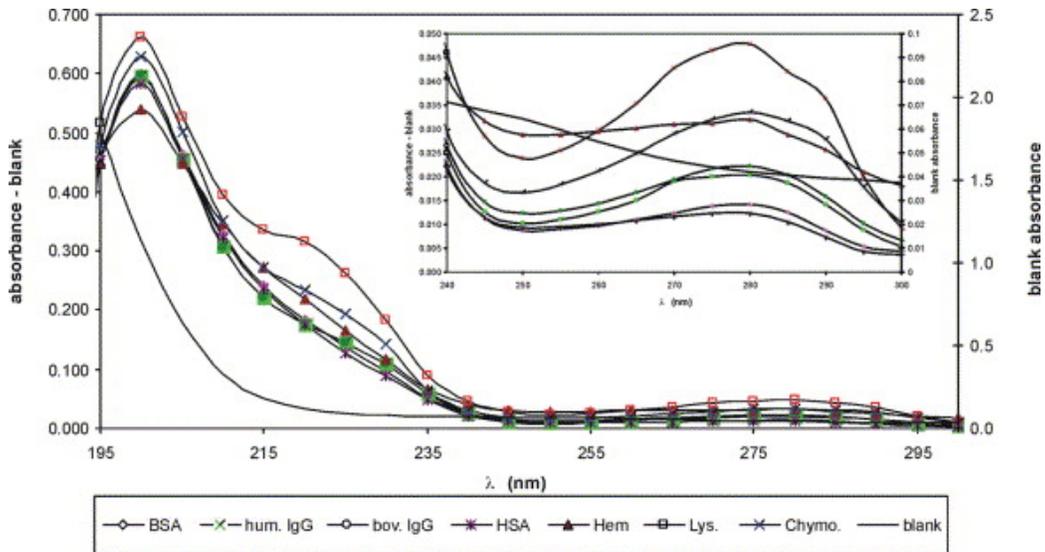


Figura 2.3: Espectro de absorción de la luz UV para distintas proteínas [25]. Hay una mayor influencia en longitudes menores a 205 nm. Se observa un pico en el intervalo 190-200 nanómetros.

Las proteínas y algunos enlaces peptídicos absorben radiación en longitudes de onda menores a 240 nm, con un pico entorno a 200 nm, mientras que el ADN tiene un pico de absorción en 260 nm [2, 3]. Con estos conocimientos, se han desarrollado métodos de inactivación de diversas bacterias utilizando luz UV-C.

2.3. Estructura ocular

El ojo es un órgano complejo debido al gran número de estructuras que contiene. La estructura más externa es la córnea, carente de vasos sanguíneos. Está formada por 5 capas (Figura 2.4):

1. Epitelio corneal: formada por 5-6 filas de células que se renuevan de forma similar a la epidermis, eliminándose al pestañear.
2. Membrana de Bowman: tiene un grosor de 8-14 μm . Mantiene la integridad de la córnea y no tiene capacidad regenerativa. Formada por colágeno.
3. Estroma corneal: Tiene un grosor de aproximadamente 500 μm , formado por colágeno el cual está compuesto de queratinocitos.
4. Membrana de Descemet: Tiene un grosor de 8-10 μm , formado por colágenos de distintos tipos de que el resto de estructuras.
5. Endotelio corneal: Contiene una única capa de células de entre 10 - 20 μm incapaces de regenerarse por mitosis. Tiene una función deshidratadora, esencial para el correcto funcionamiento.

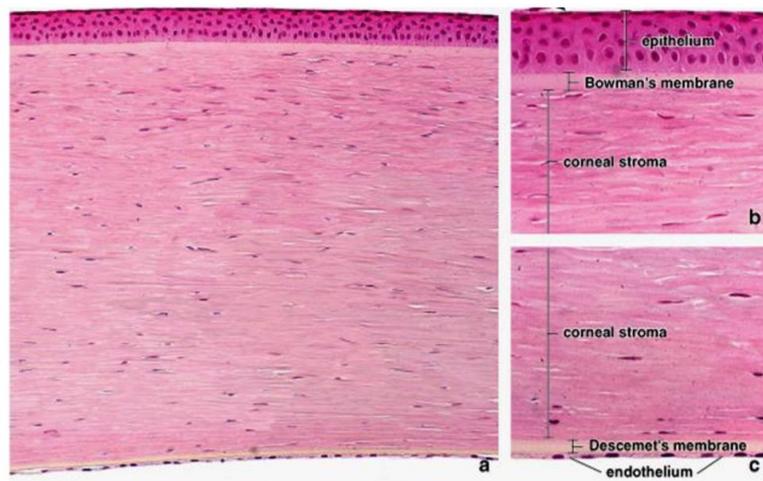


Figura 2.4: Estructura de la córnea.

El tamaño total de la córnea varía según la persona y la zona. En la parte central es aproximadamente $520 \mu m$. La córnea está unida a la esclerótica, recubriendo a todo el ojo, protegiéndole y dándole forma. A su vez, está cubierta por la conjuntiva. Sobre esta existe una película lagrimal compuesta de diversas moléculas, entre ellas proteínas. Tiene un espesor medio aproximado de $5 \mu m$, muy variable disminuyendo cuando el ojo está abierto, y se renueva con el pestañeo [26]. Según el estudio [27], el 87% de la radiación UV es transmitida para longitud 220 nm, aumentando la transmisión al aumentar la longitud de onda, por lo que, pese a reducir la transmisión, la radiación UV sigue alcanzando el ojo.

Tras la córnea se encuentra el iris, que presenta un orificio en la parte central, la pupila, lo que permite el paso de la luz. Tras este, se encuentra el cristalino, una lente formada por fibras de colágeno. Finalmente, se encuentra la retina.

2.4. Daños oculares debido a la luz UV

Debido a su complejidad, existe una gran variedad de enfermedades en los ojos relacionadas con la radiación UV, siendo necesario incluir el efecto de la córnea [28, 29]. La fotoqueratitis es el daño en la células epiteliales de la cornea debido a la radiación UV, pudiendo provocar exfoliación. La Queratopatía climática en gotas es la acumulación de material translúcido en la superficie del estroma corneal debido a reacciones fotoquímicas de las proteínas con la radiación UV. Pterigión es el desplazamiento local del epitelio debido a células epiteliales anormales, asociado a la radiación UV.

Al igual que en la piel, la radiación UV-B y UV-C induce cambios genéticos mediante la producción de CPDs y fotoproductos 6-4 al absorberse la radiación en las bases del ADN. En [30], se estudió esta formación en función de la longitud de onda, usando ojos humanos donados (*ex vivo*). Estos fueron expuestos a luz UV-A 365 nm, UV-B 300 nm y UV-C 254 nm, con exposiciones tales que la generación de CPDs fuera del mismo orden de magnitud. Según los resultados, la luz UV-C solo induce CPDs en las primeras capas del epitelio corneal, mientras que la luz UV-B penetra más intensamente,

teniendo mayor presencia en el estroma. En comparación, la luz UV-A tiene un ligero descenso en la producción de CPDs en el estroma, pero es capaz de atravesar la córnea, llegando al iris, y siendo absorbida en las primeras capas de esta.

Los autores no encontraron daños en el endotelio debido a luz UV-B o UV-C. También afirman no haber encontrado correlación entre mayores dosis con presencia de daño en el ADN en estructuras oculares interiores. Sin embargo, estos resultados provienen de ojos *ex vivo*, carentes de capa lacrimal, y de personas de entre 55 y 89 años, con menor capacidad de absorción de luz UV-B. Esta diferencia implica que los resultados podrían ser distintos para la persona.

Capítulo 3

Emisión de UV-C mediante lámparas de excímeros

Con el fin de obtener emisiones de longitudes de onda en esta parte del espectro, se recurre a la emisión espontánea en la disociación de excímeros. Un excímero es un dímero formado por un alcalino y un gas noble en estado excitado que al decaer, se disocia, emitiendo un fotón con una longitud de onda característica. Estas transiciones espontáneas se utilizan para fabricar lámparas de excímeros, donde se forma un plasma por procesos de descarga. En este plasma se encuentran iones, átomos excitados y moléculas del gas noble formados en los siguientes procesos [31]:



Por otra parte, las moléculas de cloro se disocian, obteniéndose átomos e iones de este:



A través de canales complejos, se produce el excímero $KrCl^*$, cuyo tiempo de vida es de nanosegundos [31].

En los diversos estados excitados de un excímero, el potencial de interacción entre ambos átomos tiene un mínimo en función de la distancia internuclear. En contraste, en los estados fundamentales el mínimo es insignificante o inexistente, provocando la disociación de la molécula. En esta disociación se emite, de forma espontánea, un fotón con una frecuencia característica de la molécula (Figura 3.1):

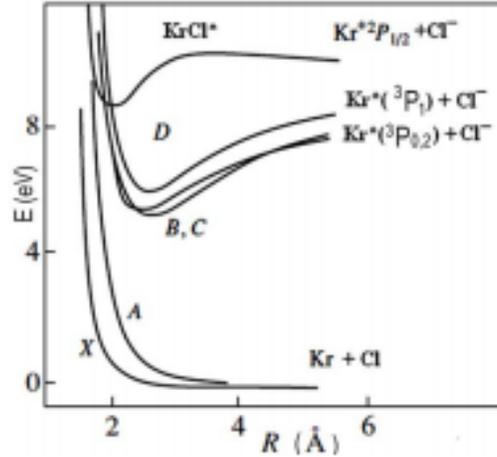
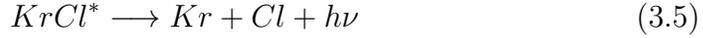


Figura 3.1: Diagrama de energía de la formación del excímero $KrCl^*$. Los estados A y X son fundamentales mientras que los B,C y D son excitados.

Las longitudes de onda para los diversos excímeros se muestran en la figura 3.2 [32]. Las emisiones de interés para esta investigación se obtienen al asociar el gas noble Kriptón con halógenos Bromo (207 nm) o Cloro (222 nm). Debido a la existencia de diversos estados excitados, y otras posibles asociaciones en el plasma, se encuentran picos de menor intensidad. El valor entre paréntesis en la transición principal indica la eficiencia máxima teórica.

Finalmente, se requiere un estudio de la producción de ozono debido a lámparas UV-C. La generación de ozono se debe a la absorción de radiación UV por el oxígeno, dependiente de la longitud de onda, teniendo mayor eficacia en la proximidad de 160 nanómetros. El ozono tiene un pico de absorción en la proximidad de 254 nm, por lo que las lámparas de mercurio convencionales no son una fuente de ozono si están correctamente filtradas, eliminando el pico secundario de 184 nm [33]. En contraste, las lámpara de excímeros Kr-Cl emite principalmente 222 nanómetros. En [33], se afirma que esta longitud produce concentraciones despreciables de ozono. Sin embargo, existe una pequeña cantidad de radiación menor a 200 nanómetros que puede generar ozono (Figura 3.3).

Rare gas atom (R)	Halogen atom (X)	Different transition wavelength of RX^* molecule (nm)			
		$D_{1/2} \rightarrow X_{1/2}$	$B_{1/2} \rightarrow X_{1/2}$	$C_{3/2} \rightarrow A_{3/2}$	$D_{1/2} \rightarrow A_{1/2}$
Ne	F	106	108 (0.43)	110	111
Ar	F	185	193 (0.35)	203	204
Ar	Cl		175 (0.48)		195
Ar	Br		165	172	183
Kr	F	220	248 (0.28)	275	272
Kr	Cl	200	222 (0.31)	240	235
Kr	Br		207 (0.33)	222	228
Kr	I		190 (0.37)	195	225
Xe	F	264	351 (0.24)	460	410
Xe	Cl	236	308 (0.27)	345	340
Xe	Br	221	282 (0.29)	300	325
Xe	I	203	253 (0.37)	265	320

Figura 3.2: Longitudes de las transiciones radiactivas en distintos excímeros.

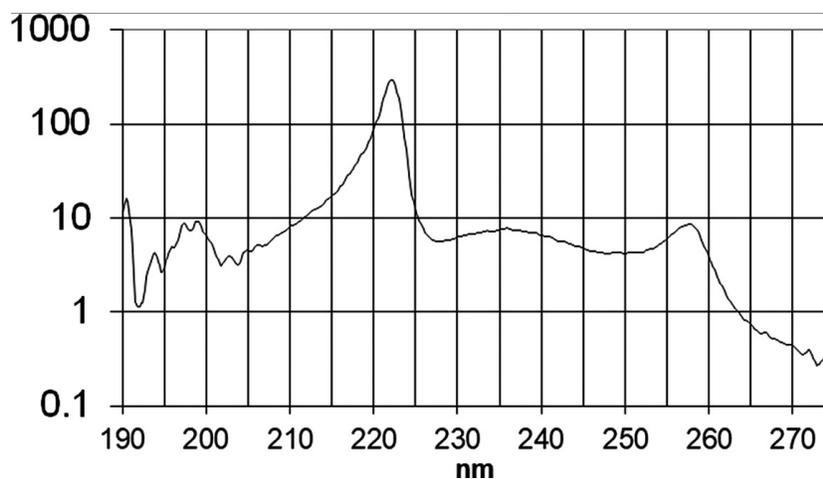


Figura 3.3: Espectro de emisión de una lámpara de excímeros Kr-Cl sin filtrado.

Por otra parte, en la fabricación de la lámpara de descarga, un gap entre el electrodo y el cristal puede dar lugar a una descarga eléctrica que genere ozono, proporcional al voltaje, fuera de la lámpara. Una alternativa para reducir esta producción es la colocación de los electrodos directamente en el cristal.

En [33], el autor realizó varios cálculos teóricos de la concentración de ozono. Suponiendo por seguridad, despreciable la reducción del ozono por procesos naturales (1-3 días), el modelo USHIO Care222 compuesto por 4 lámparas de 12 W produciría 0.0045 ppm diarios en una habitación de $30 m^3$, muy por debajo del valor límite 0,05 ppm (Ver referencia en [33]) . Si la lámpara fuese de 300 W, la concentración aumentaría a 0.5 ppm. Para reducir la generación de ozono, el autor sugirió el uso de filtros ópticos que reduzcan la emisión de longitudes de onda menores a 200 nm, o el uso de filtros de ozono, a costa de disminuir el flujo de aire.

Capítulo 4

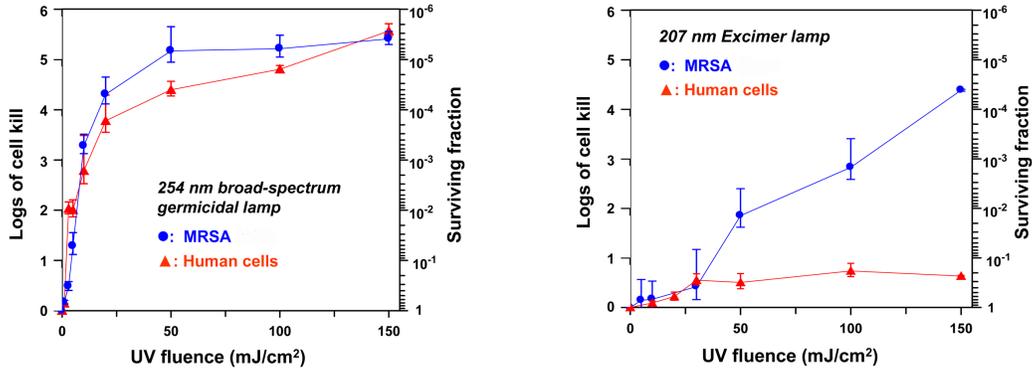
Análisis de los estudios sobre la luz UV-C 222 nm como germicida seguro

4.1. Estudios iniciales: 2013-2016

Este estudio de la luz UV-C como posible germicida inocuo comienza con en la investigación de Buonanno et al en 2013. En este primer trabajo [4], los autores propusieron el uso de luz UV de longitud de onda 207 nm con el fin de obtener una luz UV segura y aplicable durante las operaciones, previniendo infecciones de heridas quirúrgicas. Los autores no realizaron un estudio del daño ocular, puesto que estaba enfocado a un uso quirúrgico, suponiendo los ojos del paciente debidamente protegidos.

En el experimento se utilizó una lámpara de excímeros Kr-Br equipada con un filtro pasa banda, eliminando otras longitudes de onda no deseadas. El estudio se realizó sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), bacterias en las que según estudios previos, se había demostrado que su inactivación por UV no depende del cociente entre la tasa de fluencia y el tiempo de irradiación, para irradiancias entre 0.02 y 2 mW/cm^2 (Referencia en [4]).

Se prepararon 3 muestras que fueron irradiadas distintos intervalos de tiempo, según la exposición requerida. De forma similar, 3 muestras de fibroblastos cutáneos humanas fueron irradiadas. Con el fin de comparar esta radiación con la tradicionalmente utilizada, Se realizaron los mismos experimentos con una lampara de mercurio a baja presión convencional, cuya emisión principal es 254 nm.



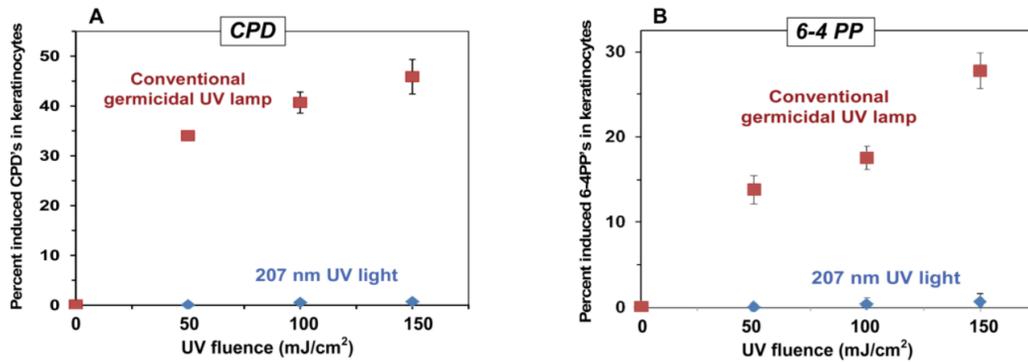
(a) Longitud de onda 254 nm. Irradiancia de 0.45 mW/cm^2 .

(b) Longitud de onda 207 nm. Irradiancia 0.044 mW/cm^2 .

Figura 4.1: Muerte celular de SARM y células humanas inducida por radiación UV.

Las figuras cedidas por la autora del trabajo, muestran la efectividad en la destrucción de células, en función de la fluencia de la radiación. En la figura 4.1a se observa que la emisión de 254 nanómetros eliminó a las bacterias y a las células humanas por igual, mientras que la luz de 207 nm produjo daños significativamente menores en las células humanas (figura 4.1b). Para que las bacterias tuvieran una fracción de supervivencia de 10^{-4} , se requirió fluencias de 35 mJ/cm^2 para 254 nm y 135 mJ/cm^2 para 207 nm, dando lugar a fracciones de eliminación de las células humanas de 2×10^{-4} y 2×10^{-1} respectivamente. Este primer experimento apoya la hipótesis inicial de que una luz de longitud ultravioleta 207 nm, ubicada en el el rango del UV-C, ampliamente conocido por el riesgo para la salud que supone, es significativamente menos perjudicial en las células humanas, debido a la incapacidad de penetración de células de mayor tamaño.

Para observar el posible daño en la piel humana, se utilizó un modelo 3D de la piel compuesto detalladamente por las partes de la epidermis. Se analizó la aparición de CPDs y 6-4 PP, inducidos por la radiación UV. Usando procesos inmunohistoquímicos estándar, se obtuvieron los resultados mostrados en las figuras 4.2. Los autores no encontraron células afectadas tras ser irradiadas con luz 207 nm, mientras que la absorción de 254 nm produjo ambos dímeros.



(a) CPDs inducidos en los queratinocitos epidérmicos.

(b) 6-4 PP inducidos en los queratinocitos epidérmicos.

Figura 4.2: Inducción de dímeros por ambas fuentes de luz UV-C.

En continuación con el estudio anterior, en [5] se expusieron ratones sin pelo, puesto que la acción del espectro UV-C tiene los mismos cambios físicos e histológicos que en la piel humana. Se expusieron a tres grupos de ratones a las mismas longitudes de onda, con diferentes condiciones. El primer grupo fue expuesto a luz 207 nm, mientras que el segundo fue expuesto a luz de la lámpara convencional, con un pico en 254 nm. y el tercero fue expuesto a una luz sin UV, como falsa exposición. Los periodos de pruebas tuvieron una duración de 7 horas, obteniéndose una exposición radiante de 157 mJ/cm^2 . Tras un periodo de 48 horas de reposo, se estudiaron los efectos de la radiación por diversos métodos.

Se analizó en un microscopio aumento del grosor de la epidermis mediante tinción hematoxilina-eosina (H & E). Este aumento está asociado a la proliferación del antígeno Ki-67, proteína marcadora del crecimiento celular, cuya proliferación se detectó la proliferación con un análisis inmunohistoquímico. Con su correspondiente análisis, se detectaron lesiones pre-mutagénicas en el ADN asociadas al UV, mediante la detección de CPDs y 6-4 PPs. También se estudió la inflamación del tejido de la piel debido al aumento del número de mastocitos dérmicos al exponerse al UV, y la diferenciación del tejido cutáneo regulado por los niveles de queratina.

En todos los resultados, los efectos aparecen notablemente en los ratones sometidos a la lámpara germicida convencional, mientras que los afectados por la luz de 207 nm de la lámpara de excímeros apenas varían en comparación con la falsa exposición.

Paralelamente, Woods et al [10] estudiaron el efecto de la exposición a radiación UV-C producido por un equipo de esterilización en voluntarios, con el objetivo de encontrar una alternativa al uso excesivo de antisépticos en la piel. En el experimento se expuso a sujetos con pieles tipo I y tipo II en la escala Fitzpatrick ($n_I = 2$), ($n_{II} = 2$), a fluencias progresivas hasta 508 mJ/cm^2 . Las exposiciones se realizaron en la parte superior de la espalda, observando la aparición de eritemas cutáneos 1, 12 y 24 horas después de la irradiación, con el fin de determinar la dosis mínima para la aparición de eritemas (MED). Posteriormente se realizó una biopsia de diferentes secciones de la piel, irradiadas por UV-C, por una dosis 2x MED de UV-B como exposición positiva, y no irradiadas como exposición negativa. Estas muestras se analizaron para encontrar anticuerpos debidos a la presencia de CPDs.

La calibración del aparato se muestra en la figura 4.3. Se observa un espectro de emisión con picos menores en 234 y 257 nm, siendo el pico principal 222 nm. El 88 % de la emisión UV-C se encuentra en la banda de longitud 222 nm. El 97 % de la emisión se encuentra en longitudes menores a 250 nm.

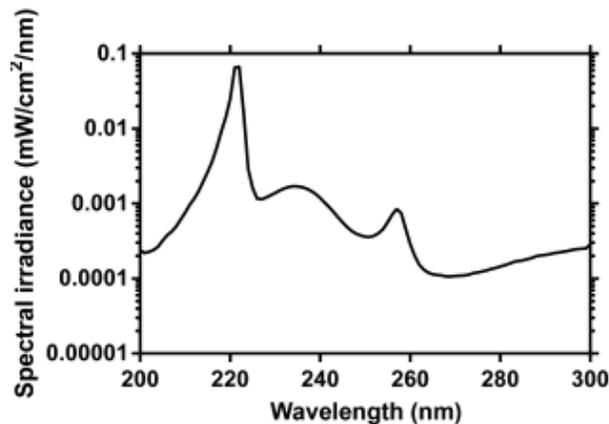


Figura 4.3: Espectro de emisión en escala logarítmica. Irradiancia de 6.4 mW/cm^2 .

En el estudio directo en sujetos, se determinó la dosis necesaria para llegar al nivel de MED mediante el uso de luz UV-C, entre 40 y 50 mJ/cm^2 . Según los autores, este nivel es 10 veces menor de lo esperado, y menor a la dosis necesaria para destruir patógenos comunes, 300 mJ/cm^2 .

Realizados los estudios histopatológicos, los autores afirman no haber encontrado células apoptóticas para ninguna de las radiaciones, no mostrando el resultado por tinción H & E. Sin embargo, mientras que en las muestras expuestas a UV-B aparecieron CPDs a lo largo de toda la epidermis, incluyendo estrato basal, en las muestras afectadas por UV-C, varió entre los dos tipos de piel. En el primer sujeto, solo se encontró un pequeño número de queratinocitos afectados en la parte superior de la epidermis, mientras que en el segundo, cuya epidermis es mas tenue, se encontraron manchas en las capas interiores. Los resultados indicaron que, dependiendo del grosor de la epidermis, el efecto fue más o menos notorio, aunque siempre menor al UV-B.

Como explicación de los daños, los autores sugirieron que, pese a que el 88 % de la luz fuese de 222 nm, las pequeñas emisiones de longitudes mayores son suficientes para producir CPDs en capas profundas, aunque en menor cantidad que el UV-B. Los estudios fueron realizados con piel de la parte superior de la espalda, así que se espera un aún mayor efecto en otras partes del cuerpo.

4.2. Luz 222 nm en patógenos comunes: 2017-2018

En continuación con sus estudios, Buonanno et al. [6] sustituyeron la lámpara de excímeros Kr-Br por una lámpara de excímeros Kr-Cl equipada con un filtro pasabanda que eliminó las emisiones secundarias, obteniéndose luz de emisión principal 222 nm. Repitiendo los experimentos de [4, 5], se comparó el daño celular debido a las exposiciones a 222 nm y 254 nm en SARM. Se investigó la aparición de CPDs en el modelo de piel humano, y los parámetros previos para las ratas. Para ello, se colocaron las lámparas a distancias tal que se obtuviera una densidad de $0,036 \text{ mW/cm}^2$ sobre las muestras de SARM y modelos de tejidos 3D. Para los ratones, la exposición fue la misma que en el caso anterior, 157 mJ/cm^2 , obtenida en un periodo de 7 horas.

Los resultados son similares a los obtenidos con la luz 207 nm. Mientras que la emisión del germicida convencional daña tanto a las bacterias como a la piel humana y a los ratones, las longitudes de onda de 207 y 222 nm no producen daños sobre los ratones, pero siguen siendo igual de eficientes contra la bacteria. En la figura 4.4 se muestra la igual eficacia en la eliminación de la longitud 222 nm en comparación con la eficacia del germicida convencional 254 nm, obtenido previamente en [4].

Al igual que con la luz 207 nm, no se encontraron diferencias en las diferentes pruebas en los ratones, entre la luz 222 nm y la falsa exposición (sham). En la figura 4.5 se muestra la inducción de dímeros en la epidermis de los ratones. Las células teñidas indican la aparición de estos. Se observa una inducción en los ratones expuestos a la lámpara convencional, mientras que los expuestos a la radiación 222 nm no muestran efectos significativos con respecto a la falsa exposición.

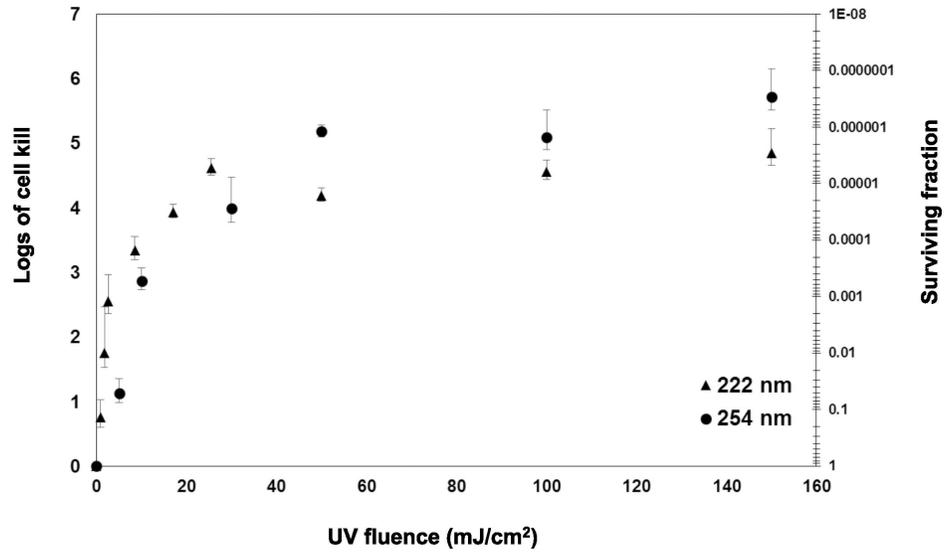


Figura 4.4: Eliminación del SARM expresado como fracción de supervivencia, en función de la fluencia, para luz 222 nm y 254 nm.

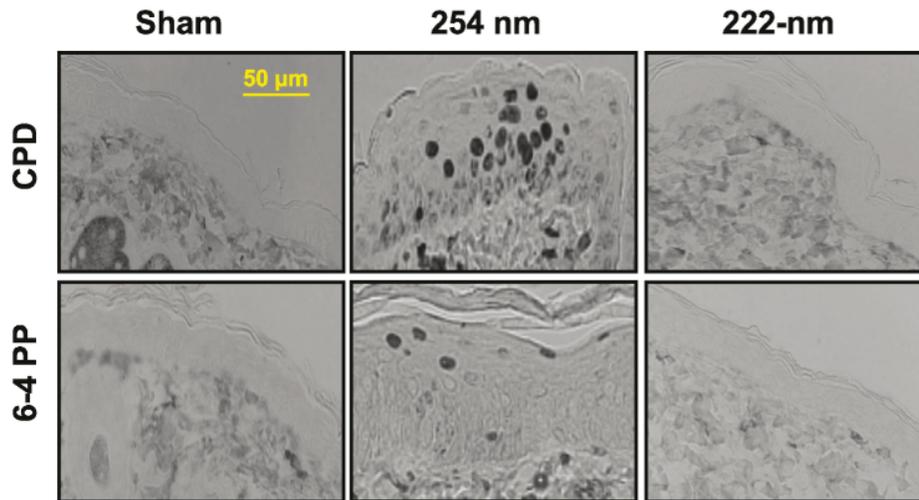


Figura 4.5: Lesiones de ADN en la piel del dorso de los ratones.

En los trabajos previos, las irradiaciones se realizaron en bacterias que se encuentran en superficies o en suspensión. Es por ello que, en [7], Buonanno et al. investigaron la eficacia de la luz UV-C lejana para inactivar virus transmitidos por aerosoles. Para ello se utilizó una cámara de irradiación donde se generó virus H1N1 aerosol. Se colocaron las lámparas Kr-Cl en las ventanas, y se realizaron medidas con distintas exposiciones. Las muestras se recogieron y observaron en microscopio fluorescente. Para visualizarlo se usó el marcador fluorescente DAPI, el cual se une a las zonas enriquecidas en timina y adimina, indicando las propias células, mientras que, para indicar las células infectadas, se usó Alexa fluor, indicante de la presencia de anticuerpos contra la influenza A.

En la figura 4.6, se muestra la eficacia antiviral a exposiciones de luz 222 nm de 0.8, 1.3 y 2 mJ/cm^2 . Ante la falta de exposición, las células son efectivamente infectadas por el virus. Para una fluencia menor a 2 mJ/cm^2 , el virus fue eliminado.

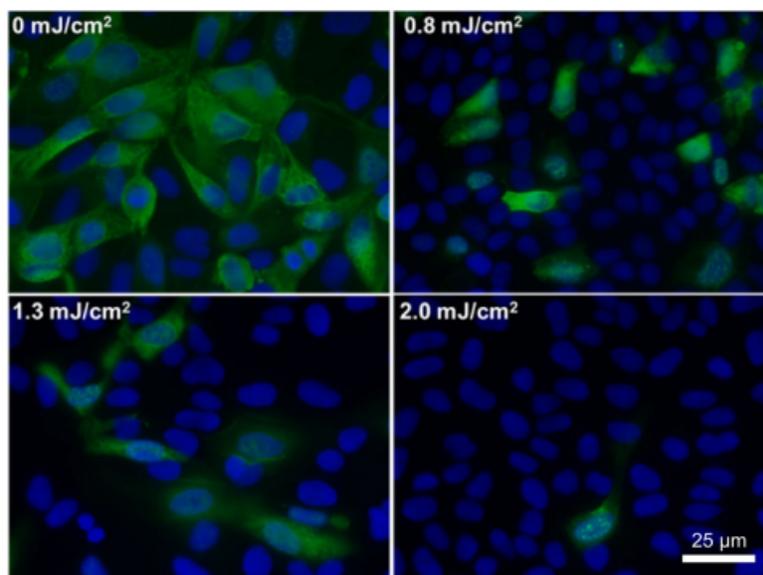


Figura 4.6: Imagen fluorescente de células epiteliales infectadas con H1N1. En azul, mancha nuclear DAPI; en verde, Alexa Fluor-488.

Los autores comprobaron la fracción de supervivencia del virus en función de la exposición de luz, visualizada en la figura 4.7. La fracción de supervivencia se calcula como $S = (FFU_{UV}/FFU_{control})$, donde FFU_{UV} es la fracción de células positivas en H1N1 tras exposición a radiación UV y $FFU_{control}$ es la fracción de células tras exposición falsa. Se muestra el correcto ajuste al modelo exponencial de desinfección UV, $\ln(S) = k * D$ con constante de inactivación $k = 1.8 \text{ mJ/cm}^2$, indicando que la luz UV-C con longitud de onda 222 nm funciona como germicida contra virus transmitidos por aerosol. En concreto, con una dosis constante de 1.8 mJ/cm^2 durante 20 segundos que tarda en cruzar el aerosol la cámara, se inactivaría el 95 % de los virus.

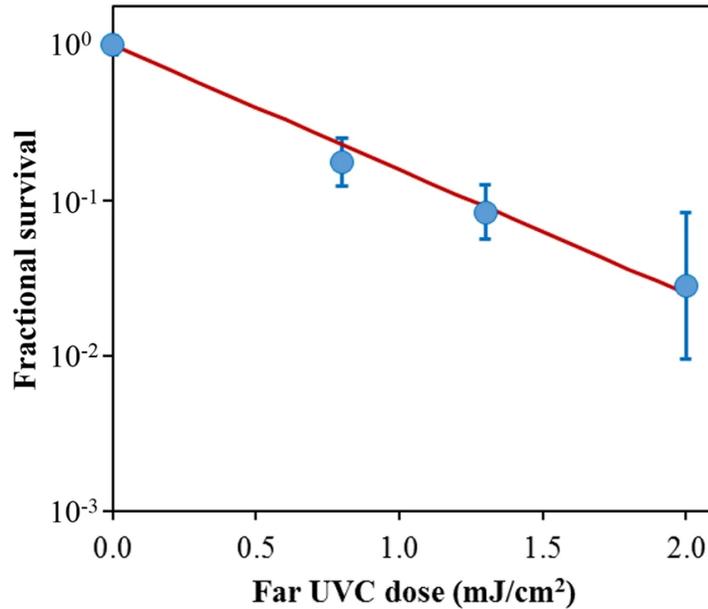


Figura 4.7: Cuantificación de la eficacia antiviral de la luz 222 nm. Desviación estándar referida a la repetición del estudio 2 veces.

4.3. Estudios de otros grupos: 2018-2020

A continuación se presenta un estudio de los efectos en la piel debido a altas exposiciones a luz UV-C [11]. Según los trabajos previos de los mismos autores, con una única irradiación con luz 222 nm, el número de bacterias SARM presentes en heridas de piel de ratón se reducía, sin producir CPDs en la epidermis de las células de esta. Por otra parte, una irradiación crónica de UV-B induciría un alto número de CPD que se reduce días después, pero con la capacidad de producir tumorigenesis. Es por ello que, en [11], los autores estudiaron el efecto de UV-C en dosis crónicas.

En el estudio se utilizaron una lámpara Kr-Cl con un filtro óptico que restringe el espectro a 200-230 nm con salida máxima en 222 nm, y una lámpara de baja presión de mercurio convencional. Primero se evaluó la tasa de recuperación de CPD tras una exposición radiante de 75 mJ/cm^2 con radiación de 254 nm. Posteriormente, se evaluó el efecto tóxico tras la exposición de 450 mJ/cm^2 de luz 222 nm o 254 nm diariamente durante varios días.

En el primer experimento, las muestras de piel irradiadas fueron recogidas 1, 3, 6 y 24 horas después, observándose la formación de CPDs. Tras la irradiación, se detectaron células con CPD en el estrato espinoso, que se mantuvieron en el análisis tras 1 hora. A las 3 y 6 horas, solo se encontraron células con CPD en la parte superior de este estrato, y a las 24 horas solo se encontraron en la superficie de la epidermis. 24 horas después de la irradiación solo quedaron células con CPD en la superficie, reduciéndose de un 37% de queratinocitos con CPD a un 13%.

En el segundo experimento, se expusieron los ratones, previamente anestesiados, diariamente a 450 mJ/cm^2 , los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, reposando los días 6 y 7. En la figura 4.8 se observan los efectos tras la exposición en los dorsos. No aparecieron señales visuales debido a 222 nm, mientras que en los ratones expuestos a 254 nm, aparecieron síntomas de quemadura y descamación que, pese a atenuarse brevemente en el día 8, produjeron anomalías los días posteriores .

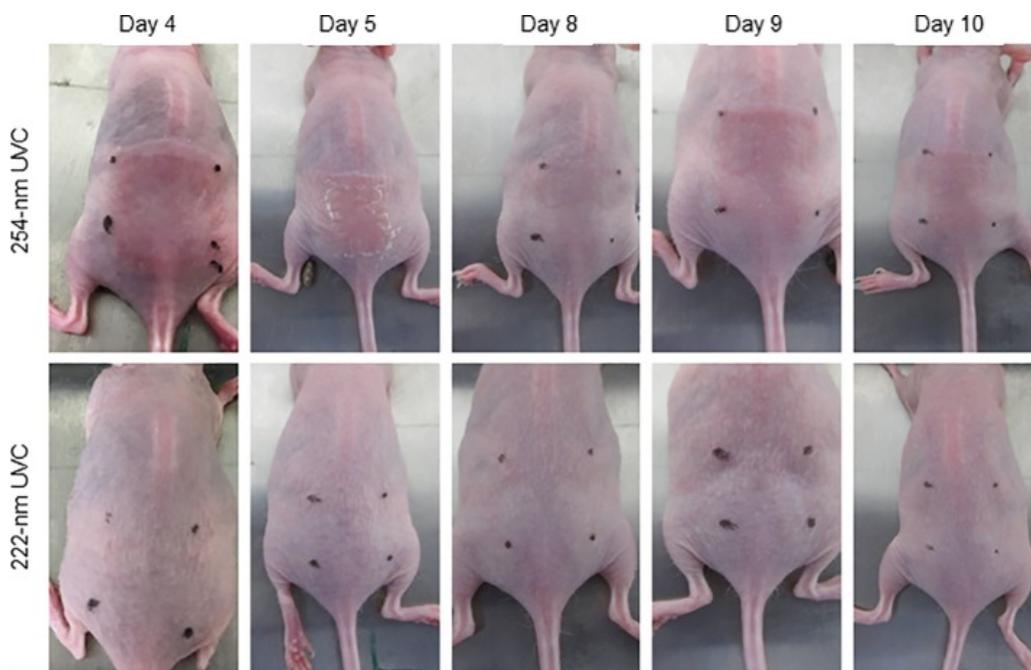


Figura 4.8: Efectos de la irradiación diaria de 450 mJ/cm^2 durante 10 días, con luz UV-C 254 nm y 222 nm. Los daños se evaluaron inmediatamente después de la exposición.

Posteriormente se realizó un análisis histológico en el cual se detectó que los ratones irradiados con 254 nm sufrieron diversas complicaciones en el estrato espinoso. No se encontraron células con CPD en esta capa, aunque sí en el estrato córneo. En contraste, ninguno de estas anomalías se encontró en la piel irradiada con 222 nm.

Los autores concluyeron de que la exposición crónica a luz UV-C con longitud de onda 222 nm no produce efectos citotóxicos ni consecuencias carcinogénicas en comparación con la longitud 254 nm, en la cual el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos es capaz de reducir el número de células con CPD, pero la aparición de daños crónicos en la piel es inevitable. La reducción de los niveles de células con CPD se deben también al recambio de la epidermis inducido por la radiación UV-C.

En continuación con el estudio de daños debido a exposiciones crónicas, en el estudio [12] se expusieron a radiación UV-C a ratones sin defectos genéticos (referidos como tipo natural) y a ratones con xerodermia pigmentaria grupo A (XP-A). Esta es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva, en la que el sujeto tiende a desarrollar tumores de piel, debido al malfuncionamiento de los mecanismos de reparación de ADN. Con ello se analizó la seguridad de la luz UV-C con respecto a la carcinogénesis.

Como fuentes de luz UV, se utilizaron una lámpara excimer Kr-Cl con un filtro, obteniéndose una emisión principal de longitud 222 nm, una lámpara de mercurio con la que se obtuvo luz 254 nm y 6 lámparas fluorescentes, con las que se obtuvo el espectro de emisión continuo UV-B entre 275 y 390 nm, con un pico de emisión en 313 nm.

En el experimento se expusieron a los ratones tipo natural a 500 mJ/cm^2 de luz 222 nm tres veces a la semana, y a los ratones XP-A a 50 mJ/cm^2 y 100 mJ/cm^2 , dos veces a la semana, durante un total de 10 semanas. Como exposición positiva, los autores utilizaron el mismo protocolo para inducir tumores utilizado en un previo trabajo; 25 mJ/cm^2 de radiación UV-B, 1 vez a la semana, durante un total de 10 semanas. Para el estudio ocular, se utilizaron los ojos de los ratones de ambos tipos expuestos a 222 nm, y como exposición positiva, UV-B 50 mJ/cm^2 , 2 veces a la semana, durante 10 semanas.

Tras 15 semanas de reposo, los autores realizaron varias pruebas y análisis. En primera instancia, se evaluó la aparición de CPDs 3 horas después de la radiación en la epidermis. Se detectaron células con CPD en los ratones irradiados con 254 nm y UV-B, en ambos genotipos. Para observar una tenue formación de CPDs en las muestras expuestas a 222 nm, se requirió exposiciones de 500 mJ/cm^2 , para ambos genotipos, encontrándose solamente en la zona subcorneal.

A continuación, se observó la respuesta inflamatoria, factor relacionado con el desarrollo de cáncer de piel. No se encontraron eritemas o hinchazones en las orejas en exposiciones de 1000 mJ/cm^2 de luz 222 nm, para ninguno de los dos genotipos, mientras que sí se encontraron en los expuestos a 254 nm y UV-B, con exposiciones menores (figura 4.9).

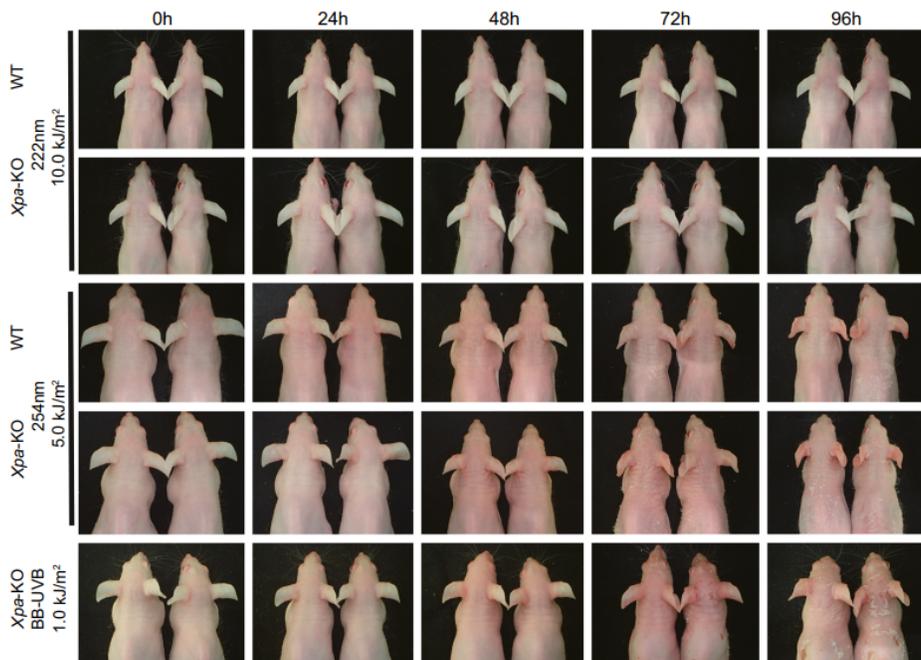


Figura 4.9: Fotografías de parejas de ratones, de tipo natural y de tipo XPa, expuestos con las diferentes radiaciones.

En el análisis de la inducción de tumores, se realizó una medición del nivel de proteína CXCL1, clave en la producción de cáncer. Se observó que, mientras que la exposición a 254 nm aumentaba los niveles, facilitando inducciones de tumores, la luz 222 nm no aumentaba estos en exposiciones de 1000 mJ/cm^2 , pese a la condición genética del ratón XP-A a desarrollarlo. Tampoco se observaron apariciones de tumores o efectos foto carcinogénicos, incluso en las partes de la piel dañadas por mordeduras y arañazos. No se observaron daños oculares en exposiciones de luz 222 nm, apareciendo varios daños, incluido cataratas en las exposiciones a UV-B.

Previamente se observó en exposiciones de 1000 mJ/cm^2 un mayor número de células con CPD en la capa más externa de la epidermis, y un engrosamiento de la epidermis en los ratones con genotipo XP-A. Para comprobar si estos efectos se debían a la longitud de onda 222 nm u otras, de menor intensidad, los autores construyeron un segundo irradiador utilizando la misma lámpara y 3 filtros de características similares, emitiéndose un 1% de la intensidad anterior, entre las longitudes 235 y 280 nm. Reproduciendo el experimento con una exposición de 10.000 mJ/cm^2 , se observó una reducción en el número de células con CPD con respecto del irradiador A, así como la ausencia de engrosamiento a las 72 horas de la exposición. Los autores aseguran que no se detectaron hinchazones o vasodilataciones en las orejas, para el tipo natural, en ninguno de los irradiadores, mientras que para el ratón XPa, se observó una pequeña vasodilatación en el irradiador B, pero no hinchazones (Figura 4.10).

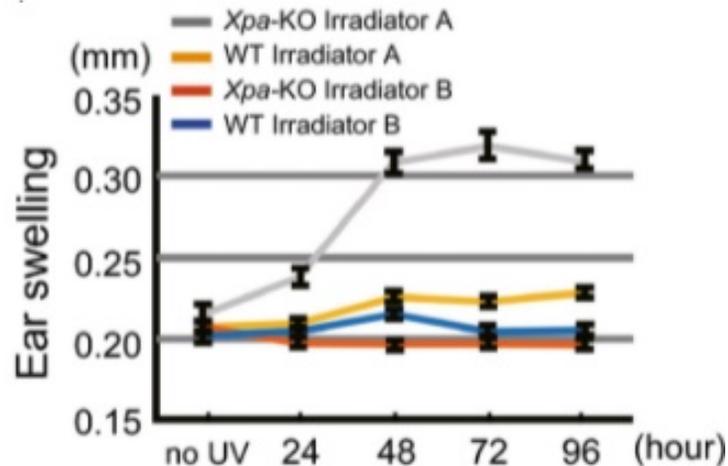


Figura 4.10: Diferencia de hinchazón de orejas al usar el irradiador con 3 filtros (B), frente al irradiador de un filtro (A).

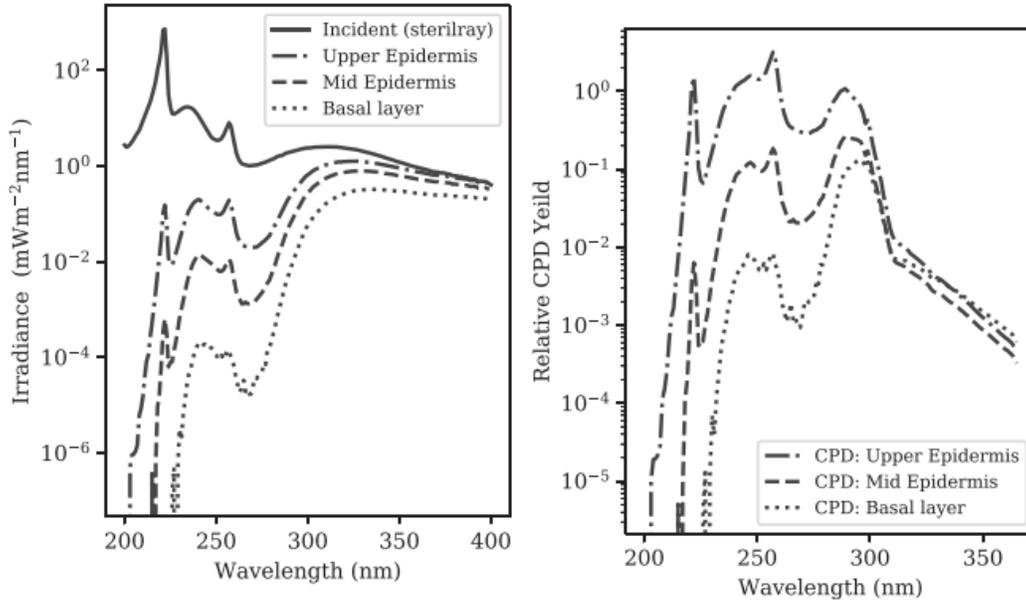
Los resultados del estudio sugieren que la luz UV-C lejana es significativamente menos inflamatoria, siendo los enrojecimientos e inflamaciones debidas a otras longitudes de onda mayores, no filtradas, que pese a tener una intensidad mucho menor que la longitud de onda 222 nm, son significativas en casos extremos. Los autores plantearon dos posibles razones para la no formación

de tumores en la piel, sin importar la expresión genética. La probabilidad de formación de CPDs por absorción de la radiación en el ADN es más alta cerca de los 260 nm, disminuyendo para longitudes mayores y menores, siendo la generación de CPDs en 222 nm es aproximadamente un 70 % de la de 254 nm. Además, la luz UV-C 222 nm no sería capaz de penetrar el estrato córneo, por lo que no se alcanzaría la capa de células basales donde se encuentran las células madre potencialmente cancerosas. La longitud de onda 222 nm solo alcanzaría las capas más exteriores, donde se producen CPDs en células que no son capaz de transformarse, y a su vez absorbiendo esta luz debido a la queratina.

A lo largo de trabajos previos, los diversos grupos fueron mostrando que, pese a las variaciones de eficiencia, las longitudes de onda 207, 222 y 254 nanómetros son efectivas en la inactivación de gérmenes. Eadie et al. [13] sugieren que mientras que nuevas cepas y mutaciones se vuelven resistentes a los medicamentos, es poco probable que estas crezcan en tamaño, por lo que el UV-C seguiría siendo efectiva contra estas. Sin embargo, las luces 222 nm y 207 nm no dañarían las células humanas.

Con el fin de evidenciar la seguridad en voluntarios, Eadie et al. [13] emplearon códigos Montecarlo para transferencia de radiación (MCRT) de anteriores trabajos [34], simulando paquetes de energía UV que irradian un modelo equivalente a 400 μm de piel con 5 capas. Introduciendo los coeficientes de absorción, dependientes de la longitud de onda, y propiedades de dispersión obtenidas de Gemert et al [35], se obtuvo una simulación de la fluencia en función de la longitud de onda, para cada capa de la piel. Combinando estos datos con el espectro de rendimiento de CPD y la concentración de ADN en cada capa de Matsunaga et al [36], se obtuvo la probabilidad de inducir CPD en cada capa en una piel Fitzpatrick tipo I, en función de la longitud de onda.

En la figura 4.11a se observa que la radiación 222 nm no llega al estrato basal. Las longitudes de onda mayores a 270 nm si que llegan a esta capa, pero sus intensidades son ínfimas, no observables el espectro original. En la figura 4.11b se indica la probabilidad de formación de CPDs en las diversas capas. La formación de estos en el estrato basal provendría de las longitudes



(a) Irradiancia espectral de la luz UV-C correspondiente al trabajo de Woods et al [10] y las fluencias incidentes. (b) Probabilidad de producir CPD relativa a 260 nm.

Figura 4.11: Resultados de la combinación de MCRT [34], coeficientes de absorción [35] y espectro de rendimiento [36].

de onda entre 270 y 310 nm, cuya intensidad es muy baja en las lámparas. Un correcto filtrado eliminaría la posibilidad de producir lesiones en el ADN en las capas más interiores.

Los resultados apoyan la hipótesis inicial ya realizada en [10]; la formación directa de CPDs en el estrato basal se debería a longitudes de onda superiores a 230 nm, entre 270 y 310 nm, cuyas intensidades son bajas pero significantes en casos extremos. Un correcto filtrado sería necesario para evitar los daños en las capas interiores. La formación de CPDs en capas superiores se puede deber a cualquier longitud de onda, incluida la 222 nm, pero debido a la naturaleza de esta, no representaría ningún riesgo para las personas expuestas.

4.4. Epidemia de Sars-CoV-2: 2020-2021

El 11 de marzo de 2020, la epidemia de SARS-CoV-2 es elevada a pandemia, volviendo este coronavirus objeto de investigación. Es por ello que Buonanno et al. estudiaron el efecto de la luz UV-C 222 nm en las cepas alpha HCoV-229E y beta HCoV-OC43 [8]. Según los autores, en las partículas de aerosol similares a las producidas al toser y estornudar, los coronas tienen tamaño físico y genómico similar, siendo estos estudios valiosos de cara al Sars-CoV-2. Se evaluó la infectividad en células pulmonares humanas, y la inactivación al ser expuestas a distintas dosis de luz UV-C 222 nm.

Para medir la inactivación del virus, se expusieron células de pulmones humanos por medio de aerosol, y utilizando procedimientos estándar, se midió la inactivación vírica. La infectividad se cuantificó usando ensayos $TCID_{50}$, obteniéndose que ambos se ajustan al modelo exponencial de desinfección UV con un procedimiento similar al utilizado en [7]. Los resultados se representan en la figura 4.12; la fracción de supervivencia se obtiene como el cociente $PFU_{UV} / PFU_{control}$, donde PFU representa la cantidad de virus por milímetro, obtenida de $PFU/ml=0.7 TCID_{50}$.

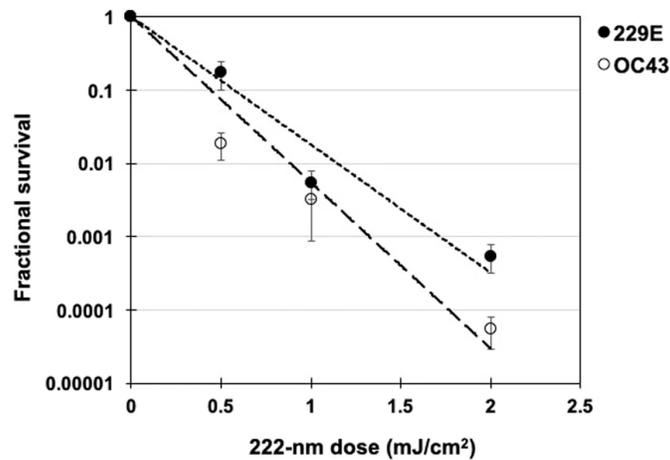
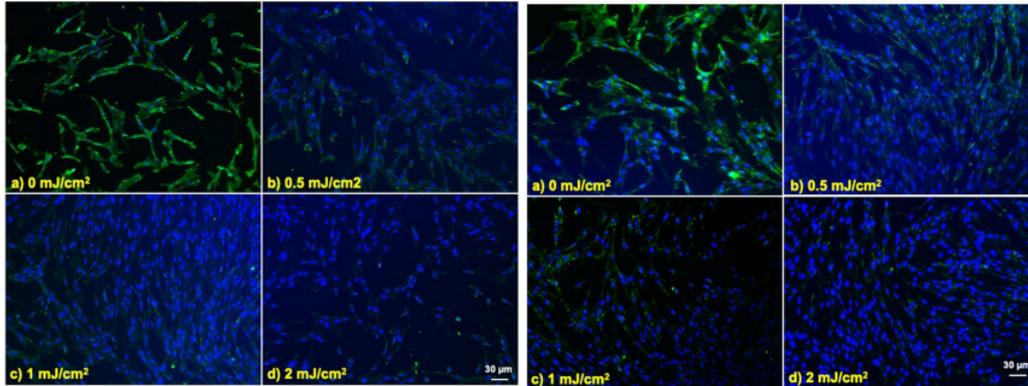


Figura 4.12: Fracción de supervivencia en función de la dosis de luz UV 222 nm.

Se obtuvieron constantes de inactivación 4.1 y 5.9 cm^2/mJ para la alfa y beta, respectivamente. Según estos resultados, se necesitaría exposiciones de 1.7 y 1.2 mJ/cm^2 para inactivar el 99.9 % de los patógenos.

Para comprobarlo, se estudió la integración del virus en las células humanas tras haber expuesto el aerosol a distintas fluencias de UV-C. Las figuras 4.13a y 4.13b muestran las células marcadas por inmunofluorescencia. Las células que expresan una glicoproteína viral fueron marcadas de verde (Alexa Fluor-488), mientras que el azul es debido al marcador fluorescente DAPI. En ambos casos, se observó que las irradiaciones de 222 nm reducían la expresión de la glicoproteína.



(a) Infección de alfa HCoV-229E.

(b) Infección de beta HCoV-OC43.

Figura 4.13: Infección de las células pulmonares por coronavirus estacional en forma de aerosol tras exposiciones de a) 0, (b) 0.5, (c) 1 o (d) 2 mJ/cm^2 de luz UV-C 222nm.

Los autores asociaron la diferencia en eficacia entre la influenza ($k= 1.8 cm^2/mJ$) y el coronavirus a las diferencias en la estructura, tamaño del genoma y configuración del ácido nucleico, además de un método de evaluación distinto. Los autores compararon sus resultados con el efecto de la radiación 254 nm en aerosoles virales [37], llegando a la conclusión de que los coronavirus tienen sensibilidad similar en todo el espectro UV, siendo la luz 222 nm una opción para reducir los contagios de forma segura.

Uno de los problemas hospitalarios más frecuentes es la correcta desinfección de las superficies contaminantes, con el fin de evitar Infecciones del sitio quirúrgico. El uso de lámparas 254 nm requiere despejar la zona de exposición, mientras que el uso lámparas emisoras de luz 222 nm permitiría la desinfección y el uso simultáneos de la zona. En [15], se estudió la eficacia de la luz UV 222 nm para descontaminar una superficie contaminada por SARS-CoV-2.

Los autores prepararon 5 muestras de células extraídas de riñones de la especie africana mono verde, caracterizadas por tener expresiones humanas. Estas fueron expuestas a una lámpara Kr-Cl filtrada, emitiendo principalmente longitud de onda 222 nm con una intensidad radiante de 0.1 mW/cm^2 . Las irradiaciones tuvieron una duración de 10, 30, 60 y 300 segundos.

Las células fueron infectadas con Sars-CoV-2 e incubadas. Con el método TCID₅₀ se determinó la concentración de SARS-CoV-2 en cada muestra, comparándose con las concentraciones de las muestras no irradiadas. Finalmente se extrajo el ARN y se realizó el procedimiento RT-qPCR para analizar la expresión génica.

Los autores concluyeron que una exposición a 0.1 mW/cm^2 durante 30 segundos, es decir, una exposición radiante de 3 mJ/cm^2 , redujo el nivel de presencia de Sars-CoV-2 en un 99.7%, por debajo de los niveles de detección por esta técnica, indicando que la luz UV-C 222 nm sería efectiva frente a esta beta, como se había presupuesto en trabajos anteriores [8].

Los autores destacaron que, tras un examen RT-qPCR, el número de copias de ARN no varió en comparación con las muestras no irradiadas para exposiciones de hasta 30 mJ/cm^2 . Se llegó a la conclusión de que el ensayo TCID₅₀ es una opción más viable que el PCR para el estudio de la contaminación de SARS-CoV-2, ya que esta no refleja la contaminación real.

A lo largo de los trabajos previos se ha destacado el uso de un filtro óptico para eliminar las longitudes mayores a 222 nm. La lámpara Kr-Cl emite principalmente en esta longitud debido a la transición del excímero, pero pueden existir otras transiciones electrónicas. Estudios del espectro de absorción del UV indican que longitudes de onda mayores serían menos absorbidas por las proteínas de la piel [25], teniendo una mayor penetración pueden causar graves daños en el ADN [10] [13].

En [9], Buonanno et al. compararon la inducción de CPDs y 6-4 PP en un modelo de piel con una lámpara Kr-Cl con filtro y sin filtro. Se compararon los efectos a exposición de radiaciones de 222 nm y 254 nm máximas por el límite de exposición diario, marcado por la Comisión Internacional de Protección de Radiación no ionizante (ICNIRP) y la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH) (referencias en [9]). Además, se realizó un cálculo teórico del límite de exposición para la lámpara de 222 nm con y sin filtro.

Usando un medidor de potencia UV, se verificó las irradiancias de cada lámpara: 0.85 mW/cm^2 , 0.59 mW/cm^2 y 0.24 mW/cm^2 para lámpara Kr-Cl no filtrado, lámpara Kr-Cl con filtrado y 254 nm respectivamente. Con un espectrómetro, se obtuvo el espectro de irradiancia de la lámpara (Figura 4.14a).

Para obtener el espectro de la lámpara con filtro, se multiplicó el espectro anterior por la transmisión del filtro (Figura 4.14b). Aplicando al espectro normalizado los factores de peso obtenidos de la ICNIRP, que muestran el riesgo relativo al pico de riesgo 270 nm, se obtuvo la irradiancia espectral (E_{eff}) de cada espectro. Calculando el área bajo la curva correspondiente a la irradiancia efectiva, y el área bajo la curva normalizada, se obtuvo el riesgo espectral efectivo total de la lámpara según la ecuación 4.1. Dividiendo la exposición radiante diaria permitida, 3 mJ/cm^2 , entre esta, se obtiene la exposición límite de la lámpara (4.2).

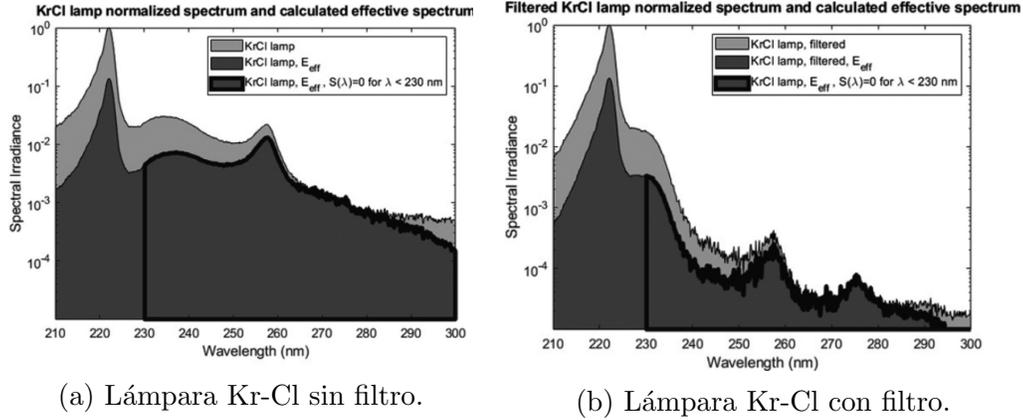


Figura 4.14: Espectros normalizados de la irradiancia efectiva.

$$S(\lambda) = \frac{\text{Área de la irradiancia efectiva normalizada}}{\text{Área normalizada}} \quad (4.1)$$

$$\text{Exposición límite de la lámpara} = \frac{3mJ * cm^{-2}}{S(\lambda)} \quad (4.2)$$

En la medición de la lámpara de mercurio a baja presión se obtuvo $S=0,49$, es decir, una exposición límite de $6 mJ/cm^2$. Para la lámpara Kr-Cl, se obtuvo $S=0,171$ con filtro y $S= 0,133$ sin filtro, es decir, exposiciones límite de $22.5 mJ/cm^2$ y $17.5 mJ/cm^2$. En comparación con la dosis máxima diaria permitida actualmente si la emisión fuese monocromática, $23 mJ/cm^2$, estas representan un 98 % y un 76 %. Según estos resultados, la aplicación del filtro permitiría exponerse a la lámpara durante un mayor periodo de tiempo, muy próximo al de la luz monocromática.

Los autores repitieron los cálculos para el hipotético caso en el que el riesgo para longitudes de onda menores a 230 nm fuera 0, también representados en las figuras 4.14. En este caso, el riesgo espectral S disminuye a 0.063 y 0.05, obteniéndose exposiciones máximas permitidas de $47.6 mJ/cm^2$ en la lámpara 222 nm y $600 mJ/cm^2$ al aplicar un filtro. Los resultados indican que es necesario el filtrado de longitudes mayores a 230 nm.

A continuación, se estudió la inducción de daños premutagénicos en el ADN en un modelo 3D de la piel humana. Para ello, se usó un modelo consistente en estrato corneo y varias capas de células humanas simulando la dermis y epidermis. Utilizando los métodos inmunohistoquímicos previos de otros estudios, se detectaron los fotoproductos en el ADN y se midió su inducción en función de la exposición a UV-C.

Los modelos fueron sometidos a exposiciones de 0, 23, 50, 150 y 500 mJ/cm^2 , mostrados en las figuras 4.15. Se observó que en la lámpara Kr-Cl sin filtrar, aparecen ambos tipos de dímeros en los tejidos expuestos, en mayor número a mayores exposiciones. En los tejidos expuestos a lámpara con filtro, no hay aparición de 6-4PP. EN contraste, hay una aparición de queratinocitos CPD positivos en la capa epidérmica superior para la exposición a 500 mJ/cm^2 , de magnitud similar a la exposición 23 mJ/cm^2 sin filtrar. Esta no involucra a las células basales, capaces de replicarse, en la parte más profunda de la epidermis.

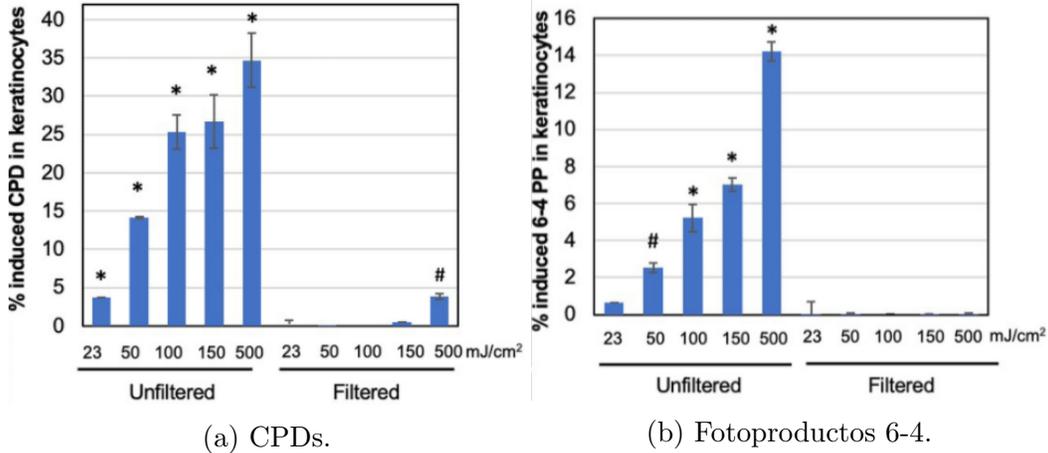


Figura 4.15: Porcentaje de queratinocitos positivos en dímeros, en función de la exposición a la lámpara 222 nm, con filtro y sin filtro.

Finalmente, se midieron las inducciones de los dímeros al exponer el modelo a los límites de exposición permisibles actuales: 6 mJ/cm^2 para radiación 254 nm, y 23 mJ/cm^2 para radiación 222 nm. La comparación se muestra en la figura 4.16a para CPDs y en la figura 4.16b para 6-4 PP. En el caso de CPD, la inducción debido a luz 222 nm es 3 veces menor que la debida a la luz 254 nm. Si la luz 222 nm es debidamente filtrada, la inducción es 730 veces menor respecto a la luz 222 nm sin filtrar. En la inducción de fotoproductos 6-4, la inducción debida a luz 222 nm es 9 veces menor que en 254 nm, y, al filtrar la luz 222 nm, se reduce 112 veces.

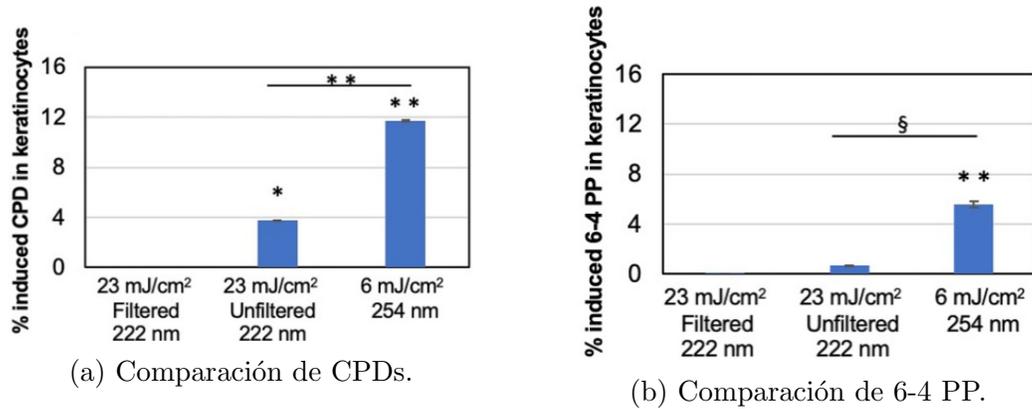


Figura 4.16: Comparación de la inducción de dímeros en lámpara 222 nm con filtro, sin filtro y lámpara de mercurio convencional 254 nm.

Los autores concluyeron que para realizar un correcto uso, se debe realizar una medición de la exposición límite diaria, teniendo en cuenta el espectro completo de la lámpara. El filtro óptico es necesario para mitigar los efectos debidos a longitudes de onda diferentes de la 222 nm debido a que, pese a estar en menor cantidad, siguen siendo un riesgo. Así mismo, los autores recomendaron un reajuste de los límites de exposición actuales, ya que, con apoyo de los trabajos previamente tratados, las longitudes de onda menores a 230 nm pueden ser seguras para el ser humano, y los valores teóricos en el caso de que su riesgo espectral sea menor, son mayores en comparación con los actuales.

A lo largo de los trabajos se ha realizado un estudio sobre la exposición a la luz 222 nm que, correctamente filtrada, sería segura frente a exposiciones largas y de gran intensidad. Sin embargo, estos estudios no estaban realizados sobre seres humanos, con excepción de [10], en el cual se usó una máquina de esterilización sin filtro, apareciendo lesiones en los voluntarios. En [13] se realizaron estudios basados en simulaciones que apoyaban la hipótesis de que las lesiones se debían a longitudes mayores a 230 nanómetros no debidamente filtradas.

En [14], Eadie et al. expusieron a un sujeto masculino, con piel Fitzpatrick tipo II a una lámpara Kr-Cl con pico de emisión en 222 nm. Se expusieron las partes internas del antebrazo a distintas fluencias, y se repitió el proceso con un mayor filtrado con el fin de reducir el efecto de longitudes entre 230 y 280 nm. Los autores utilizaron un espectrómetro de reflectancia para observar el cambio de tono de la piel al instante de la exposición, 12 y 24 horas después. Los autores obtuvieron la variación de iluminación (blanco-negro), el enrojecimiento (verde - rojo) y el amarillamiento (azul - amarillo) en valores numéricos. Utilizando el código MCRT de [13], se estudió la profundidad de la penetración de la luz.

Las irradiancias de las lámparas fueron de 6.1 mW/cm^2 inicialmente y $5,8 \text{ mW/cm}^2$ tras la colocación de filtros adicionales. Con periodos de exposición de de 1000, 2000 y 3000 segundos, se obtuvieron fluencias radiantes de 1500, 6000, 12000 y 18000 mJ/cm^2 , muy por encima de la dosis necesaria para eliminar un microorganismo.

En la figura 4.17, cedida por el autor, se representó la distribución espectral obtenida de la lámparas, en comparación con la maquina de esterilización de Woods et al [10]. Se obtuvo un espectro similar cerca del pico de 222 nm, que disminuye notablemente al aplicar mayores filtros. Los autores no encontraron ninguna diferencia visual al aplicar un mayor filtrado a la lámpara.

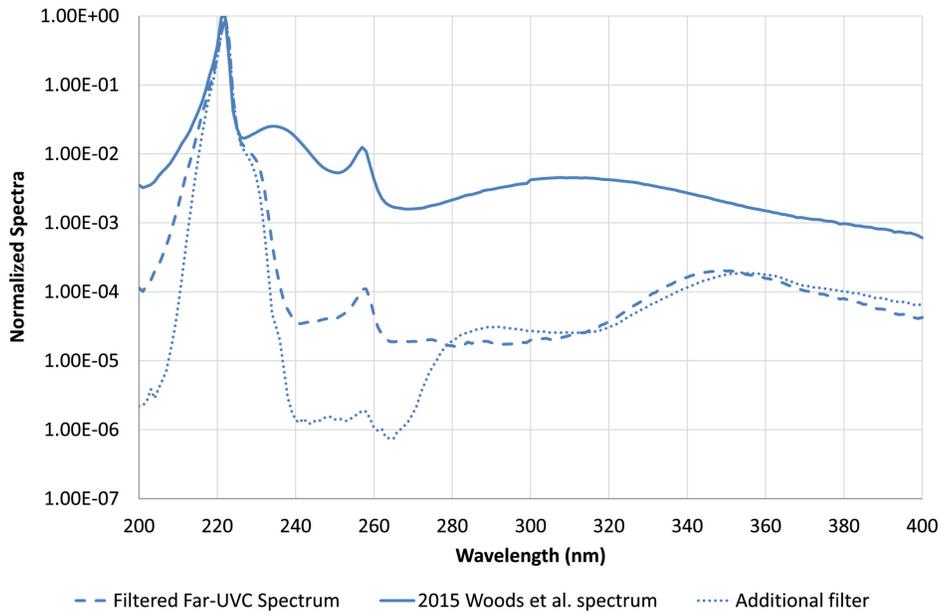


Figura 4.17: Distribución espectral normalizada.

Los resultados del espectrómetro de reflectancia se muestran en la figura 4.18. En la exposición de 1500 mJ/cm^2 no se observó ningún cambio en la piel. Para exposiciones de 6000 mJ/cm^2 y mayores, se observó un amarillamiento de la piel al instante, de mayor duración cuanto mayor fue la dosis. Para ninguna de los valores se encontraron eritemas (enrojecimiento).

Los autores realizaron medidas adicionales, eliminando el estrato córneo de la piel. Según los resultados, representados en la figura 4.19, se redujo el color amarillo, lo cual indica que los cambios estarían limitados a las capas más exteriores. Además, las diferencias con la lámpara con filtro adicional fueron insignificantes, indicando que el amarillamiento se debería a la longitud 222 nm, y no a otras mayores. Los autores concluyeron que la causa no fue Oscurecimiento Inmediato del Pigmento, ya que este se debe a longitudes perteneciente al espectro visible o UV-A, cuya presencia en la lámpara es mínima.

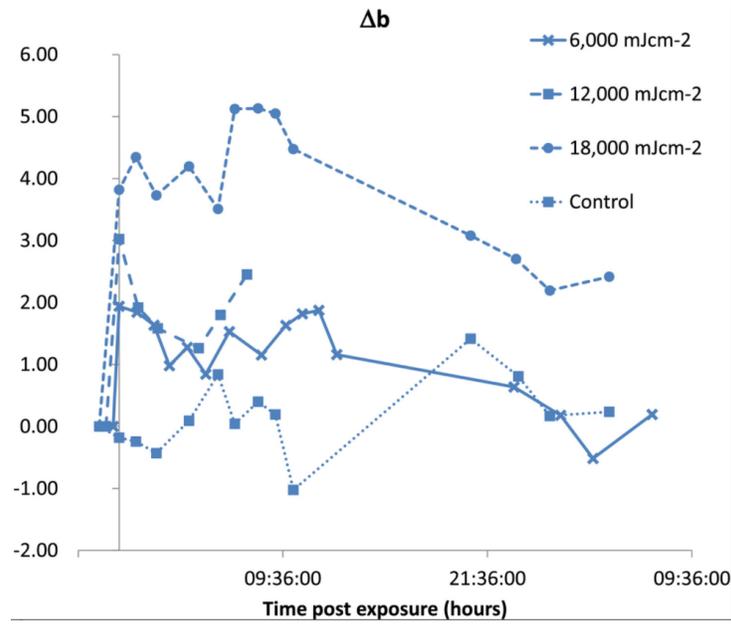


Figura 4.18: Amarillamiento de la piel para distintas exposiciones de luz 222 nm. No se observó enrojecimiento para ninguna exposición.

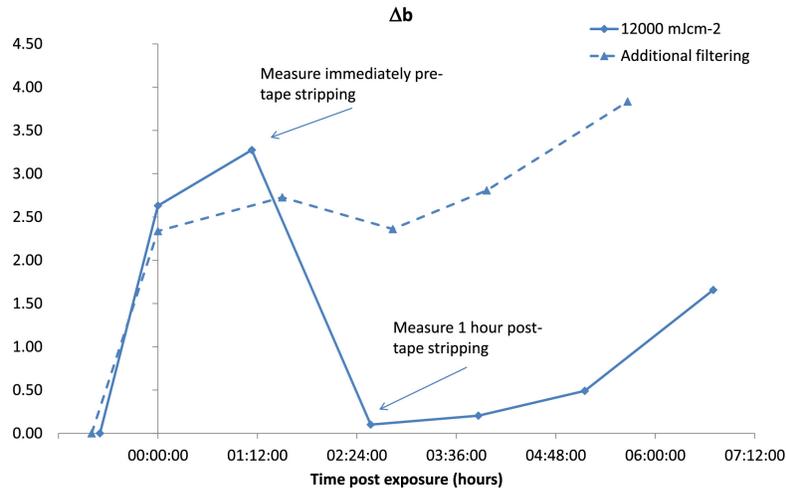


Figura 4.19: Amarillamiento de la piel expuesta a 12000 mJ/cm^2 . Hay una caída en el amarillamiento al eliminar el estrato córneo.

Utilizando el modelo computacional MCRT, se observó la incidencia en las distintas capas de la epidermis, mostrado en la figura 4.20. Se observa que la incidencia de la luz filtrada es 100 veces menor que la de la luz sin filtrar, para cualquier capa de la piel.

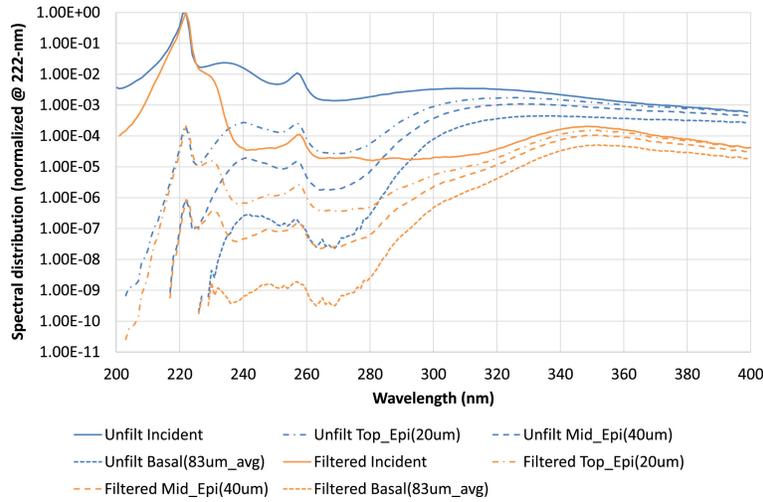


Figura 4.20: Resultados del ratio de fluencia espectral relativo en la piel obtenido por el modelo MCRT. La luz de la lámpara UVC filtrada se representa en naranja. Los resultados del modelo de *Barnard et al.* [13] se representan en azul. Se representaron los valores en la epidermis y el estrato basal.

Según el estudio, una exposición de 1500 mJ/cm^2 de luz UV-C con pico de intensidad 222 nm debidamente filtrada no produciría eritemas en la piel de un ser humano. Según los resultados, la exposición a cantidades mayores que el actual límite permitido por ICNIRP, 23 mJ/cm^2 , y a las que causaron eritemas en el estudio de Wood et al. [10], 50 mJ/cm^2 , serían seguras. Los autores teorizaron que la formación de dímeros en las capas superiores se puede deber a cualquier longitud de onda, incluida la longitud 222 nm, sin representar un peligro para la salud humana. En cambio, la formación de CPDs y fotodiosos 6-4 en el estrato basal podría producir cáncer. Estas formaciones se deben a longitudes de onda mayores de 230 nanómetros, que pueden ser correctamente filtradas. Según otro de sus estudios [38], una longitud de onda de 222 nm no alcanzaría el estrato basal incluso a exposiciones de 6100 mJ/cm^2 .

4.5. Estudios oculares

En los trabajos recopilados anteriormente, los estudios se centraron en el efecto sobre la piel, con excepción de [12], donde se estudiaron los efectos de la luz 222 nm para ambos tipos de genomas de ratón, no encontrándose ningún daño ocular. El estudio ocular es de mayor dificultad ya que, a diferencia de en la piel, el epitelio corneal está compuesto de células vivas.

En [16], los autores realizaron una primera evaluación de los daños tras la exposición del centro de la córnea de ratas a fluencias de 30, 150, y 600 mJ/cm^2 de luz UV-C 222 nm y 254 nm. Para ello, se anestesiaron las ratas, y se irradiaron las córneas. 24 horas tras la exposición, se evaluó el daño preliminar en la cornea y retina, mediante tinción con fluoresceína, mostrando defectos epiteliales. Posteriormente, se enuclearon los ojos, que fueron teñidos con H & E para una evaluación más detallada de los daños. Finalmente se realizó un análisis de CPDs mediante inmunotinción por anticuerpos.

En la exposición a 254 nm, se obtuvieron los siguientes resultados. La fluoresceína mostró que para exposiciones de 30 mJ/cm^2 , no se observaron defectos epiteliales significantes, mientras que los ojos expuestos a 150 mJ/cm^2 presentaron fotoqueratitis superficial, y los expuestos a 600 mJ/cm^2 presentaron erosión de la córnea. En el análisis de tinción H & E, los autores observaron un desprendimiento de células epiteliales escamosas, provocando un adelgazamiento de la capa epitelial, para las muestras expuestas a 150 mJ/cm^2 . Los efectos se agravaron en las exposiciones a 600 mJ/cm^2 , en los que la capa epitelial se desprendió completamente, quedando el estroma corneal parcialmente expuesto. En el análisis de células con CPD, se observaron algunas células epiteliales débilmente teñidas cerca del estroma. En la exposición 150 mJ/cm^2 , se observó un teñido moderado células epiteliales escamosas lejanas del estroma. En los casos de exposiciones 600 mJ/cm^2 , la capa desprendida se tiñó intensamente, así como algunas células endoteliales, indicando daño en el ADN de la mono capa no regenerable.

En contraste, en las exposiciones a luz 222 nm, en ninguno de los casos se encontraron efectos negativos.

Recientemente, el mismo grupo de investigación realizó una segunda evaluación del daño en la córnea de ratas, ratones y conejo (*in vivo*) y en ojos porcinos (*ex vivo*), debido a las longitudes de onda 207, 222, 235, 254 y 311 nanómetros [17], expandiendo los resultados del anterior estudio. Los animales fueron anestesiados y expuestos, siguiendo el mismo procedimiento que en [16]. 24 horas tras la exposición, se evaluaron los defectos en el epitelio corneal, mediante tinción con fluoresceína y observación de la irregularidad de la córnea usando un estereomicroscopio. Se realizaron una evaluación del daño histológico por tinción H & E y evaluación del daño en el ADN observando el número de CPDs. Además, se evaluó la aparición de CPDs inmediatamente tras la irradiación, con el fin de observar la capacidad de penetración de radiación UV en la córnea. Finalmente se estudió la capacidad de reparación del daño, evaluando la variación del número de CPDs, para lo cual se enuclearon los ojos, 0, 0,5 1, 2, 4, 6, 9 y 12 horas después de la exposición.

Combinando los resultados obtenidos de la irregularidad de la córnea y la fluoresceína, los autores representaron la exposición radiante mínima necesaria para que se observe daño por cualquiera de estos métodos (*LOAEL*), y la exposición radiante máxima con la que no se observa daño corneal (*NOAEL*), en comparación con el límite máximo de exposición diario permitido por el ACGIH. Los resultados se muestran en 4.21:

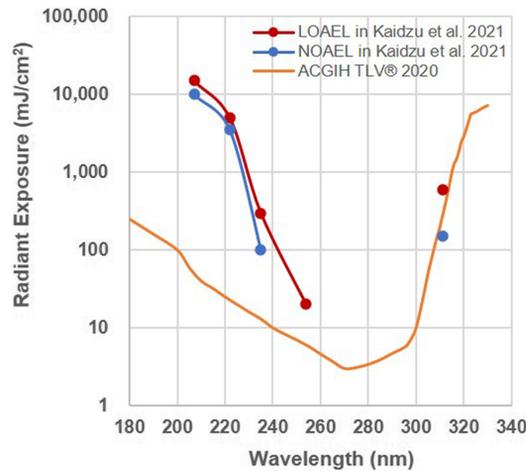


Figura 4.21: Representación de *LOAEL*, *NOAEL* y máximo permitido.

El umbral de exposición radiante se encuentra entre estos dos valores: 150 y 600 mJ/cm^2 para 311 nm, 100 y 300 mJ/cm^2 para 235 nm, 3500 y 5000 mJ/cm^2 para 222 nm y 10000 y 15000 mJ/cm^2 para 207 nm. En el caso de 254 nm, es menor que 20 mJ/cm^2 .

En la tinción H & E, se observaron los adelgazamientos de la córnea debido a exposiciones en este umbral (Figura 4.22). La exposición de 100 mJ/cm^2 de luz 254 nm provocó un adelgazamiento del epitelio, mientras que en la exposición de 300 mJ/cm^2 , el epitelio se redujo a una única capa, exponiendo el estroma. En contraste, solo se apreció un ligero adelgazamiento en las corneas expuestas a luz 222 nm para exposiciones de 5000 mJ/cm^2 . Los autores no detectaron cambios en exposiciones de luz 207, 235 y 311 nm, en sus respectivos umbrales.

En la evaluación de la aparición de CPDs 24 horas tras la exposición, se tiñeron las células positivas. Los resultados se muestran la figura 4.23. En la córnea sin irradiación, se observa que las células endoteliales están ligeramente teñidas. En las exposiciones a luz 311 nm, correspondiente al UV-B, se observa una tinción moderada en todas las capas con 600 mJ/cm^2 , mientras que con 150 mJ/cm^2 no se observaron CPDs. En las exposiciones a 254 nm, se observa una fuerte tinción en las células epiteliales, que aumenta considerablemente al aumentar la exposición. Sin embargo, no se observa tinción en el estroma. En contraste, para las longitudes UV-C lejanas, solo se observó tinción en las primeras capas del epitelio corneal. En los casos de 235 nm, la tinción es similar para todas las exposiciones. Para 222 nm, la tinción no se observa para exposiciones menores a 1500 mJ/cm^2 , encontrándose CPDs para exposiciones de 2500 y 5000 mJ/cm^2 . En el caso de 207 nm, esas exposiciones requeridas para observar CPDs aumentaron a 10000 y 15000 mJ/cm^2 .

Los resultados de la capacidad de penetración de la luz UV se muestra en la Figura 4.24. Se realizaron exposiciones de 600 mJ/cm^2 para las longitudes de onda 207, 222, 235 y 313 nm, y 50 mJ/cm^2 para la longitud de onda 254 nm. Las exposiciones de 222 nm y 254 nm se realizaron para cada animal. Para las longitudes de onda 313 y 254 nm, se encontraron células positivas en CPD en todas las capas de la córnea, indicando que ambas longitudes son capaces de alcanzar y dañar el endotelio corneal. En contraste, la luz 235 nm alcanzó la mitad del epitelio corneal, mientras que en las exposiciones a las

longitudes de onda 222 y 207 nm, solo se encontraron formaciones en capas más exteriores de la córnea. Los resultados para los diferentes animales para las radiaciones 222 nm y 254 nm, son similares entre las diferentes especies, y entre *in vivo* y *ex vivo*.

Finalmente, los autores evaluaron la variación de la localización de CPDs en las córneas expuestas a 600 mJ/cm^2 222 nm y 50 mJ/cm^2 254 nm (Figura 4.25). En la luz 254 nm, las tinciones en las capas más profundas desaparecieron en el transcurso de 12 horas, aunque estas permanecieron en la capa epitelial. En contraste, en la luz 222 nm solo se observaron inicialmente células teñidas en el epitelio, las cuales desaparecieron a lo largo de 12 horas.

Según los resultados experimentales, la exposición al UV-C lejano no produciría daños en la córnea pese a estar formado por células vivas. En comparación con la radiación 313 nm (UV-B) y la 254 nm (UV-C), que alcanzan el endotelio, las exposiciones a longitudes de 207 y 222 nm no se transmiten más allá de las primeras capas del epitelio, requiriendo dosis de 10000 y 2500 mJ/cm^2 para comenzar a observarse daños en el ADN no reparados tras 24 horas de descanso. Los autores aseguran que no se encontraron daños en el cristalino o la retina, aunque no se mostraron los resultados. Atribuyeron estos resultados a la absorción de la radiación UV en la película lagrimal que, pese a ser más estrecha que el estrato córneo ($5 \mu\text{m}$ frente a $20 \mu\text{m}$), bloquea el paso de la radiación, dando lugar a la absorción restante en las primeras capas de células de la córnea. El análisis de daños se realizó 24 horas después de la exposición, debido a la eficacia de la fluoresceína en este periodo, pero los autores recomendaron un estudio de efectos a largo plazo para confirmar la inocuidad de la UV-C lejana en los ojos.

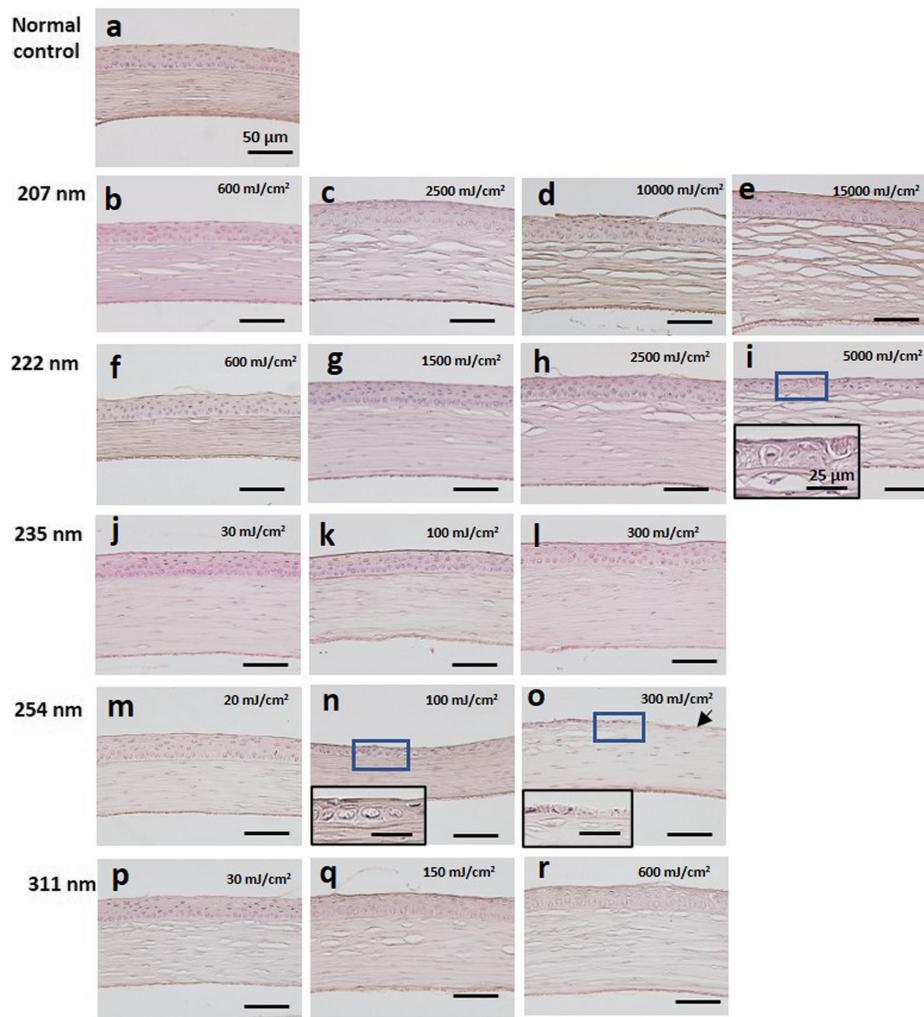


Figura 4.22: Resultados de la tinción H & E. Escala = 50 μm y 25 μm en imágenes aumentadas.

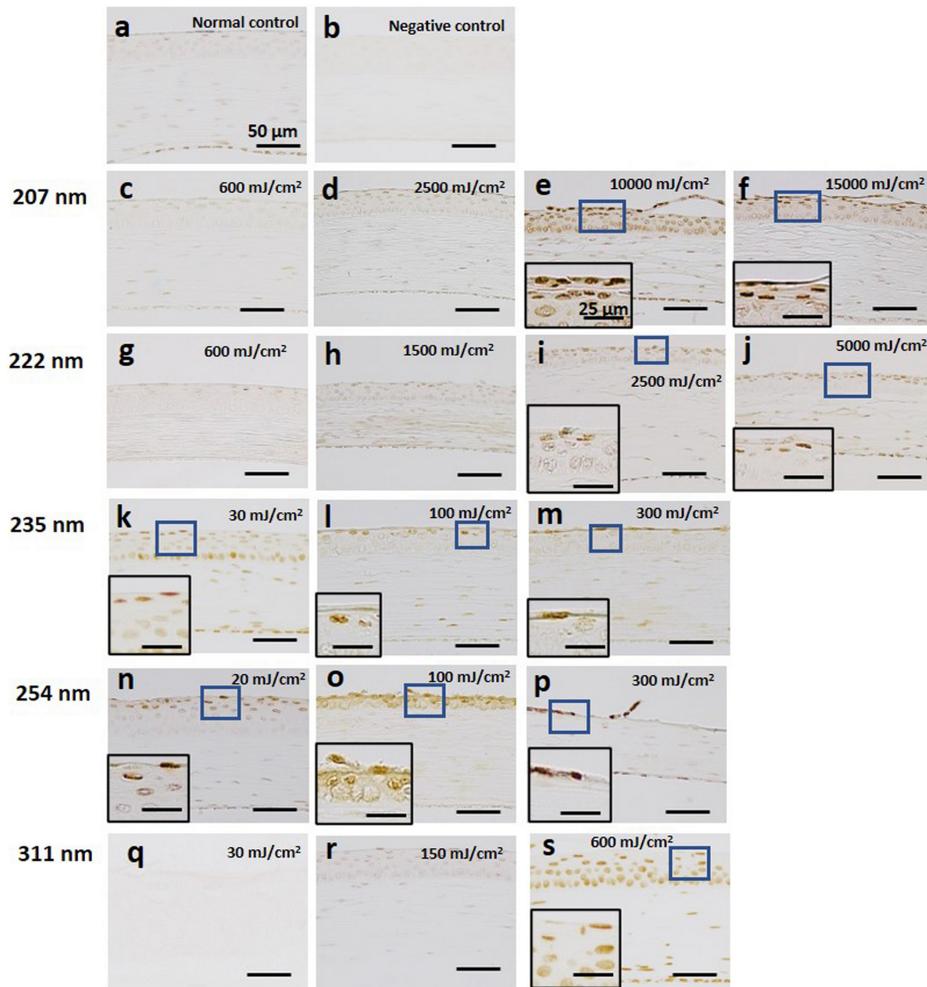


Figura 4.23: Evaluación de la presencia de células con CPD en las córneas mediante tinción. Escala = 50 μm y 25 μm en imágenes aumentadas.

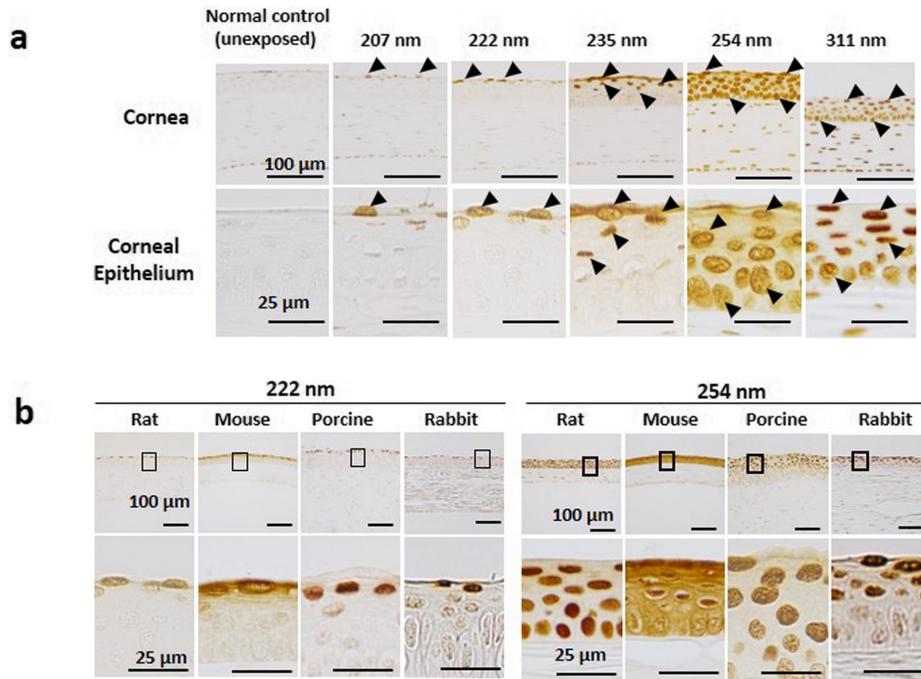


Figura 4.24: Evaluación de la presencia de células con CPDs. Enucleación inmediata tras la exposición 600 mJ/cm^2 de cada longitud de onda.

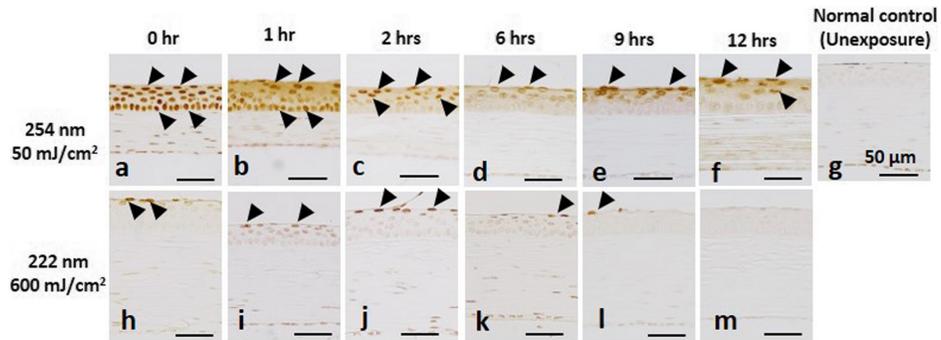


Figura 4.25: Evolución de la presencia de células con CPDs en córneas. Las córneas fueron enucleadas 0, 0,5 1, 2, 4, 6, 9 y 12 horas tras la exposición. Exposiciones de 600 mJ/cm^2 luz 222 y 50 mJ/cm^2 254 nm.

Capítulo 5

Uso práctico de la esterilización UV

La instalación de luz UV-C como herramienta germicida ha sido propuesta en el parlamento británico y por una asesoría del gobierno escocés, a través de Ewan Eadie y Kenneth Wood [39]. Esta se basa en una luz UV-C 254 nm en la parte superior de una habitación, de forma que no incida en la piel u ojos de las personas en ella (Figura 5.1). Con este método se permite la descontaminación del aire en espacios con bajos cambios de aire por hora.

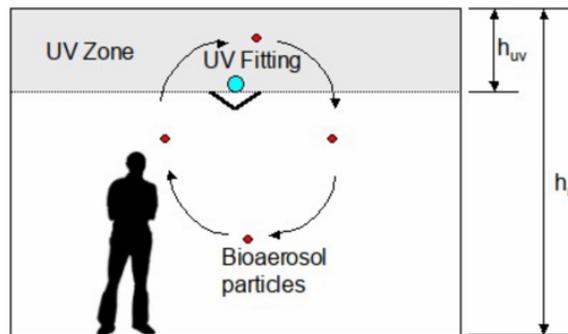


Figura 5.1: Esquema de funcionamiento de lámpara UVC en la parte superior de la habitación. h_{UV} y h_r altura de la zona irradiada por UV y de la habitación respectivamente, en metros.

Este método ha resultado efectivo en epidemias anteriores. En la pandemia de gripe de 1957, el porcentaje de infecciones en hospitales con una instalación de lámparas UV en la parte superior de la sala fue de 1.9 %, mientras que en hospitales sin esta instalación fue de 18.9 %. En la epidemia de sarampión entre 1937 y 1941 en Filadelfia, la tasa de infección media en alumnos sin la instalación fue de 53.6 %, que descendía a 13.3 % en las clases con instalación.

Según algunos estudios, el uso de esta técnica junto a otras como ionizadores negativos de aire o mezcla de aire prevendría la transmisión de tuberculosis (Ver referencias en [39]).

Con respecto al coronavirus SARS-CoV-2, se ha realizado un estudio numérico con el fin de calcular la irradiación necesaria para desinfectar una sala de dimensiones $4.2 \times 4.2 \times 2.5$ m [40]. Definiendo Z como la constante de susceptibilidad del virus a la radiación UV en una superficie o líquido, $Z_{ur} = Z * c_{ur}$ es la constante de susceptibilidad multiplicado por un factor de corrección para que sea aplicable a la suspensión:

$$Z = \frac{1}{H} * \ln(f) \quad (m^2/J) \quad (5.1)$$

Donde $H = E * t$ es la dosis de irradiación UV (J/m^2) y f es la fracción de supervivencia.

t_{UV} representa el tiempo medio que una partícula permanece en la zona irradiada por UV (Figura 5.1):

$$t_{UV} = t_{res} * \frac{h_{UV}}{h_r} = \frac{1}{n} * 3600 * \frac{h_{uv}}{h_r} \quad (5.2)$$

Donde n es la ventilación de la habitación en cambios de aire por hora.

Combinando 5.1 y 5.2 se obtiene el flujo de irradiación necesario E_r para obtener una fracción de supervivencia f_r :

$$E_r = -\frac{1}{Z_{ur} * t_{UV}} * \ln(f_r) \quad (5.3)$$

La desinfección se puede tratar como cambios de aire por hora adicionales:

$$k_{UV} = Z_{ur} * E * \frac{h_{UV}}{h_r} \quad (5.4)$$

Los autores recopilamos datos de diversos trabajos para diferentes especies de virus: SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, MERS-CoV y varias cepas de la in-

fluencia. Con ello se calculó un rango de posibles valores del coeficiente de corrección c_{ur} para el SARS-CoV-2, y en consecuencia, Z_{ur} .

Los autores remarcaron la susceptibilidad de SARS-CoV-2, mayor que las otras variantes, al ser expuesta a UV-C en superficies y líquidos. A su vez, la susceptibilidad en aerosoles es entre 1.8 y 6 veces mayor que en líquidos para radiación, encontrándose el valor de c_{ur} entre 0.167 y 0.545. En consecuencia, se obtuvo Z_{ur} en el rango 0.377 - 0.590 m^2/J .

En el estudio se decidió utilizar el valor 0.377 m^2/J y el valor 0.00377 m^2/J como caso de peor escenario. En la figura 5.2 se muestran los flujos de irradiación necesarios para obtener un 0%, 70% y 90% de inactivación para SARS-CoV-2 en el caso $Z_{ur} = 0.377$ y 0.0377 m^2/J , para diferentes cambios de aire por hora.

Ventilation rate (AC/h)	Average particle residence time in UV field. (min)	UV susceptibility constant, Z_{ur} (m^2/J)	Average irradiance required for 50% inactivation ($\mu W/cm^2$)	Average irradiance required for 70% inactivation ($\mu W/cm^2$)	Average irradiance required for 90% inactivation ($\mu W/cm^2$)
1	9.6	0.3770	0.319	0.554	1.060
2	4.8	0.3770	0.638	1.109	2.121
4	2.4	0.3770	1.277	2.218	4.241
6	1.6	0.3770	1.915	3.327	6.362
8	1.2	0.3770	2.554	4.436	8.482
1	9.6	0.0377	3.192	5.544	10.604
2	4.8	0.0377	6.384	11.088	21.207
4	2.4	0.0377	12.768	22.177	42.414
6	1.6	0.0377	19.152	33.266	63.621
8	1.2	0.0377	25.536	44.355	84.829

Figura 5.2: Predicción de flujos de irradiación.

Con los valores de susceptibilidad calculados, con un flujo de 10 $\mu W/cm^2$ se obtendría una inactivación mayor al 90%, incluso para ventilaciones de 8 AC/h, donde la partícula permanece menos tiempo en la zona UV. Siguiendo las guías actuales de instalación, una lámpara de 30 W cada 18.58 m^2 produciría un flujo de 50 $\mu W/cm^2$ que eliminaría mas del 90% en ambos casos. En este caso, $Z_{ur} = 0.377 m^2/J$ y 0.0377 m^2/J equivalen a 108.6 AC/h, y 10.9 AC/h respectivamente, siendo 6-12 AC/h la cantidad recomendada para desinfectar efectivamente el aire. Con 10 AC/h, se obtiene un 99% de la inactivación en 28 minutos, que disminuye a 6 minutos con 50 AC/h.

Finalmente, los autores de [39] recomendaron el uso de luz 222 nm mediante lámparas Kr-Cl, las cuales permitirían la iluminación de la sala completamente, descontaminando tanto el aire exhalado recientemente como las superficies. Sin embargo, se requieren previamente estudios de efectos a largos plazos, un aumento en la producción de lámparas, y una correcta regularización y estandarización de la tecnología. Actualmente se tiene una exposición límite diaria máxima en base a una exposición por accidente, no una exposición diaria normal. Los autores estimaron costes económicos de instalación son \$ 1000 cada 28 m^2 para la luz 254 nm, que asciende a \$1000- \$2800 cada 7 m^2 , para 222 nm.

Capítulo 6

Conclusiones

Los estudios indican que la luz UV-C lejana en el intervalo 200 - 230 nanómetros es una alternativa potencial como germicida. Según los resultados, una luz de 222 nanómetros emitida por una lámpara de excímeros Kr-Cl que produce una fluencia de 2 mJ/cm^2 inactivó más del 95 % del virus de influenza H1N1 en forma de aerosol [7]. Una fluencia de 1.7 y 1.2 mJ/cm^2 inactivaron el 99.9 % de los coronavirus alfa HCoV-229E y beta HCoV-OC43 en forma de aerosol, respectivamente [8]. Una irradiación de 3 mJ/cm^2 , obtenible en menos de un minuto, inactivó un 99.7 % de SARS-CoV-2 [15] en una superficie. Estos resultados indican que la luz 222 nm tendría un efecto germicida similar a la luz 254 nm. El efecto germicida de la región UV-C era previamente conocido, debido a la alta capacidad de absorción del ADN en esta región, con un pico en 260-265 nm.

Mientras que la luz tradicionalmente usada, 254 nm, es dañina igualmente para las células humanas, los resultados indican que la luz 222 nm sería inocua para los seres humanos. Una exposición de 10 días a 450 mJ/cm^2 no produjo anomalías visuales o histológicas en ratones [11]. Estos daños no aparecen en ratones con predisposición genética a desarrollar tumores [12], al ser expuestos de forma crónica durante 10 semanas, ni a dosis de 10000 mJ/cm^2 . En un estudio específico de los ojos, tampoco se encontraron daños a 600 mJ/cm^2 [16]. En un estudio posterior, se concluyó que se requerían exposiciones de 10000 mJ/cm^2 de luz 207 nm y 2500 mJ/cm^2 de luz 222 nm para observar formación de CPDs que permanecieran 24 horas tras la exposición [17].

Solo se encontraron 2 estudios en voluntarios. En [10], se encontró formación de eritemas con exposiciones a luz 222 nm sin filtrar de 40 mJ/cm^2 , y formación de CPDs con exposiciones de 63 y 101 mJ/cm^2 , en función del tipo

de piel. En contraste, en una exposición de 1500 mJ/cm^2 [14] luz principalmente 222 nm debidamente filtrada, no se encontraron efectos en la piel de un voluntario, incluso para estos valores, que se encuentran muy por encima de los valores necesarios para la desinfección.

Los resultados muestran la seguridad de la luz a exposiciones mucho mayores que el actual límite permitido por ICNIRP. Los diversos estudios propusieron respuestas a ello. Por una parte, la ausencia de un filtro que reduzca la emisión de longitudes mayores a 230 nanómetros explicaría la aparición de eritemas. Esta suposición es apoyada por la comparación de espectros en lámparas con o sin filtro [9], donde no se mostró aparición de dímeros con exposiciones de 150 mJ/cm^2 . Para una exposición de 500 mJ/cm^2 se obtuvo un porcentaje inducción de CPDs similar a una exposición de 23 mJ/cm^2 de luz 222 nm sin filtrar.

Otra de las propuestas para explicar la inocuidad es la alta capacidad de absorción de proteínas en el UV-C lejano. Las proteínas encontradas en la película lagrimal, citoplasma y la queratina tendrían un papel en la absorción de radiación cercana a 200 nanómetros, evitando una mayor penetración de esta. Este hecho, unido a la menor capacidad de absorción en el ADN, explicaría la menor aparición de CPDs en comparación con el UV-C convencional y el espectro UV-B, con mayor capacidad de penetración.

Una de las motivaciones del desarrollo de esta tecnología es ofrecer una alternativa al uso de antibióticos, debido a la aparición de bacterias resistentes a estos. Sin embargo, no se encontraron estudios relacionados con el desarrollo de resistencias al UV-C, recurriendo a cuestionar directamente a los autores. Según Buonnano, los virus solo pueden desarrollar resistencias al mutar en su replicación en la célula huésped, por lo que no podrían mutar debido a la luz UV-C, al ser irradiados en suspensión o en superficies (Conversación en privado). Según David Welch, la radiación UV-C provocaría daños no específicos, al contrario que los antibióticos, no pudiéndose adaptar a estos (Conversación en privado).

A nivel técnico, también se encontraron diversas cuestiones sobre la puesta en práctica. Las lámparas emisoras de estas longitudes producen ozono. [33] indicó que los niveles de producción son bajos para las exposiciones requeridas, pero se requieren estudios más detallados, en espacios de diferentes tamaños con distintos tipos de ventilación. Por otra parte, los resultados obtenidos en los trabajos previos se realizaron en laboratorios, con unas condiciones fijas: distancia limitada, luz perpendicular, sin partículas de suciedad que apantallen y una muestra totalmente expuesta, etc. En la práctica, estas condiciones varían, siendo necesario asegurar que la luz alcance todas las partes de la sala, sin que se produzcan sombras debido a personas, mobiliario u orificios en las paredes o suelo. Además, el medio afecta a la inactivación, debido a la posible reducción de la intensidad. Las partículas podrían actuar como escudos para los microbios, debido a la baja capacidad de penetración de las longitudes de onda en estos rangos.

Debido a la pandemia de Sars-CoV-2, este campo de investigación se está expandiendo rápidamente, pero se requieren más estudios de diferentes grupos con diferentes financiaciones. Con excepción de [4, 5, 9, 10], las lámparas de excímeros utilizadas en el resto de estudios experimentales relacionados con la longitud de onda 222 nm fueron cedidas por USHIO Inc. Los estudios [11, 12, 16, 17] fueron financiados por USHIO en forma de salario, lo cual podría suponer un conflicto de intereses. Progresivamente están surgiendo nuevas empresas dedicadas a la producción de lámparas de excímeros, lo cual puede dar lugar a un abaratamiento y disponibilidad mayores permitirán mayor cantidad de estudios.

Esta reciente línea de investigación requiere estudios más detallados y a largo plazo, pues uno de los objetivos es la instalación de estas en transportes y edificios públicos, donde la irradiación y exposición serían permanentes. De ser realmente inocua, esta implementación sería un gran avance en la salud pública, evitando la transmisión de patógenos que da lugar a epidemias, sin requerir el largo desarrollo de vacuna específica para cada cepa del virus. Esta rama de investigación tiene un futuro prometedor, mereciendo la pena seguir los avances y dándole a conocer a un público mayor.

Índice de figuras

1.1. Eficacia germicida de las longitudes de onda en el UV, relacionada con el daño en el ADN.	5
2.1. Estructura de la epidermis.	8
2.2. Formación de CPDs y 6-4 PP entre dos pirimidinas timinas. 6-4 PP une la cuarta y sexta posiciones, provocando una distorsión mayor.	9
2.3. Espectro de absorción de la luz UV para distintas proteínas [25]. Hay una mayor influencia en longitudes menores a 205 nm. Se observa un pico en el intervalo 190-200 nanómetros. . .	10
2.4. Estructura de la córnea.	11
3.1. Diagrama de energía de la formación del excímero $KrCl^*$. Los estados A y X son fundamentales mientras que los B,C y D son excitados.	15
3.2. Longitudes de las transiciones radiactivas en distintos excímeros.	16
3.3. Espectro de emisión de una lámpara de excímeros Kr-Cl sin filtrado.	16
4.1. Muerte celular de SARM y células humanas inducida por radiación UV.	19
4.2. Inducción de dímeros por ambas fuentes de luz UV-C.	20
4.3. Espectro de emisión en escala logarítmica. Irradiancia de 6.4 mW/cm^2	21
4.4. Eliminación del SARM expresado como fracción de supervivencia, en función de la fluencia, para luz 222 nm y 254 nm. .	24

4.5. Lesiones de ADN en la piel del dorso de los ratones.	24
4.6. Imagen fluorescente de células epiteliales infectadas con H1N1. En azul, mancha nuclear DAPI; en verde, Alexa Fluor-488. . .	25
4.7. Cuantificación de la eficacia antiviral de la luz 222 nm. Des- viación estándar referida a la repetición del estudio 2 veces. . .	26
4.8. Efectos de la irradiación diaria de 450 mJ/cm^2 durante 10 días, con luz UV-C 254 nm y 222 nm. Los daños se evaluaron inmediatamente después de la exposición.	28
4.9. Fotografías de parejas de ratones, de tipo natural y de tipo XPa, expuestos con las diferentes radiaciones.	30
4.10. Diferencia de hinchazón de orejas al usar el irradiador con 3 filtros (B), frente al irradiador de un filtro (A).	31
4.11. Resultados de la combinación de MCRT [34], coeficientes de absorción [35] y espectro de rendimiento [36].	33
4.12. Fracción de supervivencia en función de la dosis de luz UV 222 nm.	34
4.13. Infección de las células pulmonares por coronavirus estacional en forma de aerosol tras exposiciones de a) 0, (b) 0.5, (c) 1 o (d) 2 mJ/cm^2 de luz UV-C 222nm.	35
4.14. Espectros normalizados de la irradiancia efectiva.	38
4.15. Porcentaje de queratinocitos positivos en dímeros, en función de la exposición a la lámpara 222 nm, con filtro y sin filtro. . .	39
4.16. Comparación de la inducción de dímeros en lámpara 222 nm con filtro, sin filtro y lámpara de mercurio convencional 254 nm.	40
4.17. Distribución espectral normalizada.	42
4.18. Amarillamiento de la piel para distintas exposiciones de luz 222 nm. No se observó enrojecimiento para ninguna exposición.	43
4.19. Amarillamiento de la piel expuesta a 12000 mJ/cm^2 . Hay una caída en el amarillamiento al eliminar el estrato córneo.	43

4.20. Resultados del ratio de fluencia espectral relativo en la piel obtenido por el modelo MCRT. La luz de la lámpara UVC filtrada se representa en naranja . Los resultados del modelo de <i>Barnard et al.</i> [13] se representan en azul. Se representaron los valores en la epidermis y el estrato basal.	44
4.21. Representación de <i>LOAEL</i> , <i>NOAEL</i> y máximo permitido. . . .	46
4.22. Resultados de la tinción H & E. Escala = 50 μm y 25 μm en imágenes aumentadas.	49
4.23. Evaluación de la presencia de células con CPD en las córneas mediante tinción. Escala = 50 μm y 25 μm en imágenes aumentadas.	50
4.24. Evaluación de la presencia de células con CPDs. Enucleación inmediata tras la exposición 600 mJ/cm^2 de cada longitud de onda.	51
4.25. Evolución de la presencia de células con CPDs en córneas. Las córneas fueron enucleadas 0, 0,5 1, 2, 4, 6, 9 y 12 horas tras la exposición. Exposiciones de 600 mJ/cm^2 luz 222 y 50 mJ/cm^2 254 nm.	51
5.1. Esquema de funcionamiento de lámpara UVC en la parte superior de la habitación. h_{UV} y h_r altura de la zona irradiada por UV y de la habitación respectivamente, en metros.	52
5.2. Predicción de flujos de irradiación.	54

Bibliografía

- [1] Coohill TP. *Virus-cell interactions as probes for vacuum-ultraviolet radiation damage and repair*. Photochem Photobiol. 1986 Sep;44(3):359-63. doi: 10.1111/j.1751-1097.1986.tb04676.x. PMID: 3786457.
- [2] Kowalski, Wladyslaw(2009). *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*. 10.1007/978-3-642-01999-9_2
- [3] Coohill, Thomas & Sagripanti, Jose-Luis. (2008). *Overview of the Inactivation by 254 nm Ultraviolet Radiation of Bacteria with Particular Relevance to Biodefense*. Photochemistry and photobiology. 84. 1084-90. 10.1111/j.1751-1097.2008.00387.x.
- [4] Buonanno M, Randers-Pehrson G, Bigelow AW, Trivedi S, Lowy FD, Spotnitz HM, et al. (2013). *207-nm UV Light - A Promising Tool for Safe Low-Cost Reduction of Surgical Site Infections. I: In Vitro Studies..* PLoS ONE 8(10): e76968. doi.org/10.1371/journal.pone.0076968
- [5] Buonanno M, Stanislauskas M, Ponnaiya B, Bigelow AW, Randers-Pehrson G, Xu Y, et al. (2016). *207-nm UV Light—A Promising Tool for Safe Low-Cost Reduction of Surgical Site Infections. II: In-Vivo Safety Studies..* PLoS ONE 11(6): e0138418. doi.org/10.1371/journal.pone.0138418
- [6] Manuela Buonanno, Brian Ponnaiya, David Welch, Milda Stanislauskas, Gerhard Randers-Pehrson, Lubomir Smilenov, Franklin D. Lowy, David M. Owens, David J. Brenner. *Germicidal Efficacy and Mammalian Skin Safety of 222-nm UV Light*. Radiation Research, 187(4), 493-501, (22 February 2017) doi.org/10.1667/RR0010CC.1
- [7] Welch, D., Buonanno, M., Grilj, V. et al.. *Far-UVC light: A new tool to control the spread of airborne-mediated microbial diseases..* Sci Rep 8, 2752 (2018). doi./10.1038/s41598-018-21058-w
- [8] Buonanno, M., Welch, D., Shuryak, I. et al.. *Far-UVC light (222.nm) efficiently and safely inactivates airborne human coronaviruses..* Sci Rep 10, 10285 (2020). doi.org/10.1038/s41598-020-67211-2

- [9] Buonanno, M., Welch, D. and Brenner, D.J. (2021). *Exposure of Human Skin Models to KrCl Excimer Lamps: The Impact of Optical Filtering*. Photochem Photobiol. doi.org/10.1111/php.13383
- [10] Woods JA, Evans A, Forbes PD, Coates PJ, Gardner J, Valentine RM, Ibbotson SH, Ferguson J, Fricker C, Moseley H.. *The effect of 222-nm UVC phototesting on healthy volunteer skin: a pilot study*. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2015 May;31(3):159-66. doi:10.1111/phpp.12156. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25495690.
- [11] Narita K, Asano K, Morimoto Y, Igarashi T, Nakane A (2018). *Chronic irradiation with 222-nm UVC light induces neither DNA damage nor epidermal lesions in mouse skin, even at high doses*. PLoS ONE 13(7): e0201259. doi.org/10.1371/journal.pone.0201259
- [12] Yamano, N., Kunisada, M., Kaidzu, S., Sugihara, K., Nishiaki-Sawada, A., Ohashi, H., Yoshioka, A., Igarashi, T., Ohira, A., Tanito, M. and Nishigori, C. (2020). *Long-term Effects of 222-nm ultraviolet radiation C Sterilizing Lamps on Mice Susceptible to Ultraviolet Radiation*. Photochem Photobiol, **96**: 853-862. doi.org/10.1111/php.13269
- [13] Barnard, I.R.M., Eadie, E. and Wood, K. (2020). *Further evidence that far-UVC for disinfection is unlikely to cause erythema or pre-mutagenic DNA lesions in skin*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, **36**: 476-477. doi.org/10.1111/phpp.12580
- [14] Eadie, E., Barnard, I.M.R., Ibbotson, S.H. and Wood, K. (2021). *Extreme Exposure to Filtered Far-UVC: A Case Study*. Photochem Photobiol. https://doi.org/10.1111/php.13385
- [15] Hiroki Kitagawa, Toshihito Nomura, Tanuza Nazmul, Keitaro Omori, Norifumi Shigemoto, Takemasa Sakaguchi, Hiroki Ohge,. *Effectiveness of 222-nm ultraviolet light on disinfecting SARS-CoV-2 surface contamination*. American Journal of Infection Control, Volume 49, Issue 3, 2021, Pages 299-301, ISSN 0196-6553, https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.08.022.
- [16] Sachiko Kaidzu, Kazunobu Sugihara, Masahiro Sasaki, Aiko Nishiaki, Tatsushi Igarashi & Masaki Tanito (2019). *Evaluation of acute corneal damage induced by 222-nm and 254-nm ultraviolet light*

- in Sprague–Dawley rats*. Free Radical Research, 53:6, 611-617, DOI: 10.1080/10715762.2019.1603378
- [17] Kaidzu, S., Sugihara, K., Sasaki, M., Nishiaki, A., Ohashi, H., Igarashi, T. and Tanito, M. (2021). *Re-Evaluation of Rat Corneal Damage by Short-Wavelength UV Revealed Extremely Less Hazardous Property of Far-UV-C†*. Photochem Photobiol, **97**: 505-516. <https://doi.org/10.1111/php.13419>
- [18] D’Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. *UV Radiation and the Skin*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(6):12222-12248. <https://doi.org/10.3390/ijms140612222>
- [19] Leanne de Koning. *Chromatin assembly factors and heterochromatin organization during cell proliferation, tumorigenesis and in quiescence..* Cellular Biology. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2009. English. ⟨NNT : 2009PA066467⟩. ⟨tel-00814265⟩
- [20] Clancy, S. (2008). *DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity..* Nature Education (1):103
- [21] Calvin B. Coulter, Florence M. Stone, Elvin A. Kabat;. *THE STRUCTURE OF THE ULTRAVIOLET ABSORPTION SPECTRA OF CERTAIN PROTEINS AND AMINO ACIDS* . J Gen Physiol 20 May 1936; 19 (5): 739–752. doi: <https://doi.org/10.1085/jgp.19.5.739>
- [22] GOLDFARB AR, SAIDEL LJ.. *Ultraviolet absorption spectra of proteins..* Science. 1951 Aug 10;114(2954):156-7. doi: 10.1126/science.114.2954.156. PMID: 14866175.
- [23] John W. Preiss and Richard Setlow. *Spectra of Some Amino Acids, Peptides, Nucleic Acids, and Protein in the Vacuum Ultraviolet*. The Journal of Chemical Physics 25 , 138-141 (1956) <https://doi.org/10.1063/1.1742806>
- [24] ROSENHECK K, DOTY P.. *The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation..* roc Natl Acad Sci U S A. 1961;47(11):1775-1785. doi:10.1073/pnas.47.11.1775

- [25] Kreusch S, Schwedler S, Tautkus B, Cumme GA, Horn A.. *UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination..* Anal Biochem. 2003 Feb 15;313(2):208-15.doi:10.1016/s0003-2697(02)00460-8. PMID: 12605857.
- [26] René M. Werkmeister, Aneesh Alex, Semira Kaya, Angelika Unterhuber, Bernd Hofer, Jasmin Riedl, Michael Bronhagl, Martin Vietauer, Doreen Schmidl, Tilman Schmoll, Gerhard Garhöfer, Wolfgang Drexler, Rainer A. Leitgeb, Martin Groeschl, Leopold Schmetterer;. *Measurement of Tear Film Thickness Using Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography..* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013;54(8):5578-5583. doi: <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11920>.
- [27] Michalos P, Avila EN, Florakis GJ, Hersh PS. *Do human tears absorb ultraviolet light?.* CLAO J. 1994 Jul;20(3):192-3. doi: 10.1097/00140068-199407000-00012. PMID: 7955301
- [28] Yam JC, Kwok AK. *Conjunctival lesions in adults. Ultraviolet light and ocular diseases.* Int Ophthalmol. 2014 Apr;34(2):383-400. doi: 10.1007/s10792-013-9791-x. Epub 2013 May 31. PMID: 23722672.
- [29] Delic NC, Lyons JG, Di Girolamo N, Halliday GM. *Damaging Effects of Ultraviolet Radiation on the Cornea.* Photochem Photobiol. 2017 Jul;93(4):920-929. doi: 10.1111/php.12686. Epub 2017 Feb 28. PMID: 27935054.
- [30] Mallet JD, Rochette PJ. *Wavelength-dependent ultraviolet induction of cyclobutane pyrimidine dimers in the human cornea.* Photochem Photobiol Sci. 2013 Aug;12(8):1310-8. doi: 10.1039/c3pp25408a. PMID: 23364620.
- [31] Larbi Daho Bachir, Nadjet & Belasri, Ahmed. (2013). *A Simplified Numerical Study of the Kr/Cl₂ Plasma Chemistry in Dielectric Barrier Discharge..* Plasma Science and Technology. 15. 343. 10.1088/1009-0630/15/4/07.
- [32] Mikhail I Lomaev et al 2003. *Excilamps: efficient sources of spontaneous UV and VUV radiation.* Phys.-Usp. 46 193
- [33] Claus, H.(2021). *Ozone Generation by Ultraviolet Lamps†.* Photochem Photobiol, 97: 471-476. <https://doi.org/10.1111/php.13391>

- [34] Barnard IRM, Tierney P, Campbell CL, McMillan L, Moseley H, Eadie E, Brown CTA, Wood K.. *Quantifying Direct DNA Damage in the Basal Layer of Skin Exposed to UV Radiation from Sunbeds..* Photochem Photobiol. 2018 Sep;94(5):1017-1025. doi: 10.1111/php.12935. Epub 2018 Jun 26. PMID: 29752876.
- [35] van Gemert MJ, Jacques SL, Sterenborg HJ, Star WM.. *Skin optics..* IEEE Trans Biomed Eng. 1989 Dec;36(12):1146-54. doi: 10.1109/10.42108. PMID: 2606488.
- [36] Matsunaga T, Hieda K, Nikaido O.. *Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm..* Photochem Photobiol. 1991 Sep;54(3):403-10. doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02034.x. PMID: 1784641.
- [37] Christopher M. Walker and GwangPyo Ko. *Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols.* Environmental Science & Technology 2007 41 (15), 5460-5465 DOI: 10.1021/es070056u
- [38] Hickerson, R., Conneely, M., Hirata Tsutsumi, S., Wood, K., Jackson, D., Ibbotson, S. and Eadie, E. (2021). *Minimal, superficial DNA damage in human skin from filtered far-ultraviolet C..* Br J Dermatol. <https://doi.org/10.1111/bjd.19816>
- [39] Eadie, Ewan & Wood, Kenneth.(2020). *The Case for Ultraviolet Germicidal Irradiation (UVGI) - A summary report prepared at the request of a member of the UK parliament and a Scottish government advisor..* 10.13140/RG.2.2.29880.47369.
- [40] Beggs CB, Avital EJ.2020. *Upper-room ultraviolet air disinfection might help to reduce COVID-19 transmission in buildings: a feasibility study..* PeerJ 8:e10196 <https://doi.org/10.7717/peerj.10196>