



Escola de Camins
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports
UPC BARCELONATECH

Utilización de nanopartículas como símiles de virus para caracterizar la sorción en medio poroso

Trabajo realizado por:

Julia García Cueto

Dirigido por:

Paula Rodríguez Escales

Xavier Sánchez Vila

Máster en:

Ingeniería Ambiental

Barcelona, 11 de noviembre de 2020

Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

ÍNDICE

1.	RESUMEN	3
2.	INTRODUCCIÓN	4
2.1.	Justificación y alcance del proyecto	4
3.	ESTADO DEL ARTE	8
3.1.	Contaminación biológica: patógenos en el agua	8
3.1.1.	Los virus	8
3.1.2.	Características físicas de los virus	9
3.2.	Transporte de virus	11
3.3.	Nanopartículas como símiles de los virus	18
3.3.1.	Viabilidad del uso de nanopartículas como símiles de virus.....	19
3.4.	Determinación analítica de la concentración de partículas	20
4.	OBJETIVOS	25
4.1.	Objetivos generales.....	25
4.2.	Objetivos específicos.....	25
5.	METODOLOGÍA.....	27
5.1.	Revisión bibliográfica	27
5.2.	Diseño y parte experimental	27
5.2.1.	Materiales	27
5.2.2.	Proceso experimental	29
5.3.	Determinación analítica y análisis de datos	32
6.	RESULTADOS	39
6.1.	Resultados Citometría de flujo.....	39
6.2.	Resultados Microscopio de epifluorescencia.....	43
6.3.	Resultados Microscopio electrónico de barrido	46
7.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	48
7.1.	Comparación de los resultados de las distintas técnicas analíticas utilizadas.....	48
7.2.	Viabilidad del recubrimiento de partículas en los laboratorios de la UPC.....	54
7.3.	Procesos de sorción y formación de aglomeraciones: efecto del pH	54
7.3.1.	Efecto del pH en la sorción entre partículas y sedimentos y en la formación de aglomeraciones	57
8.	DISEÑO DE EXPERIMENTOS FUTUROS	60
9.	IMPACTO AMBIENTAL	62
10.	CONCLUSIONES	63
11.	AGRADECIMIENTOS.....	65
12.	BIBLIOGRAFÍA	66

1. RESUMEN

Disponer de un agua de consumo de calidad es muy importante para la salud. La fuente más abundante de agua dulce en el planeta Tierra son las aguas subterráneas, que en general tienen una calidad que las hace potables. Sin embargo, en ocasiones han estado contaminadas por la presencia de virus o de otros organismos patógenos y su consumo ha causado brotes epidémicos en diferentes zonas del mundo.

Este trabajo final de máster se centra en la contaminación causada por la presencia de virus en las aguas subterráneas. Para reducir la misma, es importante conocer los procesos de transporte de estos patógenos a través de un medio poroso. Por eso, el objetivo principal es estudiar los mecanismos de adsorción de los virus a los sedimentos de acuíferos y evaluar el efecto del pH sobre este proceso. Debido a la imposibilidad de trabajar con virus reales, se estudia el comportamiento de los mismos usando partículas recubiertas de proteína y se compara con partículas sin recubrimiento proteico.

Para ello, en primer lugar, se muestra una pequeña introducción para justificar el alcance del proyecto y, seguidamente, se describen aspectos teóricos sobre cómo son los virus, qué tipos hay, cuáles son los factores que afectan al transporte de los mismos a través del medio poroso y, finalmente, cómo deben ser las partículas que se utilizan para representar estos patógenos de la manera más realista posible.

En segundo lugar, se detalla toda la metodología seguida para alcanzar el objetivo del proyecto. Por un lado, se describen los materiales utilizados, es decir, el tipo de partículas, el tipo de proteínas y los sedimentos que representan el medio poroso, caracterizados mediante difracción de rayos X, y se describe el proceso experimental seguido en el laboratorio. Por otro lado, se explican las tres técnicas analíticas utilizadas para obtener los resultados: la citometría de flujo, el microscopio de epifluorescencia y el microscopio electrónico de barrido, y se muestra el conjunto de resultados obtenidos.

A partir de éstos, por un lado, se realiza una comparación entre las tres técnicas utilizadas para el recuento de partículas, concluyendo que la mejor de ellas es la citometría de flujo. Por otro lado, se discute la viabilidad del recubrimiento proteico de las microesferas, se analiza la adsorción que han presentado las partículas al sedimento y se comenta el efecto que ha tenido el pH en dicha adsorción. En general, se ha obtenido una adsorción de partículas sin recubrir del 80-95%, mientras que las recubiertas se han adsorbido entre un 40 y un 60%, aproximadamente. La dependencia del pH en la adsorción se ha observado en aquellas partículas con recubrimiento proteico, la cual ha disminuido al pasar de pH = 5 a pH = 7 y ha vuelto a aumentar a pH = 9, describiendo una curva en forma de parábola positiva. Sin embargo, la adsorción al sedimento de las partículas sin proteína en su superficie no se ha visto influenciada por el pH.

Finalmente, se describe el diseño de experimentos futuros para poder seguir con la investigación en el estudio del transporte de virus a través del medio poroso y se analiza el impacto ambiental, tanto negativo como positivo, que puede causar la realización de este trabajo, el cual se enmarca en una nueva línea de investigación del Grupo de Hidrología Subterránea (UPC – CSIC), financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Justificación y alcance del proyecto

De toda la superficie del planeta Tierra, un 70% está cubierta por agua y el 30% restante corresponde a los continentes. De ese 70% de agua, aproximadamente un 96,5% lo forman los océanos y los mares, mientras que tan sólo el 3,5 % corresponde a agua dulce. De esta fracción de agua dulce, un 20% es la que se encuentra como agua subterránea.

El agua dulce en el planeta es de vital importancia para la supervivencia de los seres vivos que lo habitan. Tener acceso a agua potable de calidad es fundamental para la salud, ya que es el agua que se consume, formando parte de la alimentación o parte de los usos domésticos, como la higiene personal.

Sin embargo, el cambio climático, cada vez más acelerado, tiene un efecto directo sobre la disponibilidad de los recursos hídricos, tanto en términos de calidad como de cantidad, mostrando así su efecto no sólo en el ámbito climático, sino con repercusiones globales. El aumento de la temperatura media del planeta y el cambio en el régimen de circulación atmosférica global se está manifestando en forma de sequías de mayor extensión y duración, y de inundaciones y tormentas más frecuentes e intensas. Estas inundaciones y tormentas contaminan los suministros de agua, ya que arrastran todo tipo de sedimentos y derrubios hacia los ríos, lagos y pozos. Además, el aumento de la población, especialmente en las ciudades y en las zonas de costa, y de la industrialización ejerce una mayor presión sobre las aguas, exigiendo unas aguas de calidad y unas necesidades de caudales crecientes a lo largo del tiempo. A su vez, este aumento, tanto de la población como de la industrialización, genera una gran cantidad de residuos que se deben gestionar y que representan una amenaza para la calidad de las masas de agua superficiales y subterráneas. Finalmente, el aumento de la población también implica una mayor necesidad de agua para el sector primario.

Uno de los principales recursos de agua dulce del planeta Tierra es el agua subterránea. Ésta tiene diferentes fines: mantiene el caudal base de los ríos, aflora como manantiales naturales o se puede extraer mediante captaciones para darle usos urbanos, agrícolas o industriales. Ya que estas aguas se utilizan en diferentes aplicaciones, o simplemente pasan a formar parte de otras masas de agua, es de vital importancia mantenerlas con una buena calidad, para así evitar la contaminación de ríos y mares y para que siga siendo un recurso hídrico aprovechable. No obstante, en la actualidad, la contaminación de las aguas subterráneas está aumentando en extensión debido a la combinación de vertidos urbanos e industriales, lixiviación de pesticidas y fertilizantes, fugas de tuberías y tanques de almacenamiento subterráneo, entre otras causas. Debido a todos estos factores, la contaminación de las aguas subterráneas puede manifestarse en forma de cambios químicos en su composición al presentar una elevada concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo), entre otros contaminantes, o en cambios biológicos al detectar la presencia de un conjunto de microorganismos patógenos.

Uno de los grupos de patógenos más frecuentes en las aguas contaminadas son los virus. El consumo de un agua contaminada por virus causa problemas de salud y enfermedades, como por ejemplo, gastroenteritis infantil severa por la presencia de rotavirus y de adenovirus (Pang et al., 2014). El *Cryptosporidium parvum*, un organismo patógeno acuático, también causa enfermedades gastrointestinales ligadas al consumo de agua (Pang et al., 2012). Además de estos problemas, la presencia de agentes infecciosos en las aguas también puede causar diarrea, hepatitis, fiebre tifoidea, cólera... (Organización Mundial de la Salud, 2018). La Organización

Mundial de la Salud ha evaluado recientemente que el agua potable contaminada provoca más de 500.000 muertes por diarrea al año (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Las aguas residuales son una de las principales fuentes de patógenos en las aguas subterráneas, ya sean 1) procedentes de fosas sépticas, todavía frecuentes en países desarrollados, 2) por ser vertidas al medio sin depurar, como por ejemplo en África y países en vías de desarrollo, y 3) por ser vertidas al medio, aunque previamente hayan sido depuradas en una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR). El agua residual depurada en una EDAR, en muchas ocasiones, se vierte a los ríos. Durante el proceso de depuración (típicamente compuesto de un tratamiento primario, físico-químico; seguido de un secundario, biológico) se consigue reducir notablemente el contenido de sólidos, de materia orgánica y de nutrientes presentes en el afluente; sin embargo, en relación con el contenido de patógenos presentes en el agua residual, no se alcanzan los mismos rendimientos de eliminación, a no ser que la EDAR disponga de un tratamiento terciario de desinfección, como la cloración (Metcalf & Eddy, 2014). En caso de que no haya un tratamiento terciario, las aguas depuradas vertidas a aguas continentales y los microorganismos que contienen podrían llegar a los acuíferos por infiltración a través de la zona vadosa.

Otra fuente de contaminación del agua subterránea por patógenos es el vertido directo de dicha agua residual, por ejemplo, por pérdidas en la red de alcantarillado. Dicha red, por donde circula el agua residual hasta llegar a la EDAR, se encuentra enterrada en el subsuelo. Debido a su ubicación, es posible que contamine las aguas subterráneas si presenta alguna fuga.

Además, la aportación directa de patógenos a los acuíferos también puede ser debida a la lixiviación de letrinas o a animales enfermos enterrados. Esta opción ocurre especialmente en países donde no existe un sistema general de depuración de aguas ni de control de animales muertos.

Existen varios casos de contaminación por patógenos de las aguas subterráneas en diferentes zonas del mundo. Por ejemplo, un estudio realizado en Kabwe, una ciudad del centro de Zambia, el año 2015 detectó la presencia de varias especies bacterianas repartidas en 22 pozos diferentes. Entre las bacterias detectadas se encontró *Bifidobacterium longum*, *Arcobacter butzleri*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Salmonella entérica*, entre otras, siendo la más común la especie *Citrobacter freundii* (Sorensen et al., 2015).

En ocasiones se suele relacionar la contaminación de las aguas y la transmisión de enfermedades a través de su uso con la pobreza de la zona correspondiente. Sin embargo, estos problemas también se dan en países desarrollados situados en Europa y América del Norte. Por ejemplo, en el año 2004 se registraron brotes epidémicos provocados por el patógeno *Cryptosporidium* en Estados Unidos y se detectó contaminación por *E. Coli* en el agua extraída de pozos situados en el estado de Ohio. Un caso similar ocurrió en Canadá también en 2004, al detectar la presencia de *E. Coli O157* y *Campylobacter* en las ciudades Walkerton y North Battleford, los cuales también causaron brotes epidémicos (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Otro caso más cercano es el detectado en el acuífero urbano poco profundo del Delta del río Besòs, en la ciudad de Sant Adrià del Besòs (Barcelona). En julio del año 2014 se estudió la presencia de patógenos microbianos en dichas aguas subterráneas, donde se detectaron virus y bacterias humanas, concretamente adenovirus humano y bacterias indicadoras fecales, como la *E. Coli* y los *enterococos* fecales (Jurado et al., 2019).

Para reducir la contaminación de las aguas subterráneas y, por lo tanto, las enfermedades causadas al consumirla, es necesario anticiparse a la presencia de virus en dichas aguas y protegerlas contra los patógenos, por lo que es importante conocer y predecir el transporte de los mismos en el medio poroso. Para ello, se han realizado experimentos en el laboratorio imitando las mismas condiciones que se encontrarían en la naturaleza (Pang et al., 2012, 2014; Sasidharan et al., 2017; Syngouna & Chrysikopoulos, 2016; Walshe et al., 2010). No obstante, trabajar con virus puede suponer un riesgo para la salud de las personas encargadas de realizar los experimentos. Por este motivo, para poder simular el transporte de virus se utilizan, como sustitutos de éstos, algún tipo de bacteriófago (Sasidharan et al., 2017; Syngouna & Chrysikopoulos, 2016; Walshe et al., 2010), es decir, aquellos virus que infectan exclusivamente a las bacterias, ya que se trata de un tipo de virus no patogénico y que no necesita de instalaciones especiales o de equipamiento de protección, como sí sería necesario si se trabajase con virus patógenos.

Las especies de bacteriófagos que se suelen utilizar en experimentos como sustitutos de los virus son, principalmente, el MS2, el PRD1 y el ϕ X174, ya que su estructura es similar a muchos virus entéricos humanos (Pang et al., 2009; Sasidharan et al., 2017). Un ejemplo de su utilización fue en el año 2009, cuando Gutierrez *et al.* publicaron un artículo en el que estudiaron la adsorción del rotavirus y del bacteriófago MS2 en fibra de vidrio recubierta con hematita. En los estudios de laboratorio que realizaron, observaron que la capacidad de adsorción difería entre el rotavirus y el MS2 en 4 – 5 órdenes de magnitud, ya que el rotavirus triplica el tamaño del MS2. Otros ejemplos de estudios con bacteriófagos, utilizados como sustitutos de virus, fueron los realizados por Syngouna y Chrysikopoulos (2016) y por Sasidharan *et al.* (2017).

Sin embargo, el uso de los bacteriófagos como sustitutos de los virus presenta una problemática: no pueden representar la amplia gama de virus patógenos existentes. Debido a que cada virus tiene unas características únicas (punto isoeléctrico, tamaño y forma) y puede mostrar diferentes comportamientos durante los procesos de retención y transporte en medios porosos, no se recomienda usar un solo bacteriófago como único modelo para determinar el comportamiento de los virus (Pang et al., 2014).

Debido a esto y como alternativa al uso de bacteriófagos, para mejorar la representación de los virus, también se pueden utilizar las nanopartículas como sustitutos de éstos (Pang et al., 2009). Las nanopartículas son partículas que presentan un diámetro medio en el rango de las decenas a centenas de nanómetros (nm). Las propiedades más importantes que determinan el comportamiento de los virus en las aguas subterráneas son el tamaño, la forma, la densidad y la carga superficial (Pang et al., 2009). Así pues, en cuanto a las tres primeras propiedades comentadas (tamaño, forma y densidad), las nanopartículas son fielmente representantes de los virus; en cambio, no presentan la misma carga superficial y, por lo tanto, no se fijan al medio poroso de la misma manera ni tienen el mismo comportamiento en el transporte (Pang et al., 2009, 2012).

Como se explica en el apartado 3.1.1 de manera más detallada, los virus presentan una cápside proteica que envuelve al ADN o ARN. Debido a esta morfología, la parte del virus que condiciona la interacción de éste con los sedimentos de los acuíferos es la proteína que forma dicha cápside, ya que es su parte más externa. Esta proteína está caracterizada por un punto isoeléctrico (valor de pH en el que la carga superficial neta es 0) que gobierna su interacción con el sedimento sólido mediante procesos de adsorción y, por lo tanto, de retención.

El uso de nanopartículas sin modificar no representa correctamente el proceso de adsorción del virus al medio, debido a que carecen de dicha cápside proteica y, por lo tanto, de la parte que permite la interacción de las partículas con los sedimentos. Esto se traduce en que los puntos isoeléctricos de las nanopartículas sin modificar y de los virus no son los mismos. Concretamente, los virus sí presentan punto isoeléctrico, mientras que las nanopartículas sin modificar no lo presentan. Por este motivo, la interacción de los virus con los sedimentos no se puede simular únicamente con nanopartículas sin modificar.

Para solucionar dicha problemática y así conseguir que las nanopartículas presenten un punto isoeléctrico similar al de los virus, se deben modificar las nanopartículas recubriendo su superficie con proteínas que presenten un punto isoeléctrico próximo al del virus que se quiere representar. Con esta modificación, Pang *et al.* (2009) demostraron que las nanopartículas de poliestireno carboxilado recubiertas mediante proteínas permitían obtener cargas superficiales muy similares entre las partículas y los virus, y que difería mucho de la carga superficial si dichas partículas no estaban recubiertas. Eso permitía una mejor reproducibilidad del comportamiento de los virus en los procesos de adsorción a los sedimentos de los acuíferos. Sin embargo, aunque se ha demostrado que las nanopartículas recubiertas con proteínas se pueden parecer a los virus, aún hay mucha incertidumbre asociada a este tema.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, este trabajo final de máster tiene como objetivo principal evaluar los procesos de sorción que se establecen entre los virus y el medio sólido (sedimentos) en distintas condiciones de pH, ya que la adsorción de virus al medio poroso de los acuíferos depende de las condiciones del medio acuoso, utilizando nanopartículas recubiertas de proteínas como símiles de virus. Para lograr este objetivo, se realiza un conjunto de experimentos *batch* considerando 1) el comportamiento de nanopartículas sin recubrir; 2) el comportamiento de nanopartículas con recubrimiento proteico realizado por profesionales y 3) el comportamiento de nanopartículas con recubrimiento proteico realizado por mí en el laboratorio de la universidad.

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación que el Grupo de Hidrología Subterránea de la UPC-CSIC está iniciando. Concretamente, el trabajo se engloba en el proyecto de la convocatoria Retos para la Sociedad “Atenuación natural de patógenos y contaminantes orgánicos en medio poroso durante operaciones de recarga gestionada de acuíferos” (MONOPOLIOS) financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-101990-B-I00).

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. Contaminación biológica: patógenos en el agua

3.1.1. Los virus

Los virus son partículas infecciosas de un tamaño entre 20 y 300 nm, normalmente, con una estructura muy sencilla: un ácido nucleico (ADN o ARN) envuelto de una cápside de proteínas (Negroni, 2007).

La parte central del virus donde se encuentra situado el ácido nucleico se conoce como nucleoide o genoma y, en función de la información genética que contenga, el ácido nucleico puede estar en forma lineal, circular o en segmentos. Además, en el ácido nucleico es donde reside la capacidad infecciosa del virus.

La cápside proteica y rígida tiene la función de proteger al ácido nucleico y de facilitar la adsorción del virus a la célula que infecta. Esta cápside está compuesta por múltiples copias de una proteína o de unas pocas proteínas diferentes (Lodish et al., 2000). Normalmente, los virus llevan enzimas asociadas a la cápside y algunos de ellos tienen una capa de lipoproteínas que cubre la cápside, procedente de las membranas celulares o citoplasmáticas de las células parasitadas. Aquellos virus que presentan dicha capa lipoproteica se denominan virus envueltos, mientras que los que no la tienen se conocen como virus desnudos (Negroni, 2007).

En el caso de los virus envueltos, la fijación a la célula que infectan no se realiza mediante la cápside, sino que se hace a partir de proyecciones o espículas de glicoproteínas que se encuentran en la envoltura de lipoproteína.

Las proteínas que forman la cápside son moléculas formadas por aminoácidos y éstos son moléculas orgánicas que presentan dos grupos funcionales: el grupo amino ($-NH_2$) y el grupo carboxilo ($-COOH$). Para los virus desnudos, los grupos funcionales de la cápside (grupo amino y carboxilo) determinan la carga superficial del virus, la cual depende del pH del medio y juega un papel importante en el proceso de adsorción.

Cada virus tiene un punto isoeléctrico diferente, el cual depende de la proteína que conforma su cápside. En la Tabla 1 se muestra algunos de los puntos isoeléctricos de algunas especies de virus.

Tabla 1: Puntos isoeléctricos de los virus (Kumar, 2020; Michen & Graule, 2010)

Virus	Punto isoeléctrico
Hepatitis A	2,8
Bacteriófago MS2	3,5 – 3,9
Adenovirus humano	4,5
Papilomavirus	5,0
Norovirus (Norwalk)	5,5 – 6,0
SARS-CoV-2	6,24

Cada proteína también tiene un punto isoeléctrico diferente, como se muestra en la Tabla 2. En función del virus que se quiera representar, la proteína elegida para recubrir las nanopartículas deberá tener un punto isoeléctrico similar al del virus en cuestión.

Tabla 2: Puntos isoelectrónicos de las proteínas (Pang et al., 2009, 2012; Vlasova & Saletsky, 2009)

Proteína	Punto isoelectrónico
α_1 – glicoproteína ácida	2,7
Biotina	3,5
α – caseína	4,6
Albúmina	4,7

Los virus no pueden multiplicarse por ellos mismos, sino que lo hacen en el interior de las células vivas de los organismos que infectan, conocidas como células huésped. De manera simplificada, el mecanismo de reproducción de los virus, conocido como replicación o copia, consiste en que éstos atacan a las células de otro organismo, introducen la información genética que contienen, producen muchas copias del virus y, cuando la célula ya está infectada, la abandonan.

Por lo general, los virus son inmóviles fuera del organismo hospedante al que han infectado. Por este motivo, necesitan la ayuda de otros organismos o del ambiente para poder dispersarse y transmitirse. Por ejemplo, los virus vegetales, aquellos que infectan a plantas, se transmiten mediante insectos, injertos de plantas infectadas o a partir de la dispersión de polen y semillas de plantas infectadas (Gergerich & Dolja, 2007). Otros virus se pueden transmitir a partir del contacto directo con secreciones o saliva de personas infectadas, a través de transfusiones o incluso mediante el contacto con objetos. Algunos, como el VIH o la Hepatitis B, se pueden transmitir al feto a través de la placenta si la madre es portadora.

La movilidad de los virus, por lo tanto, depende del agente que los pueda transportar, el cual se suele denominar vector de transmisión. Típicamente, los vectores más habituales de transmisión son el aire y el agua.

3.1.2. Características físicas de los virus

Existen millones de virus diferentes, todos ellos con formas y tamaños muy variados. En función de la disposición de la nucleocápside, conjunto del nucleoide y de la cápside, se diferencian cuatro simetrías: helicoidal, icosaédrica/esférica, binaria y compleja (Negroni, 2007).

La simetría helicoidal está presente en aquellos virus que tienen una nucleocápside en forma alargada y cilíndrica, la cual puede ser flexible o rígida. Los virus que presentan esta simetría y que infectan al ser humano son virus envueltos.

Los virus con simetría icosaédrica tienen la nucleocápside similar a un poliedro de veinte caras triangulares. En este caso, cada cara triangular del icosaedro está formado por tres subunidades de proteínas, haciendo que estos virus tengan una cápside formada por un total de 60 subunidades de proteínas (Lodish et al., 2000). No obstante, en algunos casos estos virus se asemejan a una forma esférica. Los virus icosaédricos pueden ser tanto desnudos como envueltos.

Por otro lado, la simetría binaria es aquella que está presente cuando los virus tienen las dos simetrías anteriores. Es decir, la zona de la cabeza tiene simetría icosaédrica, mientras que la cola tiene simetría helicoidal. En la Figura 1 se observa un virus con simetría binaria, la cual es característica de los bacteriófagos, aquellos virus que infectan únicamente a bacterias.

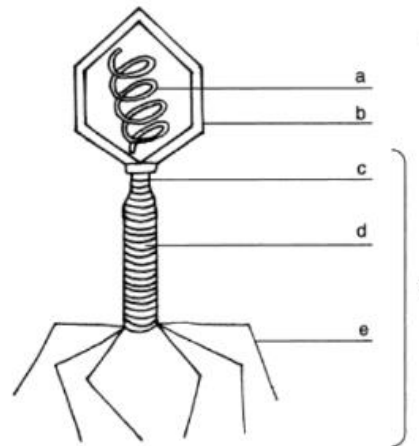


Figura 1: Bacteriófago. a: ADN; b: cabeza; c: cuello; d: vaina; e: fibras; f: el conjunto que conforma la cola (Negroni, 2007)

Finalmente, los virus de simetría compleja no tienen formas muy típicas, sino que suelen ser con forma ovoide o con diferentes formas. Sin embargo, en determinadas ocasiones se denomina simetría compleja a los bacteriófagos y a aquellos virus que presentan una parte con simetría helicoidal y otra con simetría icosaédrica, eliminando así la simetría binaria.

En la Figura 2 se observan las simetrías típicas que pueden presentar los virus.

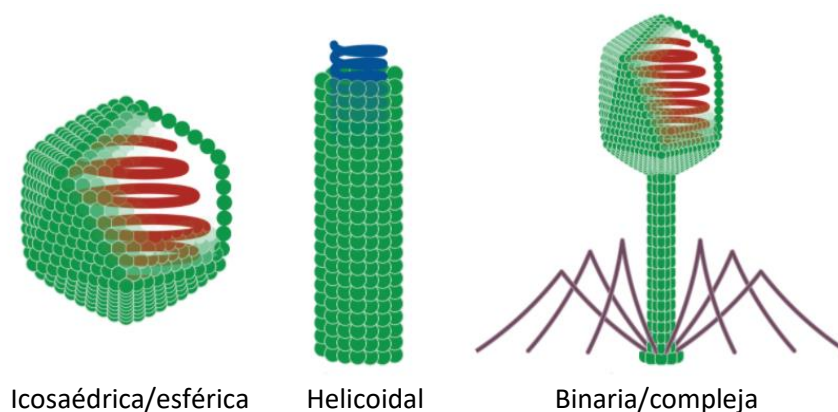


Figura 2: Simetrías icosaédrica/esférica, helicoidal y binaria/compleja de los virus (Khan Academy, 2020)

Dentro de su gran diversidad, los virus suelen tener un tamaño entre 20 y 300 nm, pese a que algunos pueden alcanzar los 1000 nm (por ejemplo, el virus helicoidal del Ébola). En la Tabla 3 se muestra un conjunto de virus con sus respectivos tamaños diametrales y simetrías.

Tabla 3: Tipos de virus, diámetro y simetrías correspondientes

Virus	Diámetro (nm)	Simetría	Referencia
Adenovirus	70 – 100	Icosaédrica/Esférica	(Espigares García, 2006)
Astrovirus	28 – 30	Estrella con 5-6 puntas (compleja)	(Espigares García, 2006)
Bacteriófago MS2	24 – 27	Icosaédrica/Esférica	(Pang et al., 2009)

Bacteriófago T4	Cabeza: 115 nm largo y 85 nm ancho Cola: 92,5 nm largo y 24 nm diámetro	Binaria/Compleja	(Yap & Rossmann, 2014)
Coronavirus	100 – 160	Icosaédrica/Esférica	(Ministerio de Sanidad, 2020)
Ébola virus	60 – 80	Helicoidal con 1000 – 14000 nm de longitud	(Ryu, 2017)
Enterovirus	27	Icosaédrica/Esférica	(Espigares García, 2006)
Hepatitis A	27	Icosaédrica/Esférica	(Espigares García, 2006)
Mimivirus	650	Icosaédrica/Esférica	(Suzan-Monti et al., 2006)
Norovirus	27 – 30	Contorno irregular (compleja)	(Espigares García, 2006)
Pandoravirus	1200	Ovalada (compleja)	(López-Goñi, 2015)
Papilomavirus	52 – 55	Icosaédrica/Esférica	(IARC, 2007)
Rotavirus	75	Icosaédrica/Esférica	(Espigares García, 2006)
Sapovirus	27 – 30	Contorno irregular (compleja)	(Espigares García, 2006)

Finalmente, otro tipo de clasificación que se puede realizar con los virus es en función del tipo de organismo al que infectan. De manera general, los virus pueden afectar a plantas, animales, seres humanos y microorganismos. Más concretamente, los viroides no poseen cápside ni envoltura y sólo afectan a plantas, mientras que los bacteriófagos sólo infectan a bacterias.

3.2. Transporte de virus

El transporte de virus a través del suelo hace que éstos acaben llegando a las aguas subterráneas, pudiendo causar enfermedades infecciosas debido a su consumo. Para controlar su presencia y evitar posibles epidemias, es importante conocer los factores que influyen en el transporte de virus (procesos de movimiento, adsorción y desactivación) a través del medio poroso. Por las características y el tamaño de los virus, éstos se comportan de modo similar a las partículas coloidales. Por lo tanto, su transporte está gobernado por la física coloidal, además de las características químicas de los virus, el sedimento y el agua subterránea, que caracterizarán las interacciones.

- Transporte coloidal y co-transporte de virus

Los coloides son partículas presentes en las aguas subterráneas con un diámetro entre 1 nm y 10 µm, formadas por materiales orgánicos o inorgánicos, como óxidos de hierro, fragmentos de roca o materia orgánica, entre otros. Los coloides son partículas de gran superficie y, por lo tanto, tienen una gran capacidad para adsorber especies que se encuentren disueltas en las aguas, de manera que pueden facilitar el transporte de contaminantes a través de las aguas subterráneas (Walshe et al., 2010).

Igual que los contaminantes (fundamentalmente metálicos, como por ejemplo, cadmio, cesio, plutonio, uranio...) se adsorben a los coloides y se transportan junto con éstos, los virus tienen

un comportamiento similar: los virus se asocian a los coloides, éstos se transportan por las aguas subterráneas y, por lo tanto, el transporte de virus se ve facilitado por la presencia de coloides en los acuíferos (Walshe et al., 2010). Sin embargo, hay ocasiones en que los coloides pueden dificultar el transporte de virus en medios porosos saturados de agua, dependiendo de las condiciones fisicoquímicas que se den en dichos medios, como la naturaleza química de los coloides o la carga superficial, el tamaño y el tipo de virus (Syngouna & Chrysikopoulos, 2016).

Los coloides también pueden facilitar que los virus recorran una mayor distancia dentro de los acuíferos, trasladándolos hasta puntos donde no sería esperable su presencia. El motivo es doble: en primer lugar, los virus, cuando se unen a los coloides, se encuentran protegidos de una inactivación rápida y esto provoca que aumente su tiempo de supervivencia. De esta manera, al permanecer activos durante más tiempo, la probabilidad de infección por el consumo de agua contaminada por virus aumenta, provocando un problema importante de salud pública. En segundo lugar, los coloides se transportan en el subsuelo a mayor velocidad que los solutos, arrastrando así de modo rápido cualquier elemento que lleve adsorbido (Walshe et al., 2010).

En un acuífero, los virus pueden encontrarse suspendidos en el agua, pueden estar unidos a un coloide que esté suspendido en ella, pueden unirse directamente al medio del acuífero o pueden unirse a coloides que previamente se hayan adsorbido a los sedimentos del acuífero. Algo similar ocurre con los coloides, los cuales pueden estar suspendidos en la fase acuosa o retenidos en el medio poroso (Katzourakis & Chrysikopoulos, 2014). En la Figura 3 se muestra la disposición esquemática de las seis concentraciones diferentes de virus y coloides que se pueden dar en un acuífero, donde los coloides están representados mediante arcillas.

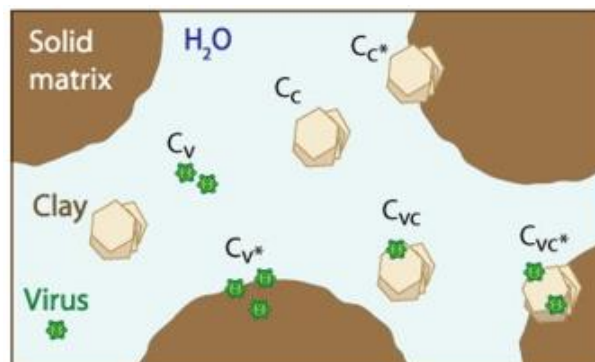


Figura 3: Esquema de concentraciones de virus y coloides presentes en un acuífero (Katzourakis & Chrysikopoulos, 2014)

La teoría de filtración coloidal permite predecir la deposición de partículas en medios porosos saturados. Por lo tanto, puede determinar cuantitativamente la unión de los coloides a los sedimentos del acuífero, mediante el cálculo de la eficiencia de colisión (α), un parámetro que indica la probabilidad de que una partícula suspendida colisione con el sedimento (Syngouna & Chrysikopoulos, 2016). Los virus pueden adsorberse a los coloides o a los sedimentos siguiendo unas ecuaciones cinéticas (de equilibrio reversible, no instantáneo).

Existen varios estudios en los que se investiga el co-transporte en acuíferos de virus en presencia de coloides. Un ejemplo es el realizado por Walshe *et al.* (2010), que estudiaron el efecto de los principales factores ambientales en dicho co-transporte. Los autores llegaron a la conclusión de que una alta velocidad del flujo de agua, un alto contenido de materia orgánica, un alto valor de pH y una baja fuerza iónica del medio favorecía el transporte de virus, concretamente del

bacteriófago MS2, en presencia de coloides minerales y que, por lo tanto, la adsorción del virus a los sedimentos de los acuíferos era menor en estas condiciones.

Por otro lado, Syngouna y Chrysikopoulos (2016) estudiaron el co-transporte de coloides de arcilla (caolinita y montmorillonita) y virus bacteriófagos (MS2 y ϕ X174) a través de columnas verticales saturadas de agua rellenas de perlas de vidrio. Los autores observaron que en función de la arcilla que formaba el coloide, de las características físicas del virus concreto (tamaño y forma) y de la dirección del flujo a través de la columna, el coloide obstaculizaba o facilitaba el transporte de virus a través del medio.

Teniendo en cuenta las seis maneras en las que se pueden encontrar los virus y los coloides en un acuífero (Figura 3), se han desarrollado un conjunto de modelos matemáticos que representan el co-transporte de coloides y virus en medios porosos con algunas pequeñas variantes. Uno de ellos es el de Katzourakis y Chrysikopoulos (2014), que formularon un modelo para medios tridimensionales, homogéneos y saturados de agua. A partir de él, y mediante la aplicación de datos experimentales previamente publicados, los autores concluyeron que dicho modelo permitía simular la mayoría de procesos fisicoquímicos que ocurren en el transporte simultáneo de virus y coloides a través de medios porosos.

- Propiedades geoquímicas del sedimento

El tipo de sedimento también afecta al transporte de virus. Los suelos que tienen una textura más fina tienden a retener y a adsorber más virus y con mayor facilidad, en comparación con los suelos de textura gruesa (Bosch et al., 2006). Esto se puede relacionar con la teoría general de filtración anteriormente comentada ya que, en función del tipo de sedimento que conforme el acuífero, las partículas suspendidas (los virus) tendrán una probabilidad mayor o menor de colisión con éstos.

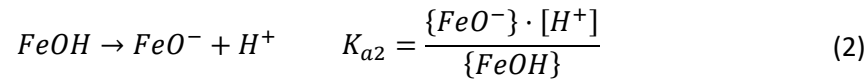
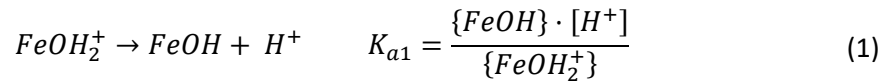
El concepto de textura, expresado en términos de radio y grosor de las partículas de sedimento, se puede relacionar con el de **superficie específica**. Concretamente, la superficie específica del sedimento aumenta al disminuir el tamaño de sus partículas (Gavande, 1968). Así pues, los sedimentos que tienen una textura fina presentan una mayor superficie específica que los sedimentos gruesos, aumentando la cantidad de virus adsorbidos.

De manera general, los suelos arenosos adsorben menos virus que los suelos arcillosos, ya que los primeros tienen una granulometría más gruesa que los segundos y mucha menor capacidad de adsorción. Concretamente, los suelos que tienen entre un 30 y un 100% de contenido en arcilla son excelentes adsorbentes de virus (Bosch et al., 2006). Por lo tanto, contra mayor material arcilloso contenga el suelo, más retención de virus se producirá, reduciendo su capacidad de transporte.

Además de la superficie específica de los sedimentos, **el potencial de carga** de la superficie también afecta al transporte de los virus. En función del tipo de mineral que forme el sedimento, su carga superficial tendrá un valor u otro, la cual depende del pH del medio. La carga superficial del virus también depende del pH del medio; así pues, los virus se retendrán mejor en aquellos sedimentos con los que tengan mejor afinidad eléctrica.

Un ejemplo de este comportamiento se muestra con los óxidos de hierro (FeO), uno de los óxidos más abundantes en la corteza terrestre, entre los cuales se encuentra la hematita (α -Fe₂O₃), la magnetita (Fe₃O₄) o la goethita (α -FeOOH). Estos minerales se pueden presentar tanto en forma de óxidos, como en forma de oxihidróxidos y óxidos hidratados (Acevedo-Sandoval et

al., 2004; Hernández & Meurer, 1997). Al reaccionar con el agua, la superficie se hidroxila y se producen hidróxidos de hierro ($Fe(OH)_n$). Si se define las ecuaciones de adsorción ácido – base de la siguiente manera (Stumm & Morgan, 1996):



y sabiendo que la carga superficial se puede calcular en función de la concentración de especies ácidas y básicas de óxidos presentes, tal que (Stumm & Morgan, 1996):

$$Q = \{FeOH_2^+\} - \{FeO^-\} \quad (3)$$

La ecuación que relaciona la carga superficial del suelo con el valor de pH es la siguiente:

$$Q = \frac{\{FeOH\} \cdot [H^+]}{K_{a1}} - \frac{K_{a2} \cdot \{FeOH\}}{[H^+]} \quad (4)$$

Donde:

- { }: concentración de especies superficiales (mol/kg). Es decir, los moles de especies superficiales por kilogramo de sólido adsorbente
- $[H^+]$: concentración de protones (mol/L)
- K_{a1} y K_{a2} : constantes de acidez
- Q: carga superficial (mol/kg). Multiplicando Q por la constante de Faraday (96480 C/mol) y dividiendo por el área superficial específica del óxido de hierro (m^2/kg), se puede obtener la carga superficial en unidades de C/m^2

Como se observa en la ecuación (4), de manera general se puede decir que la carga superficial de un sedimento formado por óxidos de hierro adquirirá un valor positivo cuando el medio sea ácido, mientras que dicho valor será negativo cuando el pH del medio tienda hacia valores básicos.

No obstante, los minerales presentan un punto de carga cero, es decir, un valor de pH donde la carga neta total es neutra (Tabla 4). Esto significa que cuando el pH del medio esté por debajo del punto de carga cero y, por lo tanto, sea más ácido que éste, el mineral tendrá una carga neta positiva. En cambio, cuando el valor del pH esté por encima del punto de carga cero y, por lo tanto, sea más básico que éste, la carga neta del mineral será negativa.

Tabla 4: Punto de carga cero de arcillas y óxidos e hidróxidos comunes del suelo (Appelo & Postma, 2005)

Minerales	Punto de carga cero
Caolinita	4,6
Montmorillonita	< 2,5
Corindón (α - Al_2O_3)	9,1
γ - Al_2O_3	8,5
α - $Al(OH)_3$	5,0
Hematita (α - Fe_2O_3)	8,5
Goethita (α - $FeOOH$)	9,3

Fe(OH)₃	8,5
Birnessita (δ-MnO₂)	2,2
Rutilo (TiO₂)	5,8
Cuarzo (SiO₂)	2,9
Calcita (CaCO₃)	9,5
Hidroxiapatita (Ca₅OH(PO₄)₃)	7,6

Como se observa, los óxidos de hierro tienen un punto de carga cero de 8,5 y 9,3. Esto hace que dichos óxidos, en las aguas subterráneas, presenten una carga neta positiva, ya que el pH en estas aguas es ligeramente más ácido que el punto de carga cero de estos minerales. Por el contrario, la birnessita tiene un punto de carga cero de 2,2, haciendo que este mineral presente carga neta negativa cuando forme parte del sedimento de los acuíferos, ya que el agua subterránea presenta un pH mucho más básico que su punto de carga cero.

Si el sedimento está formado por otro mineral, por ejemplo sílice, ocurrirá un comportamiento parecido: la superficie estará cargada positivamente a pH más ácidos que su punto de carga cero y negativamente a pH más básicos que su punto de carga cero (Aranberri & Bismarck, 2007). No obstante, para un mismo pH, el valor de la carga superficial cambiará, en comparación con un sedimento que contenga óxidos de hierro, ya que las constantes de acidez serán diferentes.

- Hidroquímica del agua
 - pH del medio

La carga superficial de los virus depende del pH del medio en el que se encuentran. Esta carga condiciona la movilidad de la partícula coloidal, gobernando su comportamiento en los procesos de sorción.

En la Figura 4 se muestra el estado de protonación de los grupos funcionales de una superficie proteica en función del pH. Como se puede observar, a un determinado pH la carga neta superficial es 0, haciendo que el valor de este pH reciba el nombre de punto isoeléctrico. Por debajo de este valor, es decir, a pH más ácidos, la carga neta de la superficie es positiva ya que, en un medio ácido, el grupo amino capta protones. En cambio, a pH más básicos (superiores al punto isoeléctrico), la carga neta de la superficie del virus es negativa, ya que los grupos carboxilos ceden sus protones.

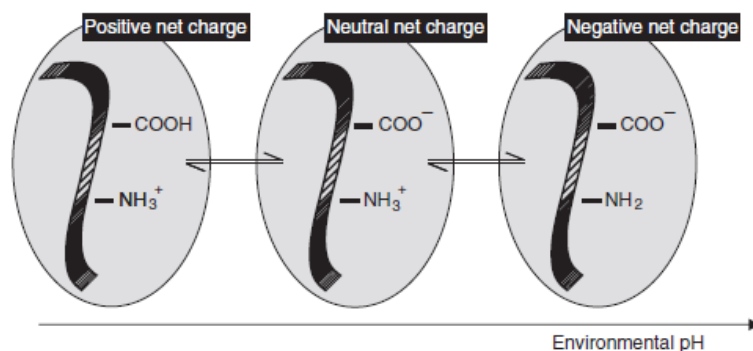


Figura 4: Esquema del estado de protonación de los grupos funcionales de una proteína en función del pH (Michen & Graule, 2010)

En consecuencia, en función del pH del medio, la carga neta superficial del virus será positiva, negativa o neutra, haciendo que su retención y adsorción al medio poroso sea mayor o menor, dependiendo de la carga que presente éste.

Debido al tamaño de las proteínas, sólo los aminoácidos más cercanos a la superficie del sedimento son los que quedan adsorbidos, haciendo que la proteína presente una orientación preferida al adsorberse a la superficie de un sólido cargado. Esto provoca que se distinga entre los aminoácidos en la cara adsorbente y los que quedan en el resto del volumen, haciendo que, en consecuencia, haya ecuaciones diferentes para relacionar el pH con la carga. Por un lado, la ecuación que define la carga neta de los aminoácidos adsorbidos al sólido es la siguiente (Hartvig et al., 2011):

$$Z_{Ads} = \sum_i^k \frac{10^{pK_{a_i}}}{10^{pH_S} + 10^{pK_{a_i}}} - \sum_j^l \frac{10^{pH_S}}{10^{pH_S} + 10^{pK_{a_j}}} \quad (5)$$

donde:

- Z_{Ads} : carga neta de los aminoácidos adsorbidos al sólido
- pK_{a_i} : valor de pKa de las cadenas laterales de los aminoácidos arginina, histidina, lisina y los extremos de la proteína que finalicen con un aminoácido que posee un grupo amino libre (extremo N-terminal)
- pK_{a_j} : valor de pKa de las cadenas laterales de los aminoácidos aspartato, glutamato, cisteína, tirosina y los extremos C-terminal, aquellos aminoácidos que poseen un grupo carboxilo terminal
- pH_S : pH en la superficie del sólido

Por otro lado, la ecuación que permite calcular la carga neta de toda la proteína adsorbida, teniendo en cuenta los aminoácidos en la superficie y los que quedan en el resto del volumen, es (Hartvig et al., 2011):

$$Z = \left(\sum_i^m \frac{10^{pK_{a_i}}}{10^{pH} + 10^{pK_{a_i}}} - \sum_j^n \frac{10^{pH}}{10^{pH} + 10^{pK_{a_j}}} \right) + Z_{Ads} \quad (6)$$

donde:

- Z : carga neta de la proteína adsorbida
- pH : pH en el resto del volumen de la suspensión

Como se observa en las ecuaciones anteriores, se diferencia entre el pH de la superficie del sólido cargado al que se va a adsorber la proteína y el pH del resto del volumen de la suspensión. El motivo es que la presencia de una superficie cargada puede alterar la distribución de los protones (H^+) en solución, modificando el pH de la siguiente manera (Hartvig et al., 2011):

$$pH_S = pH + 0,434 \frac{F \varphi_S}{RT} \quad (7)$$

donde:

- F : constante de Faraday (96480 C/mol)
- φ_S : potencial de superficie (J/C)
- R : constante de los gases ideales (8,314 J/mol·K)
- T : temperatura (K)

- Fuerza iónica

Este factor de influencia en el transporte de virus está de nuevo muy relacionado con el pH. Cuando la concentración de cationes en el suelo es elevada, su carga es positiva, haciendo que queden retenidos los virus que presenten una carga superficial negativa. En condiciones ambientales en los acuíferos (pH entre 6 y 8), los virus generalmente tienen carga neta negativa, ya que el punto isoeléctrico de éstos suele ser ácido, aunque hay alguno que excepcionalmente presenta el punto isoeléctrico cercano al neutro, como por ejemplo el poliovirus y el bacteriófago ϕ X174. Por encima de este valor de pH, la carga superficial neta del virus es negativa, de modo que éstos quedan retenidos en aquellas zonas donde el suelo tiene una elevada concentración de cationes y, por lo tanto, está cargado positivamente.

Además, la concentración de cationes presentes en el suelo favorece la adsorción de virus ya que reducen sus fuerzas repulsivas (Bosch et al., 2006). Por este motivo, si los cationes son proporcionados por el agua, en presencia de agua destilada la retención de los virus sería más baja, en comparación con un agua que contenga sales o iones. Por lo tanto, el agua con baja concentración de sales favorece el transporte de virus a través del suelo (Bosch et al., 2006). Así, por ejemplo, el agua de lluvia puede ser una causa de movilización súbita de virus.

- Materia orgánica soluble

La materia orgánica soluble que hay presente en el acuífero compite con los virus por los sitios de adsorción (Bosch et al., 2006), de manera que, si el contenido de materia orgánica es muy elevado, la retención de los virus será menor, favoreciendo así su transporte.

Walshe *et al.* (2010) estudiaron el co-transporte del bacteriófago MS2 con caolinita como coloide en acuíferos y observaron el efecto de la materia orgánica disuelta y de otros factores en dicho transporte. Tras la realización de experimentos en columna vieron que, al aumentar la presencia de materia orgánica disuelta, las concentraciones máximas de MS2 obtenidas en las curvas de llegada a un punto de control aumentaban y el valor α (eficiencia de colisión) disminuía. La eficiencia de colisión representa la unión del bacteriófago a los sedimentos del acuífero. Además, el transporte de caolinita mejoró en presencia de materia orgánica, traduciéndose así en un mayor transporte de coloides cuando la concentración de materia orgánica disuelta en el acuífero es mayor.

Así pues, mediante este estudio se demuestra que altas concentraciones de materia orgánica tienden a ocupar los sitios donde se pueden adsorber los virus, inhibiendo la sorción de éstos a los sedimentos de los acuíferos.

- Estado de saturación del agua

Que el medio poroso esté saturado o no saturado también afecta al transporte de los virus (Bosch et al., 2006). Por un lado, cuando el medio está saturado, todos sus poros están llenos de agua, de manera que se reduce el contacto entre el sedimento y el virus, haciendo que la adsorción sea menor y, por lo tanto, el transporte del virus aumente.

En cambio, en el caso de zona no saturada, el contacto entre el sedimento y el virus se da en mayor frecuencia, haciendo que se retengan más virus y, en consecuencia, el transporte de éstos sea menor.

Conociendo todos los factores que condicionan el transporte y la adsorción de los virus, se puede definir un modelo de transporte vertical de virus en medios porosos unidimensionales, homogéneos y no saturados que se rige por la siguiente ecuación diferencial (Sim & Chrysikopoulos, 2000):

$$\frac{\partial}{\partial t} [\theta_m C] + \rho \frac{\partial C^*}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial t} [\theta_m C^0] = \frac{\partial}{\partial z} \left[D_z \theta_m \frac{\partial C}{\partial z} \right] - \frac{\partial}{\partial z} [qC] - \lambda \theta_m C - \lambda^* \rho C^* - \lambda^0 \theta_m C^0 \quad (8)$$

Donde:

- C: concentración de virus en la fase líquida (kg/m³)
- C*: concentración de virus adsorbidos a la interfase líquido – sólido (-)
- C⁰: concentración de virus adsorbidos la interfase líquido – aire (kg/m³)
- q: descarga específica (m/s)
- Θ_m : contenido de humedad (-)
- λ , λ^* y λ^0 : coeficientes de inactivación (s⁻¹)
- ρ : densidad aparente del suelo (kg/m³)
- D_z : coeficiente de dispersión hidrodinámico (m²/s)

No obstante, para simplificar los cálculos y considerando que los poros están prácticamente saturados de agua, los términos que hacen referencia a la interfase líquido – aire se eliminan de la ecuación anterior, quedando de la siguiente manera:

$$\frac{\partial}{\partial t} [\theta_m C] + \rho \frac{\partial C^*}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[D_z \theta_m \frac{\partial C}{\partial z} \right] - \frac{\partial}{\partial z} [qC] - \lambda \theta_m C - \lambda^* \rho C^* \quad (9)$$

3.3. Nanopartículas como similares de los virus

Según la Comisión de la Unión Europea, un nanomaterial se describe como “un material fabricado o natural que posee partículas no unidas, agregadas o aglomeradas donde las dimensiones externas están entre 1 y 100 nm de tamaño”. En el caso de las nanopartículas, éstas son partículas que tienen las tres dimensiones externas en una escala de tamaño nanométrica, entre 1 y 1000 nm (Jeevanandam et al., 2018).

Existen diferentes tipos de nanopartículas y de nanomateriales, los cuales se pueden clasificar en cuatro grupos: composites, a base de carbono, de base inorgánica y de base orgánica (Jeevanandam et al., 2018). La diferencia principal entre los diferentes tipos comentados es el material con el que están formados.

Otra manera de clasificar las nanopartículas es en función de su origen: naturales o sintéticas (Jeevanandam et al., 2018). Las naturales están presentes en la Tierra y algunas se producen de manera natural, como por ejemplo durante las tormentas de arena, las erupciones volcánicas o los incendios forestales. Otras, en cambio, se pueden encontrar en los cuerpos de diferentes organismos o a través de especies biológicas, como los virus. En el caso de las nanopartículas sintéticas, éstas son aquellas que se sintetizan mediante métodos físicos, químicos, biológicos o híbridos, para que así adquieran las propiedades deseadas para su aplicación.

A continuación, se detalla cómo se llegó a la conclusión de que las nanopartículas debían estar recubiertas con proteínas para poder representar correctamente el comportamiento de los virus en medios porosos.

3.3.1. Viabilidad del uso de nanopartículas como símiles de virus

Actualmente, las nanopartículas se están produciendo en grandes cantidades a nivel industrial y se están utilizando en varias aplicaciones a lo largo de numerosos procesos industriales. Debido a esto, es decir, a su producción, uso y eliminación, las nanopartículas acaban llegando al medio ambiente, contaminando suelos, aguas subterráneas y superficiales y seres vivos. Por este motivo es de vital importancia conocer el transporte y el destino final de dichas partículas a través del medio parcialmente saturado o, lo que es lo mismo, a través de la zona vadosa, la región situada entre la superficie del suelo y los acuíferos.

Para ello, varios autores como Yechezkel, Dror y Berkowitz (2016) o Mahdi *et al.* (2018) realizaron experimentos en columnas empaquetadas con arena u otro tipo de sedimento, de manera que permitían simular el medio poroso parcial o totalmente saturado. A través de estas columnas hacían pasar diferentes tipos de nanopartículas, como nanopartículas de oro, de plata y de diferentes óxidos, como el óxido de zinc. Mediante estos experimentos, los investigadores pudieron comprobar de qué depende la movilidad de las nanopartículas a través de los distintos materiales usados en el empaquetado de las columnas. En estos casos en concreto, los factores que más afectaban a la retención y transporte de las nanopartículas fueron la textura del sedimento utilizado en la columna, la carga superficial de las nanopartículas y el contenido de materia orgánica presente en el medio.

Sin embargo, actualmente son pocas las investigaciones realizadas sobre el transporte de los virus en el medio poroso a través del uso de nanopartículas. Únicamente autores como Pang *et al.* (2009, 2012, 2014) utilizan nanopartículas del tamaño de los virus y las recubren de proteínas para representar su carga superficial y, por lo tanto, simular más cuidadosamente su transporte.

En estos artículos, los autores demuestran que las nanopartículas sin recubrir tienen un potencial zeta, es decir, una carga superficial, en función del pH, muy diferente a los virus y que, en cambio, dicho potencial zeta se aproxima más al de los virus si las nanopartículas están recubiertas con una proteína que tenga un punto isoeléctrico similar al del virus que representa. En la Figura 5 se puede observar dicho comportamiento.

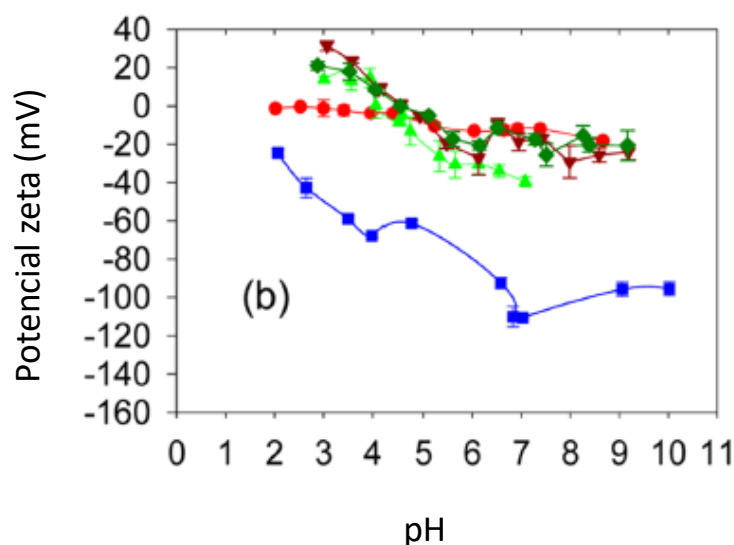


Figura 5: Potencial zeta de partículas y biomoléculas medido en 1 mM de electrolito NaCl: microesferas recubiertas con biotina (verde claro), microesferas recubiertas con NH₂-biotina (verde oscuro), microesferas recubiertas con glicoproteína (marrón), virus *C. Parvum* no activado (rojo) y microesferas sin recubrir (azul). (Pang et al., 2012)

Además, realizando experimentos de columna también pudieron corroborar la idea de que las nanopartículas debían ir recubiertas de proteínas para poder representar los virus. Estos experimentos consisten en introducir una solución acuosa con una concentración de partículas conocida a través de una columna que contenga sedimentos y determinar la concentración de soluto obtenido en el efluente. En la Figura 6 se muestra la curva característica obtenida después de realizar el experimento de columna, denominada *Curva de Llegada* o *curva BTC (Breakthrough Curve)*, donde se observa que la curva azul, muy diferente a las demás, es la que se obtiene al introducir por la columna nanopartículas sin recubrir.

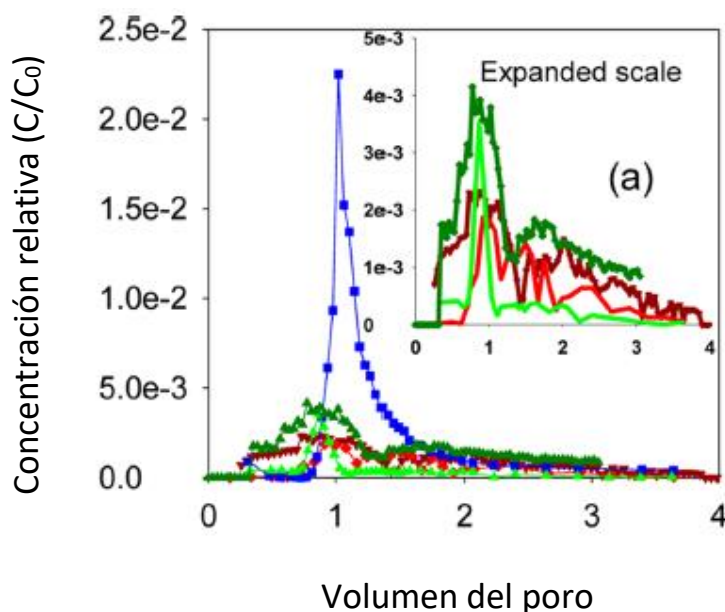


Figura 6: BTC del virus *C. Parvum* no activado (rojo), microesferas no recubiertas (azul), microesferas recubiertas de biotina (verde claro), microesferas recubiertas de NH_2 -biotina (verde oscuro) y microesferas recubiertas de glicoproteína (marrón). (Pang et al., 2012)

3.4. Determinación analítica de la concentración de partículas

Para determinar la concentración de partículas en una suspensión existen diferentes técnicas. Por un lado, se encuentran las técnicas de conteo de partículas automático, como la citometría de flujo y la espectrofluorometría; y, por otro lado, también hay técnicas de conteo manual, como el microscopio de epifluorescencia o el microscopio electrónico, tanto de transmisión (TEM) como de barrido (SEM). No obstante, mediante la utilización de sistemas de procesamiento de imágenes, el conteo mediante microscopios se puede semi-automatizar.

A lo largo de este trabajo, para conocer la concentración de partículas en una suspensión después de realizar los experimentos, se utilizan varias técnicas, con el objetivo de hacer una comparación entre ellas y determinar las ventajas e inconvenientes que puede tener cada una en el conteo de partículas, para así poder decidir cuál es la más viable. Las técnicas utilizadas son la citometría de flujo, el microscopio de epifluorescencia y el microscopio electrónico de barrido, las cuales se describen a continuación.

- Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica analítica que proporciona un análisis multiparamétrico y se utiliza para realizar el recuento y clasificación de células y partículas, que se encuentran suspendidas en una solución, en función de su tamaño y fluorescencia (Thermo Scientific, 2020).

Para ello, el equipo utilizado en citometría de flujo, un citómetro, consta de: 1) un sistema de fluidos, en el que se sitúa la muestra que se quiere analizar; 2) el láser, que es la fuente de luz; 3) los ópticos, que reúnen la dispersión y la fluorescencia resultante de la interacción entre las partículas y el láser y la direccionan hacia los detectores; 4) los detectores, los cuales reciben la luz dispersada o la luz fluorescente emitida por las partículas y 5) un sistema electrónico, para convertir las señales de los detectores en información digital. En la Figura 7 se puede observar un esquema de dicho equipo.

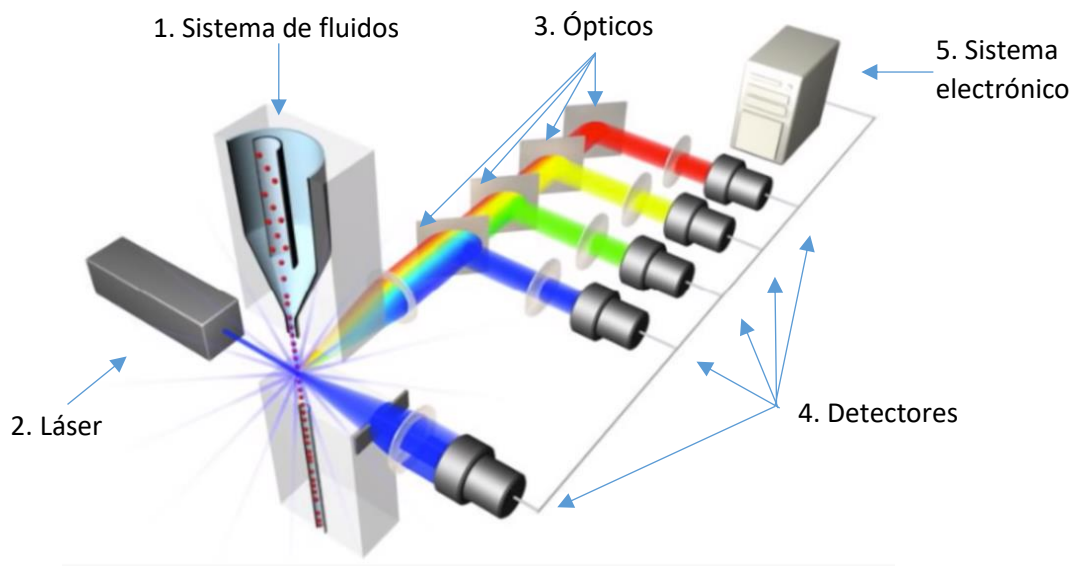


Figura 7: Esquema de un citómetro (Thermo Scientific, 2020)

Para realizar el recuento de partículas presentes en una solución, ésta se inyecta en el citómetro mediante el sistema de fluidos y las partículas intersecan con el láser. Es importante que, para tener un buen recuento de partículas, éstas pasen a través del láser una a una.

Una vez la partícula o célula interacciona con el láser, ésta refracta o dispersa la luz en todos los ángulos y direcciones. El citómetro consta de varios detectores situados en dos posiciones diferentes para medir la dispersión de la luz en dos direcciones distintas: unos están situados en la dirección de avance del láser, que miden la dispersión hacia adelante (FS), y otros están situados a 90° respecto al láser, que miden la dispersión lateral (SS). La intensidad detectada por los primeros se relaciona con el tamaño de las partículas, mientras que la intensidad que detectan los segundos permite conocer la estructura y complejidad de las partículas (McKinnon, 2018).

Así pues, aquella luz dispersada en la misma dirección y sentido que el láser o con un ángulo de dispersión muy bajo se conoce como dispersión frontal, la cual es grabada y cuantificada por los detectores FS, convirtiendo la intensidad de la luz en voltaje. La magnitud de la dispersión frontal es proporcional al **tamaño de la partícula**, de manera que las partículas y células pequeñas producen pequeñas cantidades de dispersión frontal y, por lo tanto, pequeños pulsos de voltaje; mientras que las partículas de mayor tamaño producen más intensidad de dispersión frontal y, consecuentemente, un mayor pulso de voltaje (Thermo Scientific, 2020).

Por otro lado, el paso de las partículas y células a través del láser, además de dispersar la luz, provoca la emisión de luz fluorescente, la cual va en la misma dirección y sentido que la señal de dispersión lateral. Esta luz fluorescente va direccionada hacia un conjunto de filtros y espejos que, en función de la longitud de onda de la luz, se desvía hacia los detectores correspondientes. En estos detectores, la señal de fluorescencia también se traduce en pulsos de voltaje, proporcionales a la cantidad de **fluorescencia** emitida (Thermo Scientific, 2020).

Los pulsos de voltaje obtenidos, tanto para conocer el tamaño de las partículas como para saber su fluorescencia, se envían al ordenador y es aquí donde se obtienen los resultados en forma de histogramas.

Los gráficos proporcionados por el ordenador permiten comparar, por un lado, el tamaño de las partículas con su complejidad y, por otro, el tamaño de las partículas con su fluorescencia. A continuación, se muestran dos ejemplos de dichos gráficos.

En la Figura 8a) se compara el tamaño (eje X) y la estructura (eje Y) de dos partículas de diámetro diferente, concretamente de 0,5 y 1 μm . Por un lado, cuanto más a la derecha del eje X se encuentre la zona sombreada en color rojo, más grande es la partícula. En cambio, cuanto más a la izquierda de este mismo eje esté la mancha roja, más pequeña es la partícula.

Por otro lado, si la mancha roja se sitúa en la parte superior del eje Y se considera que la partícula es más compleja que si estuviera situada en la parte inferior de dicho eje. La zona sombreada en color rojo representa el pico más alto del histograma obtenido.

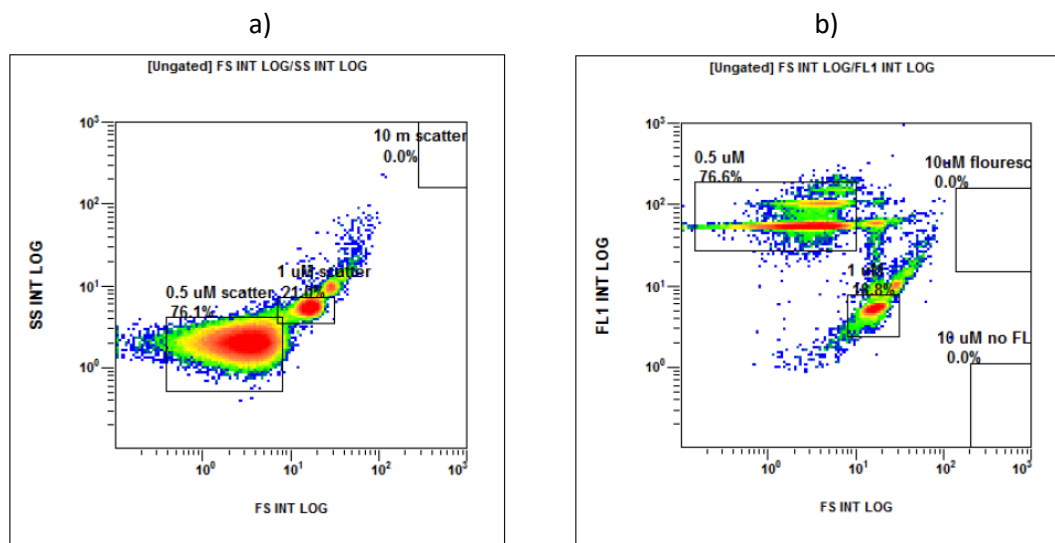


Figura 8: Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo, a) histograma tamaño *versus* estructura, b) histograma tamaño *versus* fluorescencia

En la Figura 8b) se compara el tamaño de las partículas (eje X) frente a la fluorescencia de éstas (eje Y). En este caso, si el pico del histograma está situado en la parte superior del eje Y, mayor fluorescencia presentan las partículas. En cambio, la fluorescencia de éstas será menor si el pico del histograma se sitúa en la parte inferior del eje Y.

En este ejemplo en concreto, se puede comprobar que las partículas de 1 μm de diámetro son más grandes que las de 0,5 μm , ya que las primeras se encuentran más a la derecha en el eje X que las segundas. Además, en la Figura 8a) se ve cómo las partículas de 1 μm son un poco más complejas que las de 0,5 μm y en la Figura 8b) se observa como las partículas de 0,5 μm presentan una fluorescencia mayor que las partículas de 1 μm , debido a que las primeras se

sitúan en la parte superior del eje Y, mientras que las segundas tienden a encontrarse por la parte inferior del mismo eje.

La citometría de flujo permite detectar partículas que tengan un diámetro entre 1 y 15 micrómetros, siendo el límite mínimo de detección de 0,5 μm y el máximo de 100 μm , ya que mediante el uso de sistemas especializados se pueden detectar partículas que presenten un tamaño fuera del rango habitual de detección comentado (Thermo Scientific, 2020). Además, para realizar un buen recuento, la concentración óptima que debe tener la solución a analizar se encuentra entre 10^6 y 10^7 partículas/mL.

Como toda técnica analítica, la citometría de flujo presenta unas ventajas y unos inconvenientes. Por un lado, la rápida velocidad de contaje, los miles de partículas y células que puede contar y el análisis multiparamétrico que permite relacionar diferentes aspectos de las partículas analizadas son sólo unas de las ventajas que tiene dicha técnica. En cambio, uno de los inconvenientes es que los resultados se obtienen en forma de histograma, con lo que la información es semicuantitativa.

Finalmente, la citometría de flujo presenta un rango amplio de aplicaciones en diferentes disciplinas, entre las que se encuentra la inmunología, virología, biología del cáncer, monitoreo de enfermedades infecciosas, conteo de células, entre otras (McKinnon, 2018).

- Microscopio de epifluorescencia

El microscopio de epifluorescencia consiste en un microscopio óptico, con la diferencia respecto al microscopio convencional de que la luz no atraviesa la muestra, sino que la ilumina y se recibe la luz que emite.

La fluorescencia es la interacción entre la radiación y la materia, en la que la muestra estudiada absorbe dicha radiación. Esto provoca la excitación de los electrones, que hace que pasen a un estado de excitación con un mayor contenido de energía y, pasado un determinado tiempo, dichos electrones se sitúan en un estado de excitación con menor energía, ya que parte de ésta se ha disipado. Posteriormente, los electrones vuelven a su estado fundamental, emitiendo luz de menor energía y mayor longitud de onda que la de la radiación que han absorbido.

Es por esto que toda molécula fluorescente presenta una longitud de onda de excitación y una de emisión, siendo, generalmente, la primera menor que la segunda (Sanderson et al., 2014).

El funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia consiste en introducir un haz de luz de alta intensidad formado con diferentes longitudes de onda, es decir, en un espectro que va desde el visible hasta el ultravioleta. La luz pasa por un filtro donde se selecciona la longitud de onda que es capaz de excitar la muestra (longitud de onda de excitación). Esta luz con esta longitud de onda seleccionada es reflejada por un espejo dicroico e incide sobre la muestra, excitándola. Al excitarse, tal y como se ha explicado anteriormente, la muestra emite luz a una longitud de onda mayor, la cual es transmitida por el espejo dicroico y después pasa por otro filtro (Sanderson et al., 2014). A este filtro pueden llegar varias luces de excitación reflejadas, pero únicamente se deja pasar la luz emitida por las moléculas fluorescentes de la muestra (luz con longitud de onda de emisión), de manera que es la única que se observa. Pasado este último filtro, la luz emitida ya se puede detectar y así es posible observar la muestra. En la Figura 9 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia.

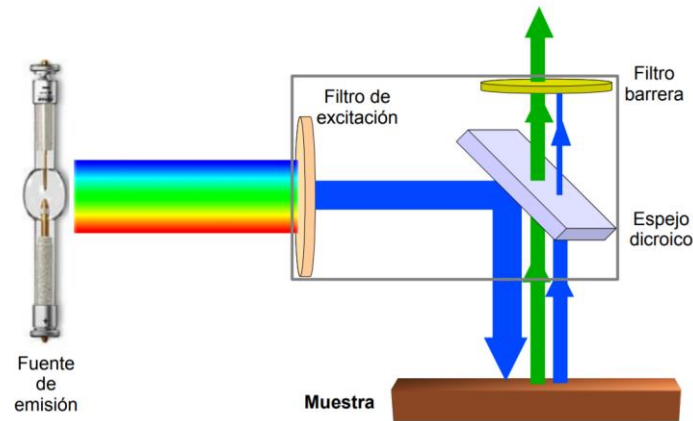


Figura 9: Esquema del funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia (Universidad de Alicante, 2011)

El microscopio de epifluorescencia no es capaz de detectar partículas nanométricas, sino que necesita que tengan un tamaño mayor, situado en el orden de los micrómetros.

- Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscope*) está formado por un cañón electrónico, situado en la columna del microscopio, donde se genera un haz de electrones de alta energía que se focaliza sobre la muestra que se quiere observar. Debido a la interacción entre el haz de electrones y la muestra, se originan unas señales que se registran a través de unos detectores y se visualizan en el sistema final de observación (Ipohorski & Bozzano, 2013). Este sistema suele ser la pantalla de un ordenador, obteniendo aquí la imagen de la muestra observada.

La parte final de la columna contiene una placa donde se coloca la superficie adhesiva conductora en la que se sitúa la muestra (Ipohorski & Bozzano, 2013). Esta placa permite ser desplazada en los ejes x-y-z para así poder observar toda la superficie de la muestra y enfocarla correctamente.

La muestra que se quiere analizar necesita cumplir unos requisitos para poder ser observada. En primer lugar, tiene que estar muy seca y, en segundo lugar, tiene que ser buena conductora eléctrica. En aquellos casos en los que la muestra no sea conductora, se necesita aplicar un tratamiento previo. Este tratamiento consiste en recubrir dicha muestra con carbono o con oro, para así poderla observar en el microscopio.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

Considerando la necesidad de mejorar el conocimiento del transporte de virus en el subsuelo y el estado del arte revisado, **el objetivo general de este trabajo final de máster es estudiar los mecanismos de adsorción de los virus a los sedimentos de acuíferos y evaluar qué efecto tiene el pH en dicha adsorción.** Para ello, se utilizarán nanopartículas recubiertas de proteínas como símiles de virus, representando un punto isoeléctrico, tamaño y forma similares al de los virus.

Como segundo objetivo, también se quiere evaluar el efecto del recubrimiento de las nanopartículas mediante proteínas en el proceso de adsorción. Por ello, se ha diseñado y realizado un conjunto de experimentos en escala de *batch* evaluando la adsorción de 1) nanopartículas sin recubrir, 2) nanopartículas recubiertas por un laboratorio profesional y 3) nanopartículas recubiertas durante este trabajo en el laboratorio de la UPC. Estos experimentos se han realizado a 3 pH diferentes: 5, 7 y 9, cubriendo así el rango de pH naturales de las aguas subterráneas.

Es importante destacar que este proyecto de final de máster se enmarca en una línea de investigación nueva del Grupo de Hidrología Subterránea, por lo que, además de ampliar el conocimiento científico, también es objetivo de este trabajo establecer protocolos experimentales y de análisis.

4.2. Objetivos específicos

Todo proyecto presenta unos objetivos generales, pero también unos específicos que permiten puntualizar y determinar con exactitud los aspectos y conocimientos adquiridos después de la realización del trabajo, tanto de la parte teórica y búsqueda bibliográfica como en el proceso experimental y de interpretación de datos.

Así pues, los objetivos específicos del proyecto realizado son:

1. Definir qué tipo de nanopartículas y proteínas se asemejan más a los virus por lo que respecta a su transporte en un medio poroso.
2. Definir los protocolos de experimentación para el recubrimiento de las nanopartículas con proteínas y para los experimentos de sorción.
3. Definir qué técnicas analíticas son las más adecuadas para caracterizar los sedimentos y realizar el recuento de nanopartículas.
4. Realizar experimentalmente el recubrimiento de las nanopartículas mediante las proteínas y los experimentos de sorción tipo *batch*.
5. Caracterizar el sedimento mediante difracción de rayos X.
6. Determinar la concentración de nanopartículas en diferentes suspensiones mediante diferentes técnicas analíticas: citometría de flujo, microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido.
7. Evaluar si el recubrimiento hecho en el propio laboratorio se asemeja al realizado en los laboratorios profesionales.
8. Evaluar el efecto del pH en los distintos escenarios considerados.

Para poder alcanzar los objetivos específicos definidos es necesario establecer y realizar una serie de tareas. Éstas son las siguientes:

1. Revisión bibliográfica para conocer los aspectos teóricos que abarca el proyecto y saber qué se ha estudiado hasta ahora y hacia dónde se puede encaminar la investigación.

2. Diseño de toda la parte experimental, definiendo los materiales y equipos necesarios que se deberán usar en el laboratorio y el protocolo a seguir para poder realizar los experimentos.
3. Experimentación en el laboratorio, siguiendo el protocolo establecido para poder obtener muestras y analizarlas.
4. Determinación analítica, analizando cada una de las muestras obtenidas en el laboratorio para poder conocer todos los parámetros de interés, como la concentración de partículas en diferentes suspensiones.
5. Análisis de los resultados obtenidos, para así plasmarlos en el proyecto y extraer conclusiones.

La realización de cada una de estas tareas permite conseguir el cumplimiento de los objetivos específicos comentados. Así pues, la primera tarea en la que se hace la revisión bibliográfica permite alcanzar el primer objetivo específico, ya que a partir de la búsqueda de artículos científicos relacionados se puede definir el tipo de nanopartículas y de proteínas necesarias para representar los virus. Además, esta primera tarea también permite establecer el protocolo experimental, el objetivo específico 2, ya que éste se desarrolla a partir de protocolos experimentales seguidos por autores de artículos que hayan trabajado en el mismo campo. Asimismo, el tercer objetivo específico también se alcanza mediante la realización de la primera tarea, ya que es necesario hacer una revisión bibliográfica para conocer las técnicas analíticas más adecuadas para realizar el recuento de las nanopartículas.

La segunda tarea, en la que se realiza el diseño de la parte experimental, también permite cumplir con el segundo objetivo específico ya que, al diseñar el experimento, se está estableciendo el protocolo experimental.

En cuanto a la tercera tarea, la realización de la parte experimental permite alcanzar el objetivo específico 4 de recubrir las nanopartículas con las proteínas y realizar los experimentos de sorción tipo *batch*.

La determinación analítica realizada en la cuarta tarea permite cumplir con los objetivos específicos 5 y 6, ya que es la que hay que realizar para poder caracterizar el sedimento y determinar la concentración de nanopartículas en diferentes suspensiones mediante diferentes equipos analíticos.

Finalmente, la tarea 5 de análisis de resultados permite alcanzar los últimos objetivos específicos, el número 7 y 8, ya que mediante el estudio de los datos obtenidos se puede evaluar si el recubrimiento de las nanopartículas realizado en el laboratorio es similar al realizado por los profesionales, así como evaluar qué efecto tiene el pH en los diferentes escenarios estudiados.

5. METODOLOGÍA

A continuación, se define más detenidamente cada una de las tareas mencionadas en el apartado anterior, para así desarrollar toda la metodología seguida a lo largo del proyecto.

5.1. Revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica de toda la información relacionada con el proyecto se encuentra detallada en el capítulo 3 de este Trabajo Final de Máster.

Como se ha visto, dicha revisión bibliográfica consta de dos partes: la primera contiene información teórica sobre los virus y su transporte, mientras que la segunda parte se enfoca más en el concepto de nanopartícula, mencionando artículos y estudios que se hayan hecho hasta la fecha en materia de representar los virus mediante partículas nanométricas y en las técnicas analíticas empleadas para su detección.

5.2. Diseño y parte experimental

5.2.1. Materiales

- Partículas y proteínas

Las partículas utilizadas fueron microesferas de poliestireno carboxilado con un diámetro medio de 4,95 μm . Estas microesferas son fluorescentes, concretamente de color azul, y presentan una longitud de onda de emisión y de excitación de 450 y 360 nm, respectivamente.

Aunque el tamaño de estas partículas no es representativo del tamaño de los virus, ya que las primeras tienen un diámetro micrométrico y los segundos lo tienen del orden nanométrico, se decidió trabajar con partículas de mayor tamaño para: 1) realizar una prueba de concepto y entender el proceso de sorción, 2) poder simular parte del estudio de Pang et al. (2012) y 3) minimizar los problemas experimentales, especialmente en el conteo de partículas, debido al límite de detección de las técnicas analíticas utilizadas.

Para recubrir la superficie de las microesferas, la proteína utilizada fue la α_1 -glicoproteína ácida. Esta proteína presenta un punto isoeléctrico de 2,7, tiene un peso molecular entre 33.000 y 40.800 g/mol y una solubilidad en agua de 10 mg/mL. Su contenido consta de los siguientes monosacáridos: aproximadamente un 11 – 12% de ácido siálico, un 13 – 17% de hexosas neutras, un 12 – 15% de hexosamina y un 0,7 – 1,5% de fucosa (aproximadamente un 45% de contenido total de carbohidratos).

Las microesferas se compraron a Bangs Laboratories, mientras que la α_1 -glicoproteína ácida se compró a Sigma Aldrich. Ambos productos deben almacenarse a 4°C hasta su uso.

- Sedimentos

A lo largo de toda la parte experimental, el medio poroso de los acuíferos se representa mediante el uso de sedimentos de sílice, un compuesto formado por silicio y oxígeno y conocido químicamente como óxido de silicio IV (SiO_2). Dicho compuesto, al ordenarse en redes tridimensionales, forma el cuarzo, un mineral muy común en la corteza terrestre.

El tamaño del grano del sedimento utilizado es de 1 mm, aproximadamente, tal y como se muestra en la Figura 10.

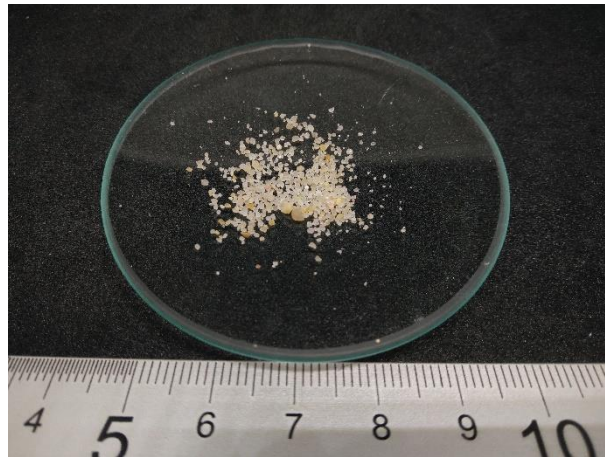


Figura 10: Tamaño del grano del sedimento

Antes de utilizarlos, estos sedimentos fueron muflados durante 4 horas a 550°C para eliminar toda la materia orgánica y todos los compuestos volátiles que pudieran contener. De esta manera, la materia orgánica del sedimento no influye en la adsorción de las partículas y esto permite estudiar únicamente el efecto del pH en dicho proceso físico.

No obstante, después del tratamiento térmico aplicado, se observa un cambio en el color del sedimento, pasando de tener un aspecto marrón a un color rosa anaranjado. En la Figura 11 se puede observar dicho cambio de color, donde en la imagen a) se encuentra el sedimento antes de ser muflado y a la b), una imagen después de aplicarle una temperatura de 550°C durante 4 horas. La imagen c) muestra una comparación directa entre ambos sedimentos.

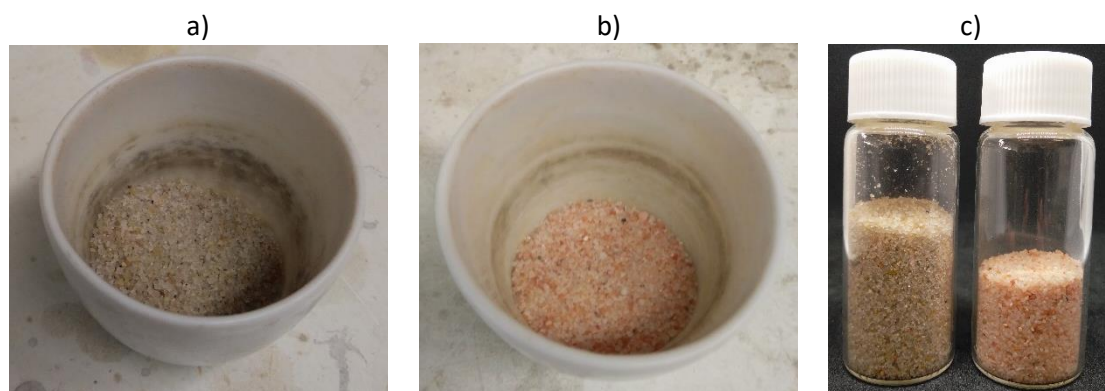


Figura 11: Sedimentos a) antes de ser muflados, b) después de ser muflados y c) comparación directa

El cambio de color producido al aplicar un tratamiento térmico al cuarzo indica que éste presenta impurezas. Concretamente, el cuarzo rosa presenta trazas de manganeso, hierro o titanio y el cuarzo naranja debe su color a la presencia de hierro (Alden, 2019).

La caracterización de los sedimentos utilizados se ha hecho mediante la difracción de rayos X, una técnica que permite caracterizar materiales cristalinos y es útil para determinar el porcentaje de cristalinidad del material estudiado (Patel & Parsania, 2018).

Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética situada a una longitud de onda inferior a la de la luz visible, concretamente entre 10^{-11} y 10^{-8} m.

Cuando un haz de rayos X entra en contacto con la muestra, los rayos reflejados son detectados por un detector, obteniéndose un difractograma de rayos X (espectro en forma de picos que representa la difracción de los rayos).

En función de la forma y de la cantidad de los picos obtenidos en el espectro, se puede saber de qué compuesto se trata. Por un lado, si los picos son anchos, el material estudiado es amorfo; en cambio, si los picos son más estrechos y agudos, el compuesto presenta una estructura cristalina (Patel & Parsania, 2018). Por otro lado, los compuestos cristalinos presentan una gran cantidad de picos, mientras que, si en el espectro obtenido la presencia de picos es escasa, es indicador de que el material estudiado es amorfo.

La difracción de rayos X se ha realizado en los Servicios Cientificotécnicos de la Universitat de Barcelona, concretamente con el Difractómetro PANalytical XPert PRO MPD theta/theta. El material utilizado para generar los rayos X ha sido cobre (Cu) con una $K\alpha$ (longitud de onda) de 0,15406 nm.

5.2.2. Proceso experimental

El proceso experimental realizado a lo largo del proyecto se lleva a cabo a través de unos experimentos *batch*. Éstos consisten en unos reactores en los que se introduce el sedimento y una suspensión de microesferas y, después de un tiempo de contacto y agitación a una temperatura controlada, se asegura el equilibrio entre la fase líquida y la fase sólida. A continuación, se determina la concentración de partículas en equilibrio en la fase líquida y en la fase sólida, para así determinar la cantidad de partículas que han quedado adsorbidas al sedimento y definir el proceso de sorción. De esta manera, el experimento *batch* permite representar el proceso de adsorción que tiene lugar en el transporte de los virus a través del medio poroso.

Este proceso de adsorción varía en función de las propiedades del sorbente, del sorbato y del medio: pH de la suspensión, fuerza iónica de la solución, tipo de sedimentos... Sin embargo, para poder hacer una aproximación, se decidió realizar los experimentos manteniendo todas las variables constantes e ir modificando, únicamente, el pH. Así pues, la matriz de experimentos consiste en 3 escenarios diferentes, definidos a continuación, en el que en cada uno se realizará el experimento a tres pH distintos (a pH = 5, 7 y 9). Se escogieron estos pH por ser los más representativos del medio subterráneo.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los objetivos específicos del proyecto es evaluar la viabilidad del recubrimiento de las partículas con proteínas en el propio laboratorio de la universidad. Por ello, los experimentos de sorción se han evaluado considerando tres escenarios experimentales diferentes:

- 1) microesferas sin recubrir;
- 2) microesferas recubiertas con proteínas, realizando el recubrimiento en el laboratorio de la universidad; y
- 3) microesferas que estén recubiertas por un laboratorio profesional.

De este modo se puede comprobar si las diferentes superficies de las microesferas condicionan los procesos de sorción y verificar si el recubrimiento de las microesferas es viable realizarlo en el laboratorio o, por el contrario, es preferible contratarlo directamente al proveedor.

Considerando que todos los experimentos en *batch* se realizan por triplicado y que se evalúan 3 pH i 3 tipos de recubrimientos, el total de experimentos de sorción asciende a 27 (ver Figura 12). A continuación, se describe en detalle todo el proceso experimental, formado por dos partes.

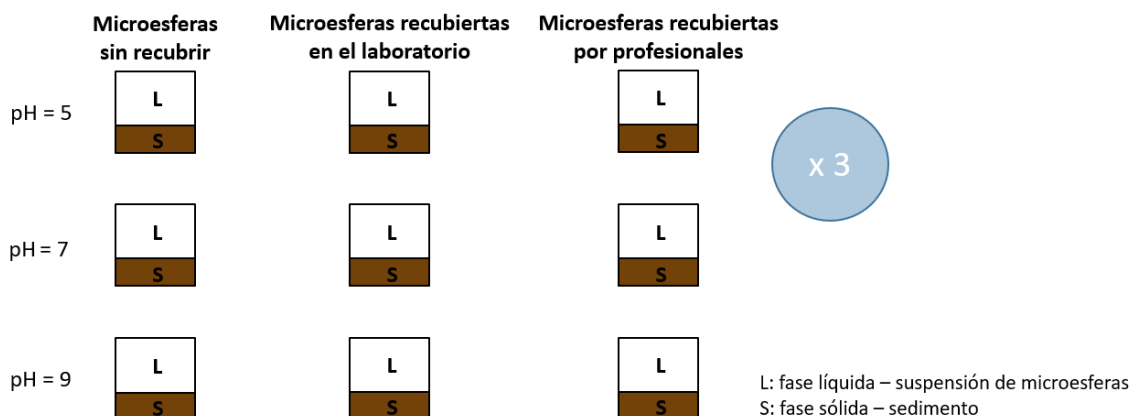


Figura 12: Matriz de experimentos esquemática

1. Recubrimiento de microesferas con α_1 -glicoproteína ácida

Este procedimiento experimental se ha basado en Pang *et al.* (2009), donde se describe el recubrimiento de las microesferas de poliestireno carboxilado con proteína. El primer paso es la disolución de 2 mg de α_1 -glicoproteína ácida en 2 mL de tampón fosfato salino, conocido como PBS. Dicho tampón fosfato debe tener una concentración de 50 mmol/L y un pH de 6,5.

Una vez disuelta la proteína en PBS, se añaden 5 mL de una suspensión de microesferas con una concentración $5,016 \cdot 10^6$ partículas/mL. Seguidamente, dicha disolución formada por la proteína, el tampón fosfato y las microesferas, se debe incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante 21 horas con agitación continua a 110 rpm.

Pasado este tiempo, la solución se centrifuga a 4200 rpm durante 25 minutos. De esta manera, las microesferas recubiertas se depositan en el fondo del tubo de centrifuga, mientras que la proteína que no se ha adsorbido a la superficie de las esferas se queda disuelta formando el sobrenadante, el cual se elimina. Posteriormente, las partículas recubiertas se resuspenden en 5 mL de PBS, también con una concentración de 50 mmol/L, y se sonicar durante 15 minutos a máxima potencia. La sonicación permite que las partículas queden suspendidas en el tampón fosfato sin formar aglomeraciones. Este ciclo de centrifugación, eliminación del sobrenadante, resuspensión de las partículas en PBS y sonicación se debe repetir un total de 3 veces seguidas.

Una vez terminado el proceso, las microesferas recubiertas deben almacenarse a oscuras y a 4°C hasta su uso.

Para obtener una solución de PBS con una concentración de 50 mmol/L y un pH = 6,5 se debe disolver 40 gramos de NaCl, 1 gramos de KCl, 7,2 gramos de Na_2HPO_4 y 1,2 gramos de KH_2PO_4 en 800 mL de agua destilada. Seguidamente, se mide el pH de la solución preparada y se añaden pequeñas gotas de una solución de HCl o NaOH 10^{-2} mol/L, en función de si se necesita disminuir o aumentar el pH. Una vez ajustado el pH, se añade agua destilada hasta llegar a 1 litro de solución y se esteriliza mediante autoclave durante 20 minutos a 121°C. La solución de PBS obtenida se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

2. Experimentos de sorción entre partículas y sedimentos

La metodología experimental se ha basado en Schijven *et al.* (2000). Los experimentos *batch* se realizan en viales de 50 mL. En estos viales, se introducen 5 g de sedimento y 12 mL de solución líquida con microesferas. Previamente, el sedimento se mufla a 550°C durante 4 horas para eliminar cualquier traza de materia orgánica sedimentaria.

Estos 12 mL de solución se preparan con 9 mL de solución de NaCl a una concentración de 10^{-3} mol/L. A esta solución, que será la que aportará la fuerza iónica, se le añaden pequeñas gotas de una solución de HCl o NaOH 10^{-2} mol/L para ajustar el pH a 5, 7 y 9. Una vez ajustado, se añaden 3 mL de la solución de microesferas (sin modificar o recubiertas) de concentración $2,786 \cdot 10^6$ partículas/mL. Para la tercera réplica se modifica levemente el proceso experimental, añadiendo únicamente 5 mL de solución de NaCl 10^{-3} mol/L y 3 mL de la solución de microesferas, haciendo que los sedimentos se mezclen con 8 mL de solución líquida. Esta modificación se realiza para aumentar la concentración de partículas en las muestras y así facilitar su detección mediante una de las técnicas analíticas empleadas: el microscopio de epifluorescencia.

Es posible que, pese a que la solución de NaCl ya presente el pH adecuado, al mezclarla con los 3 mL de microesferas, dicho valor de pH varíe, ya que las microesferas contienen tampón fosfato y éste evita los cambios de pH. Si esto ocurriera, es necesario volver a ajustar el pH antes de verter los 12 mL a los viales que contienen los sedimentos.

Una vez preparados los 9 viales, formados por los tres pH diferentes y los tres recubrimientos distintos, se incuban a 21°C durante 90 minutos con agitación constante a 110 rpm.

A continuación, se deja que el sedimento decante por acción de la gravedad durante 5 minutos, de manera que la fase sólida sedimenta en el fondo del vial. Después de este tiempo, se extrae todo el líquido con la ayuda de una pipeta Pasteur, separándolo del sólido, y se guarda en otros viales en la nevera y a oscuras, juntamente con los sedimentos.

Las partículas que se contabilicen en dicho líquido serán las partículas que no se han adsorbido al sedimento, de manera que las que falten hasta llegar a la concentración inicial serán las que sí habrán quedado adsorbidas en la superficie del sólido.

Durante todo el proceso se debe proteger las microesferas de la luz, ya que ésta afecta a la fluorescencia que presentan. Para ello, se envuelven los viales que las contiene con papel de aluminio.

En la Figura 13 se observa la matriz de experimentos descrita anteriormente llevada a cabo en el laboratorio.



Figura 13: Matriz de experimentos realizada en el laboratorio

5.3. Determinación analítica y análisis de datos

Las partículas en suspensión se determinaron mediante tres técnicas analíticas: citometría de flujo, microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM). Se utilizaron estas tres técnicas para 1) verificar la buena determinación y recuento del número de partículas y 2) comparar las ventajas e inconvenientes que presentan dichas técnicas analíticas.

A continuación, para cada una de las técnicas analíticas utilizadas se describe cómo se debe preparar la muestra para poder ser analizada, qué tipos de equipos se han utilizado y cuál es el procesamiento de datos que se debe realizar para transformar el resultado de la analítica en el número de partículas que han quedado adsorbidas al sedimento.

- Citometría de flujo

Para analizar las muestras mediante citometría de flujo no es necesario aplicarles ningún tratamiento previo. Únicamente, se deposita un determinado volumen de cada muestra en unos viales especiales, los cuales se introducen en el citómetro con la ayuda de una placa que permite analizar 32 muestras de manera continuada. Una vez aquí, el equipo va inyectando muestra y, paralelamente, va contando las partículas presentes en la suspensión durante un tiempo establecido. En este proyecto, el volumen de muestra utilizado fue de 0,7 mL y se programó el citómetro de manera que, para cada muestra, contara las partículas que detectaba durante 60 segundos.

Como se ha comentado en el apartado 3.4, la citometría de flujo permite detectar y contar partículas en función del tamaño y de la fluorescencia que presenten. En este caso, las partículas utilizadas tienen un diámetro medio de aproximadamente 5 μm , de manera que, gracias a su tamaño, se han podido detectar. En cambio, pese a que las partículas utilizadas también presentan fluorescencia, no se han podido contabilizar a través de la detección de dicha característica, pues la longitud de onda de excitación (360 nm) no se corresponde con las líneas de excitación comunes del citómetro utilizado (405 nm – violeta, 488 nm – azul, 561 nm – verde-naranja y 640 nm – rojo).

El equipo utilizado a lo largo de toda la determinación analítica mediante esta técnica fue el citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter). Este equipo pertenece a los Servicios Cientifícotécnicos de la Universitat de Barcelona, el cual se pudo utilizar gracias a la ayuda de Jaume Comas, responsable de la unidad de citometría de flujo y genómica.

Para conocer el número de partículas presentes en cada muestra a partir de los valores proporcionados por el citómetro, es necesario analizar con el mismo equipo analítico una solución de la cual se conozca su concentración. De esta manera, inyectando durante el mismo tiempo ambas soluciones en el citómetro, se puede establecer una correlación que permita obtener la concentración de la muestra estudiada.

Por ejemplo, para este estudio, la solución conocida tenía una concentración de 504.500 partículas/mL y, durante 60 segundos, el citómetro detectó 28.166 partículas. En cambio, para la muestra de partículas sin recubrimiento proteico a pH = 7, el citómetro contabilizó 4.392 partículas al inyectar la muestra durante 60 segundos. Realizando una regla de tres, se estima que dicha muestra obtenida en el laboratorio presenta una concentración de 78.668 partículas/mL.

A partir de esta concentración se puede estimar el número de partículas presentes en la muestra y que, por lo tanto, no se han adsorbido al sedimento. Para ello, es necesario multiplicar la concentración obtenida por el volumen de muestra trabajado. Seguidamente, el número de partículas que sí han quedado adsorbidas al medio poroso se obtiene al calcular la diferencia entre el número inicial de partículas que había antes de realizar los experimentos *batch* y el número de partículas calculado que no han quedado adsorbidas.

- Microscopio de epifluorescencia

La técnica de contaje utilizada en el microscopio de epifluorescencia consiste en capturar fotografías de manera automática de la superficie del cubreobjetos, allí donde está depositada una gota de 12 μ L de muestra.

Este sistema de fotografía automática se programa de tal manera para que rastree 1/4 de dicha área del cubreobjetos y para que, aparte de hacer fotografías en el plano XY, también las haga en el eje Z. Como la muestra se observa en estado líquido, es decir, no se deja secar antes de observarla en el microscopio, estas fotografías en el eje vertical son necesarias para rastrear toda la altura que pueda tener la gota de muestra y así detectar todas las partículas que estén suspendidas en diferentes planos. Un ejemplo de ello se observa en la Figura 14, donde en ambas fotografías se observan las mismas partículas. A la Figura 14a) se ve que la partícula situada en la parte superior derecha está mejor enfocada; mientras que en la Figura 14b), la partícula que tiene un mejor enfoque es la situada en la parte inferior izquierda. Esta diferencia en el enfoque se debe a que son partículas que están situadas en diferentes planos del eje Z.



Figura 14: Partículas fotografiadas con el microscopio de epifluorescencia, cada una de ellas enfocadas en dos planos del eje Z diferentes

Pese a trabajar con muestras líquidas, durante la captura de fotografías, las partículas situadas dentro del cubreobjetos no se mueven por el líquido, hecho que permite no contar varias veces una misma partícula.

Por lo tanto, para cada muestra se hacen en torno a 417 fotografías en el plano XY y 12 fotografías en el eje Z por cada una de las 417 imágenes capturadas, sumando un total de, aproximadamente, 5000 fotografías por cada muestra. El análisis de estas fotografías y el recuento de las partículas que aparecen en ellas se hace mediante el programa Fiji – Image J, un sistema de procesamiento de imágenes. Para ello, se programa una macro y se ejecuta en modo Batch, al cual se le asigna una carpeta donde estén situadas las imágenes, de manera que aplica automáticamente la misma macro para cada una de ellas. En este trabajo, la macro utilizada se ha obtenido modificando la propuesta por Alarcón (2017), quedando de la siguiente manera:

```
//Macro para contar partículas a partir de una imagen RGB//
Macro "Macro para contar partículas [q]"
{
run("8-bit");
setAuto Threshold("Default dark");
//run("Threshold...");
setAuto Threshold("Default dark");
setThreshold(96,255);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Erode");

run("Analyze Particles...", " circularity=0.55-1.00 show=[Overlay Masks] display exclude include summarize");
}
```

La utilización de partículas fluorescentes facilita su identificación en las fotografías, ya que el fondo de éstas es completamente negro y las partículas destacan por su color azul. Debido a esto, para poder contarlas mediante el programa Fiji – Image J es necesario establecer un intervalo de valores de intensidad de los píxeles, de manera que se obtiene una imagen binaria donde las partículas que tiene una intensidad de píxel comprendida dentro de ese intervalo establecido adquieren un color negro, mientras que el resto presenta color blanco. Este intervalo de píxel corresponde a la línea de código 8 de la macro anterior.

Así pues, la estrategia utilizada para analizar las 5000 fotografías capturadas en cada muestra consiste en hacer varias iteraciones de la macro, modificando los valores de intensidad de los píxeles. En la primera de ellas, los píxeles seleccionados se encuentran entre 96 y 255; en la segunda, entre 150 y 255; finalmente, se hace una última iteración con valores de píxeles entre

200 y 255. El objetivo de realizar tres iteraciones es ir descartando todas aquellas imágenes que no contengan partículas o que presenten partículas fotografiadas en un punto del eje Z que no sea el de mejor enfoque. De esta manera, las 5000 fotografías de cada muestra se reducen a unas 300, en las que en todas ellas hay partículas fotografiadas en un punto del eje Z que sí corresponde al punto de mejor enfoque.

El tiempo necesario para realizar la captura automática de fotografías de 1/4 de toda la superficie del cubreobjetos es de, aproximadamente, una hora por cada muestra. Con el fin de obtener el número total de partículas en toda la muestra, se considera que las partículas se distribuyen homogéneamente por todo el volumen.

El microscopio de epifluorescencia utilizado en este trabajo ha sido un prototipo construido en Winkoms Open Microscopy dentro de un proyecto de la Universitat de Barcelona. Basado en un euromex iscope, se ha mecanizado e instalado un sistema de automatización de captura de imágenes en tres dimensiones: X, Y y Z. Para trabajar con epifluorescencia, se ha instalado unos filtros DAPI i una lámpara de 365 nm. Para la captura de las imágenes, se ha adaptado una cámara Sony Camera Digital Sensor IMX249 Color de 2 MP 1" 3,1 μm pixel size Global Shutter. Finalmente, el software para la automatización y la captura de imágenes por fluorescencia están diseñados por Winkoms. El objetivo utilizado ha sido un objetivo Nikon de 20 aumentos.

La microscopía de epifluorescencia se determinó en el Departamento de Biología Evolutiva, Ecología y Ciencias Ambientales de la Facultad de Biología de la Universitat de Barcelona, a través de contactar con el Dr. Humbert Salvadó Cabré.

Un ejemplo de una imagen tomada mediante dicho microscopio de epifluorescencia es el que se muestra en la Figura 15, correspondiente a la suspensión de partículas micrométricas utilizadas antes de realizar los experimentos.

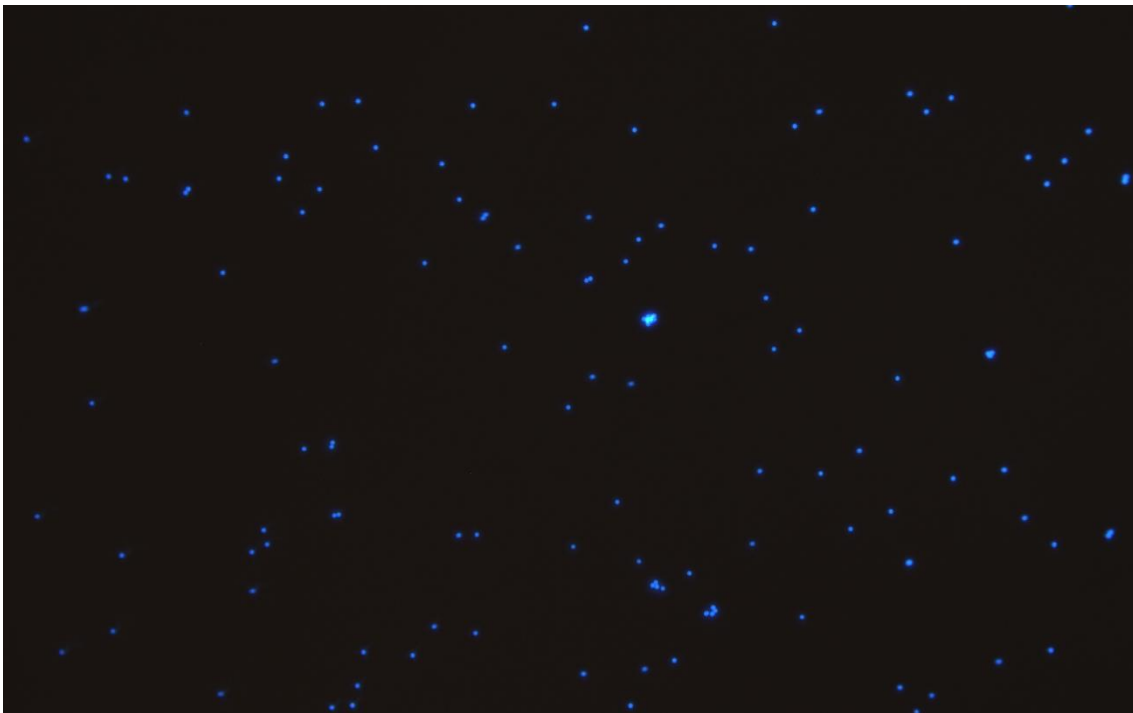


Figura 15: Imagen de las microesferas obtenida con el microscopio de epifluorescencia

Para poder estimar la concentración de partículas presentes en las muestras, a partir de los datos obtenidos con el microscopio de epifluorescencia, y así saber qué cantidad de ellas han quedado adsorbidas al sedimento, es necesario realizar una serie de cálculos. Por un lado, los cubreobjetos utilizados para observar las muestras mediante este microscopio de epifluorescencia son de 20x20 mm, de manera que su superficie es de $4 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2$. Por otro lado, el área de un campo fotografiado con el objetivo de 20 aumentos utilizado es de 1920x1200 píxeles, lo que corresponde a $189.337,6 \mu\text{m}^2$. De este modo, el número de fotografías máximas que se pueden capturar de toda la superficie del cubreobjetos es de 2113. En este caso, para cada muestra se han obtenido entre 400 y 500 fotografías, de manera que se ha rastreado aproximadamente un cuarto de toda la superficie del cubreobjetos.

Haciendo el recuento del número de partículas presentes en este cuarto del cubreobjetos, se puede estimar el número de partículas presentes en los $4 \cdot 10^8 \mu\text{m}^2$ del cubreobjetos, considerando que las partículas están repartidas homogéneamente.

Una vez conocido el número de partículas presentes en todo el cubreobjetos, se puede estimar su concentración, ya que se conoce el volumen de muestra depositado, en este caso de 12 μL .

Finalmente, para conocer el número de partículas presentes en la fase líquida después de realizar los experimentos *batch*, se multiplica el volumen total de muestra obtenido por la concentración de partículas presente en el cubreobjetos, estimada previamente. Las partículas adsorbidas al medio poroso se obtienen con la diferencia entre el número de partículas inicial y el número de partículas que no han quedado adsorbidas.

- Microscopio electrónico de barrido

La metodología seguida para hacer el recuento de partículas mediante el microscopio electrónico de barrido consiste en depositar una gota de 0,5 μL de cada muestra sobre los “staps”, bases utilizadas para observar las muestras a través de microscopios electrónicos, y dejarla secar. Una vez seca, se recubre con carbono para conseguir que la superficie que todo aquello que contenga la gota sea conductora eléctrica y así poder observar su contenido.

Una vez la muestra está preparada, se introduce el “stap” en el microscopio y se localiza la gota, como por ejemplo la que se observa en la Figura 16. Para analizar toda la superficie de la gota y poder observar todas las partículas que contenga, se hacen fotografías a 400-450 aumentos siguiendo toda su área, de manera que el montaje de todas las fotografías capturadas permite reconstruir la gota de cada muestra. En este caso, se obtienen alrededor de 70 fotografías por cada muestra, cada una de ellas capturada manualmente, en comparación con el microscopio de epifluorescencia que, con el equipo empleado en este trabajo, se permite obtener fotografías de manera automática.

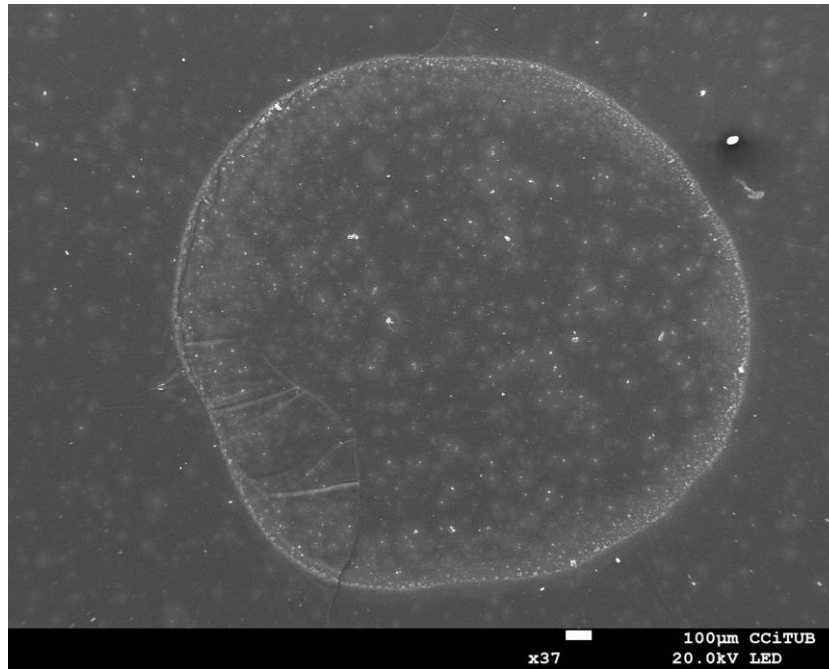


Figura 16: Gota de la muestra de partículas sin recubrir a pH = 9 de la primera réplica, fotografiada mediante el microscopio electrónico de barrido

El conteo de partículas observadas en las fotografías obtenidas se requiere hacer manualmente, a diferencia del microscopio de epifluorescencia. El conteo automático mediante la programación en Fiji – Image J no se ha empleado en las imágenes obtenidas a través de SEM, pues en dichas fotografías se observan sales y compuestos orgánicos que el programa no es capaz de diferenciar de las partículas.

Para realizar la microscopía electrónica de barrido se utilizó el microscopio FESEM JEDL J-7100 con detectores EDS y de retrodispersados. Este microscopio se encuentra en los Servicios Científicotécnicos de la Universitat de Barcelona y se permitió su utilización a través de contactar con los Drs. Elena Xuriguera Martín y José Antonio Padilla Sánchez, ambos del Departamento de Ciencia de Materiales y Química Física de la Facultad de Química de la Universitat de Barcelona.

Con este microscopio se obtuvo la Figura 17, un ejemplo de las microesferas con las que se ha trabajado a lo largo de todo el proceso experimental.

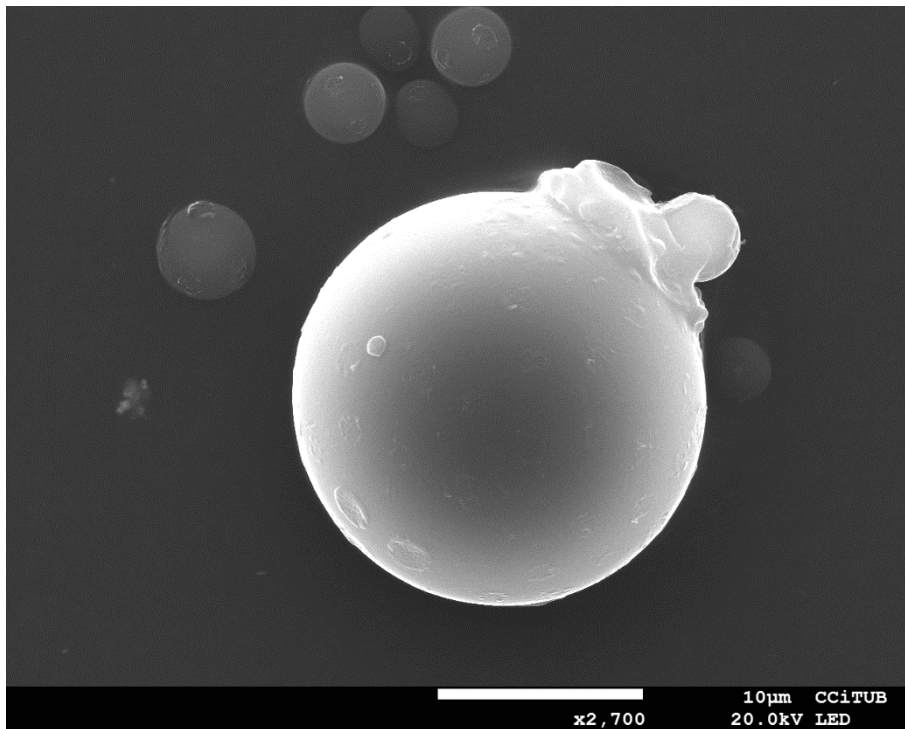


Figura 17: Imagen de una microesfera obtenida con el microscopio electrónico de barrido

Para determinar la cantidad de partículas presentes en cada muestra a partir de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido es necesario, en primer lugar, contar las partículas presentes en las fotografías capturadas. En segundo lugar, conociendo el volumen de la gota de muestra depositada en los "staps" (0,5 µL), se estima la concentración de partículas presentes en esa gota. Seguidamente, el número de partículas que hay en toda la muestra se obtiene al multiplicar la concentración anterior por el volumen de toda la fase líquida obtenida al finalizar los experimentos *batch*. Finalmente, las partículas que sí han quedado adsorbidas al sedimento se obtienen al restar el número inicial de partículas y el número de partículas no adsorbidas.

6. RESULTADOS

Una vez realizado el proceso experimental y obtenidas las 27 muestras, la fase líquida de cada una de ellas se analiza mediante las tres técnicas explicadas en el apartado 5.3. El número de partículas que se obtenga en dicha fase líquida será la cantidad de partículas que no se haya adsorbido al sedimento. En cambio, las partículas que sí se hayan adsorbido al medio poroso se determinarán mediante la diferencia entre el número inicial de partículas y el número de partículas contabilizadas en la fase líquida.

Como se ha comentado anteriormente, el mismo proceso experimental se realiza tres veces. En las dos primeras réplicas, el volumen de líquido que se mezcla con el sedimento y que está formado por 9 mL de solución de NaCl con el pH ajustado y 3 mL de suspensión de microesferas tiene una concentración teórica de $6,965 \cdot 10^5$ partículas/mL y un número inicial de partículas de 8.358.000. Sin embargo, la tercera réplica se realiza con 5 mL de solución NaCl y 3 mL de la solución de microesferas, de manera que la concentración teórica de la fase líquida es de $1,045 \cdot 10^6$ partículas/mL y el número inicial de partículas es de 8.358.000. La Tabla 5 muestra un resumen de los datos comentados.

Tabla 5: Datos de volumen, concentración y partículas de las muestras obtenidas en las tres réplicas

Réplica	Volumen fase líquida (mL)	Concentración (partículas/mL)	Número inicial de partículas
1	12	$6,965 \cdot 10^5$	8.358.000
2	12	$6,965 \cdot 10^5$	8.358.000
3	8	$1,045 \cdot 10^6$	8.358.000

En la tercera réplica se modifica levemente el proceso experimental reduciendo el volumen de la fase líquida debido a que, previamente a su realización, se llevaron a cabo pruebas en el microscopio de epifluorescencia con muestras de la primera réplica y se detectó una dificultad al observar las partículas. Debido a esto, se decidió aumentar la concentración de partículas en las muestras de la tercera réplica para facilitar su visualización. Sin embargo, la utilización de un objetivo de 20 aumentos permitió observar perfectamente las partículas de todas las muestras, independientemente de la réplica.

6.1. Resultados Citometría de flujo

A continuación, se muestran los resultados de la determinación por citometría de flujo en forma de histograma. Un ejemplo se encuentra en la Figura 18, donde se representa el histograma de la muestra de partículas sin recubrir a pH = 7 de la primera réplica. El recuadro que aparece en la parte inferior de la Figura indica cuantitativamente el número de partículas que hay en la muestra inyectada en el citómetro y el porcentaje que representa en el total.

Los valores correspondientes a la región "A" hacen referencia a la cantidad de partículas detectadas. En cambio, todo lo que queda fuera de dicha región representa el ruido de fondo del equipo (Figura 18a)).

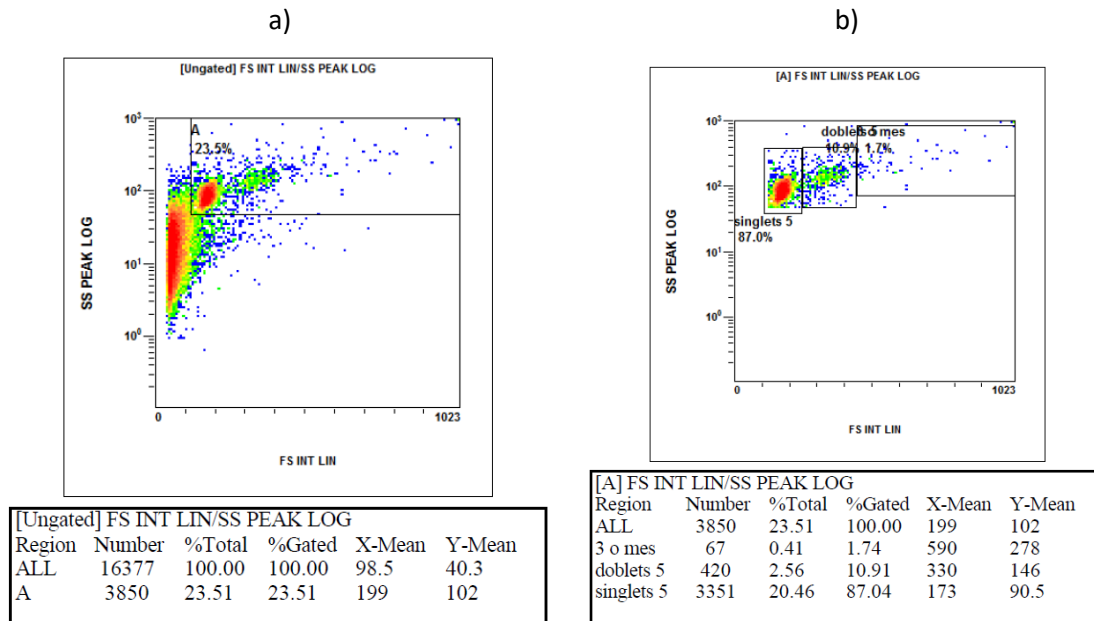


Figura 18: Histograma obtenido mediante citometría de flujo para la muestra de partículas sin recubrir a pH = 7 de la réplica 1, a) con ruido de fondo, b) sin ruido de fondo

Para centrarse sólo en los valores de las partículas presentes en la muestra, sin graficar y estudiar el ruido de fondo, el sistema permite mostrar el valor de las partículas que hay en la región “A” y el porcentaje que representa en el total. De esta manera, se obtiene la Figura 18b), también de la muestra de partículas sin recubrir a pH = 7 de la réplica 1. En este caso, la región “A” se subdivide en tres regiones: “singlets 5”, “doblets 5” y “3 o más”. “Singlets 5” hace referencia a la cantidad de partículas detectadas con un tamaño de 5 µm de diámetro, “doblets 5” muestra la cantidad de aglomeraciones formadas por la unión de 2 partículas, mientras que la región “3 o más” indica la cantidad de aglomeraciones que se han detectado y que están formadas por 3 partículas.

Como la mayoría de partículas utilizadas en este trabajo presentan un diámetro medio de 5 µm, todas aquellas que se detecten a la derecha en el eje X del pico más alto del histograma, no se consideran partículas de mayor tamaño, sino que se tratan como aglomeraciones. Es decir, todas las partículas situadas en la región “doblets 5”, no son partículas de 10 µm, sino que se contemplan como la unión de 2 partículas de 5 µm cada una. De igual modo ocurre con las partículas detectadas en la región “3 o más”, las cuales representan 3 partículas juntas de 5 µm cada una y no una sola de 15 µm de diámetro.

Así pues, basándose en el tamaño de las microesferas y multiplicando por 2 el valor que aparece en “doblets 5” y por 3 el valor de “3 o más”, los resultados obtenidos mediante citometría de flujo son los que se muestran en la Tabla 6. En dicha tabla aparece el valor promedio obtenido en las diferentes réplicas, junto con la desviación estándar.

Tabla 6: Resultados obtenidos mediante citometría de flujo

Tipo de microesfera	pH	Número de partículas contabilizadas	Número de partículas NO adsorbidas	Número de partículas SÍ adsorbidas	Porcentaje de partículas NO adsorbidas	Porcentaje de partículas SÍ adsorbidas
Recubiertas en el laboratorio	5	7.863 ± 1.598	1.690.074 ± 343.470	6.667.926 ± 343.470	20,22 ± 4,11%	79,78 ± 4,11%

Recubiertas en el laboratorio	7	5.271 ± 174	1.132.950 ± 37.398	7.225.050 ± 37.398	13,56 ± 0,45%	86,44 ± 0,45%
Recubiertas en el laboratorio	9	5.783 ± 2.007	1.242.996 ± 431.388	7.115.004 ± 431.388	14,87 ± 5,16%	85,13 ± 5,16%
Sin recubrir	5	5.221 ± 2.571	1.122.096 ± 552.504	7.235.904 ± 552.504	13,43 ± 6,61%	86,57 ± 6,61%
Sin recubrir	7	4.230 ± 162	909.198 ± 34.818	7.448.802 ± 34.818	10,88 ± 0,42%	89,12 ± 0,42%
Sin recubrir	9	3.610 ± 812	775.932 ± 174.528	7.582.068 ± 174.528	9,28 ± 2,09%	90,72 ± 2,09%
Recubiertas por profesionales	5	20.627 ± 1.071	4.433.460 ± 230.088	3.924.540 ± 230.088	53,04 ± 2,75%	46,96 ± 2,75%
Recubiertas por profesionales	7	27.070 ± 798	5.818.422 ± 171.522	2.539.578 ± 171.522	69,62 ± 2,05%	30,38 ± 2,05%
Recubiertas por profesionales	9	18.884 ± 5.861	4.058.928 ± 1.259.760	4.299.072 ± 1.259.760	48,56 ± 15,07%	51,44 ± 15,07%

Las muestras de la primera réplica se analizaron dos veces con el citómetro: una inyectando muestra durante 30 segundos y la otra, durante 60 segundos. Esto permite conocer cuál es el error de medición del citómetro, el cual se sitúa entre un 1 y un 3%, con un valor medio del 2%, aproximadamente. Sin embargo, las otras dos réplicas únicamente se analizaron una vez, con un tiempo de inyección de 1 minuto. Los datos de la Tabla 6 se han calculado con las partículas detectadas al inyectar las muestras durante 60 segundos.

El error producido en el recuento de partículas y, por lo tanto, en el cálculo del porcentaje de microesferas adsorbidas al sedimento, entre las muestras de la réplica 1 y 2 es del 12,65%.

Sin embargo, los resultados obtenidos para las muestras de la réplica 3 no se consideran representativos. Por un lado, hay determinados porcentajes de partículas que sí se han adsorbido al sedimento que presentan un valor negativo, concretamente la muestra de partículas recubiertas en el laboratorio a pH = 5 y la muestra recubierta por profesionales a pH = 7. Este valor negativo se obtiene al haber contabilizado un número de partículas que no se habían adsorbido al medio poroso más alto que el número de partículas iniciales. El motivo del exceso en el conteo se debe a que, al analizar los resultados obtenidos en el citómetro, el número de partículas de un tamaño de 5 µm se confundía con el ruido de fondo, posiblemente causado por una contaminación de las muestras o una degradación de las partículas. Dicho exceso en el conteo se puede ver en la Figura 19, donde se observa que no hay una separación entre el ruido de fondo y el pico más alto del histograma, a diferencia de la Figura 18a) anterior.

Por otro lado, las muestras de partículas recubiertas en el laboratorio a pH = 7 y las muestras recubiertas por profesionales a pH = 5 y pH = 9 presentan unos porcentajes de adsorción muy bajos (entre el 6 y 4%), en comparación con los obtenidos en las dos réplicas anteriores. Esto hace que también se consideren que no son valores representativos y, por lo tanto, no se tengan en cuenta como resultados válidos.

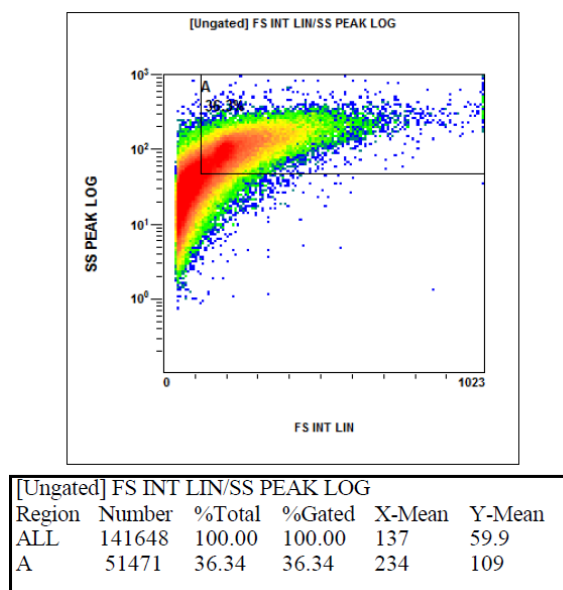


Figura 19: Histograma obtenido mediante citometría de flujo para la muestra de partículas recubiertas en el laboratorio a pH = 5 de la réplica 3

Finalmente, los únicos resultados de la réplica 3 que se pueden considerar representativos son los obtenidos en las muestras de partículas sin recubrir, ya que tienen un porcentaje de adsorción situado entre el 86 y el 91%, valores similares a los alcanzados en las réplicas anteriores. Sin embargo, ninguno de los resultados obtenidos en las nueve muestras de la réplica 3 mediante citometría de flujo se utilizarán para el análisis de los resultados, considerando todo el recuento de partículas de dicha réplica no válido.

Así pues, sin tener en cuenta los valores obtenidos en las muestras de la tercera réplica, la adsorción de las partículas recubiertas en el laboratorio de la universidad se sitúa entre un 75 y un 90%, con un valor medio del 83,78% y una desviación estándar del 2,88%; el de las microesferas sin recubrir se encuentra entre el 79 y el 93%, con una adsorción media del 88,80% y una desviación estándar del 1,71%; mientras que el de las partículas recubiertas por un laboratorio profesional baja a valores de entre 28 y 66%, con un promedio de partículas adsorbidas de 42,93% y una desviación estándar del 9,05%. Dichos valores promedios, resumidos en la Tabla 7, se han calculado considerando todas las medidas de pH porque se ha visto que dicho parámetro no ha afectado significativamente en la adsorción. Para su cálculo, se ha tenido en cuenta el total de partículas contabilizadas, es decir, tanto las partículas individuales de 5 µm, como las partículas que han formado aglomeraciones.

Tabla 7: Porcentaje medio de adsorción de partículas al medio poroso y desviación estándar obtenido mediante citometría de flujo

Tipo de microesfera	Porcentaje medio de adsorción de partículas
Recubiertas en el laboratorio	83,78 ± 2,88 %
Sin recubrir	88,80 ± 1,71 %
Recubiertas por profesionales	42,93 ± 9,05%

Como se ha comentado anteriormente, mediante la citometría de flujo se puede conocer la presencia de aglomeraciones en la muestra. En la Tabla 8 se indica el promedio y la desviación estándar del número de partículas detectadas de 5 μm , del número de aglomeraciones formadas por la unión de 2 partículas, del número de aglomeraciones formadas por la unión de 3 partículas y del porcentaje que representa su presencia en la muestra, obtenidos a partir de los resultados proporcionados por el citómetro.

Tabla 8: Número de partículas de 5 μm y aglomeraciones con sus respectivos porcentajes

Tipo de microesfera	pH	Nº partículas de 5 μm	Porcentaje partículas de 5 μm	Nº aglomeraciones de 2 partículas	Porcentaje aglomeraciones de 2 partículas	Nº aglomeraciones de 3 partículas	Porcentaje aglomeraciones de 3 partículas
Recubiertas en el laboratorio	5	5.636 \pm 896	84,60 \pm 2,02%	896 \pm 255	13,13 \pm 1,42%	145 \pm 64	2,06 \pm 0,58%
Recubiertas en el laboratorio	7	3.854 \pm 572	85,00 \pm 5,34%	529 \pm 135	12,07 \pm 4,03%	120 \pm 43	2,77 \pm 1,20%
Recubiertas en el laboratorio	9	2.213 \pm 1.074	56,72 \pm 6,43%	843 \pm 255	23,53 \pm 2,44%	628 \pm 141	18,14 \pm 3,37%
Sin recubrir	5	3.635 \pm 1.794	83,09 \pm 0,12%	558 \pm 260	12,98 \pm 0,46%	157 \pm 86	3,47 \pm 0,27%
Sin recubrir	7	3.090 \pm 262	84,89 \pm 2,15%	442 \pm 22	12,25 \pm 1,34%	86 \pm 19	2,39 \pm 0,65%
Sin recubrir	9	2.750 \pm 787	86,35 \pm 3,00%	317 \pm 39	10,40 \pm 1,41%	76 \pm 18	2,71 \pm 1,24%
Recubiertas por profesionales	5	16.993 \pm 3.189	89,99 \pm 6,47%	1.119 \pm 471	6,36 \pm 3,26%	466 \pm 393	2,77 \pm 2,42%
Recubiertas por profesionales	7	20.995 \pm 466	88,11 \pm 2,43%	1.976 \pm 232	8,29 \pm 0,93%	708 \pm 267	2,97 \pm 1,11%
Recubiertas por profesionales	9	8.845 \pm 5.364	59,90 \pm 15,39%	2536 \pm 657	20,47 \pm 3,56%	1.656 \pm 272	15,99 \pm 8,66%

Mediante los valores mostrados en la Tabla 8 anterior, se observa que, teniendo en cuenta todos los pH, un 79,85 \pm 11,70% de las partículas detectadas corresponden a partículas individuales con un diámetro de 5 μm . El 13,27 \pm 5,17% hace referencia a la presencia de aglomeraciones formadas por 2 partículas, mientras que tan sólo el 5,92 \pm 5,99% se considera como interacciones de 3 partículas.

6.2. Resultados Microscopio de epifluorescencia

A continuación, en la Tabla 9, se muestra el valor promedio junto con la desviación estándar de los resultados obtenidos mediante el microscopio de epifluorescencia. En ella se encuentra el número de partículas contabilizadas en las imágenes de cada muestra, la cantidad de partículas presentes en la fase líquida y, por lo tanto, el porcentaje de partículas que se han quedado adsorbidas al sedimento.

Tabla 9: Resultados obtenidos mediante el microscopio de epifluorescencia

Tipo de microesfera	pH	Número de partículas contabilizadas	Número de partículas NO adsorbidas	Número de partículas SÍ adsorbidas	Porcentaje de partículas NO adsorbidas	Porcentaje de partículas SÍ adsorbidas
Recubiertas en el laboratorio	5	196 ± 84	981.500 ± 192.500	7.376.500 ± 192.500	11,74 ± 2,30%	88,26 ± 2,30%
Recubiertas en el laboratorio	7	135 ± 0	632.500 ± 66.500	7.725.500 ± 66.500	7,57 ± 0,80%	92,43 ± 0,80%
Recubiertas en el laboratorio	9	164 ± 22	792.000 ± 113.000	7.566.000 ± 113.000	9,48 ± 1,35%	90,52 ± 1,35%
Sin recubrir	5	120 ± 73	612.500 ± 367.500	7.745.500 ± 367.500	7,33 ± 4,40%	92,67 ± 4,40%
Sin recubrir	7	126 ± 14	583.000 ± 86.000	7.775.000 ± 86.000	6,98 ± 1,03%	93,02 ± 1,03%
Sin recubrir	9	105 ± 6	470.500 ± 40.500	7.887.500 ± 40.500	5,63 ± 0,48%	94,37 ± 0,48%
Recubiertas por profesionales	5	1.114 ± 63	5.029.000 ± 191.000	3.329.000 ± 191.000	60,17 ± 2,29%	39,83 ± 2,29%
Recubiertas por profesionales	7	1.080 ± 37	5.131.000 ± 422.000	3.227.000 ± 422.000	61,39 ± 5,05%	38,61 ± 5,05%
Recubiertas por profesionales	9	760 ± 16	3.748.500 ± 104.500	4.609.500 ± 104.500	44,85 ± 1,25%	55,15 ± 1,25%

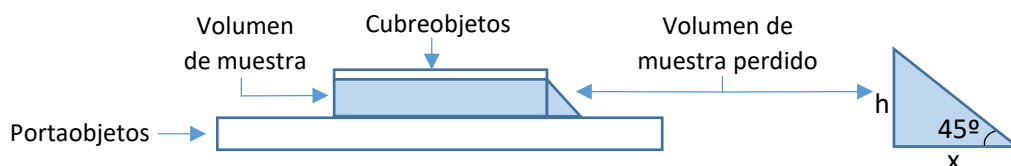
El error cometido en el recuento de partículas y, por lo tanto, en el cálculo del porcentaje que éstas se han adsorbido al sedimento entre las muestras de la réplica 1 y de la 2 es del 6,97%. El error entre las réplicas 2 y 3 es del 17,03%, mientras que dicho error es del 18,22% entre los resultados calculados para las réplicas 1 y 3. En la comparación entre cualquiera de las dos primeras réplicas con la tercera se obtiene un error elevado, hecho que permite sospechar que las muestras de la réplica 3 no se obtuvieron correctamente o se contaminaron durante su análisis. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la réplica 3 no se consideran representativos, al igual que en citometría de flujo.

Observando los resultados de la Tabla 9 se puede afirmar que el porcentaje de adsorción de las partículas recubiertas con proteínas, haciendo el recubrimiento en el laboratorio de la universidad, es de un 85 – 93%, con un valor medio entre las dos réplicas del 90,40% y una desviación estándar de 1,71%. Dicho porcentaje se encuentra entre el 88 y el 97% para las partículas que no tienen recubrimiento proteico, con un promedio de adsorción del 93,36% y una desviación estándar de 0,73%; mientras que las partículas recubiertas por profesionales, su adsorción se sitúa entre el 33 y el 56%, concretamente con una media del 44,53% y una desviación estándar de 7,53%. En la Tabla 10 se resumen los valores medios de adsorción y desviación estándar comentados. Estos valores medios se han calculado considerando todas las medidas de pH, ya que se ha visto que el pH no ha afectado significativamente en la adsorción.

Tabla 10: Porcentaje medio de adsorción de partículas al medio poroso y desviación estándar obtenido mediante el microscopio de epifluorescencia

Tipo de microesfera	Porcentaje medio de adsorción de partículas
Recubiertas en el laboratorio	90,40 ± 1,71%
Sin recubrir	93,36 ± 0,73%
Recubiertas por profesionales	44,53 ± 7,53%

Es importante mencionar que al poner la gota de muestra en el portaobjetos y cubrirla con el cubreobjetos es posible que una pequeña cantidad de muestra se salga por los bordes del cubreobjetos y, en consecuencia, haya pérdida de partículas. No obstante, el volumen de muestra perdido es del 0,3%, porcentaje que se puede considerar despreciable. Sabiendo que el cubreobjetos es de 20x20 mm y que el ángulo de desborde de la muestra es de 45°, los cálculos necesarios para poder obtener el porcentaje de volumen de muestra perdido son los siguientes:



$$2 \text{ cm} \cdot 2 \text{ cm} \cdot h = 12 \mu\text{L} = 0,012 \text{ cm}^3 \rightarrow h = 0,003 \text{ cm}$$

$$\text{tg } 45 = \frac{0,003}{x} \rightarrow x = 0,003 \text{ cm}$$

$$A = \frac{\text{base}(x) \cdot \text{altura}(h)}{2} = \frac{0,003 \cdot 0,003}{2} = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2$$

$$V = A \cdot \text{perímetro del cubreobjetos} = 4,5 \cdot 10^{-6} \cdot 8 = 3,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3$$

$$\% \text{ volumen de muestra perdido} = \frac{V}{\text{Volumen de muestra}} = \frac{3,6 \cdot 10^{-5}}{0,012} = 0,3\%$$

donde:

- A: área del triángulo formado por la muestra perdida al colocar el cubreobjetos
- V: volumen de muestra perdido al colocar el cubreobjetos

Sin embargo, una de las mejoras que se podría aplicar para reducir este error es utilizar portaobjetos de tipo Leja, unos portaobjetos que permiten conocer exactamente el volumen depositado y que evita pérdidas de muestra. En la Figura 20 se puede observar un ejemplo de dicho portaobjetos.

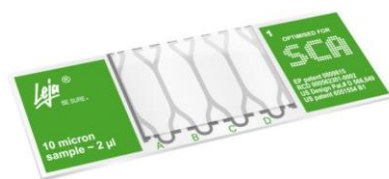


Figura 20: Portaobjetos Leja (Microptic, 2020)

6.3. Resultados Microscopio electrónico de barrido

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos mediante el microscopio electrónico de barrido. En este caso, se muestra el promedio y la desviación estándar del número de partículas contadas en las gotas de 0,5 μ L, del total de partículas presentes en la fase líquida de las muestras y, por lo tanto, del porcentaje de adsorción de partículas al sedimento.

Tabla 11: Resultados obtenidos mediante el microscopio electrónico de barrido

Tipo de microesfera	pH	Número de partículas contabilizadas	Número de partículas NO adsorbidas	Número de partículas SÍ adsorbidas	Porcentaje de partículas NO adsorbidas	Porcentaje de partículas SÍ adsorbidas
Recubiertas en el laboratorio	5	-	-	-	-	-
Recubiertas en el laboratorio	7	-	-	-	-	-
Recubiertas en el laboratorio	9	-	-	-	-	-
Sin recubrir	5	168 \pm 49	1.206.540 \pm 812.065	7.151.460 \pm 812.065	14,44 \pm 9,72%	85,56 \pm 9,72%
Sin recubrir	7	72 \pm 29	1.103.538 \pm 28.538	7.254.463 \pm 28.538	13,20 \pm 0,34%	86,80 \pm 0,34%
Sin recubrir	9	81 \pm 43	792.635 \pm 21.651	7.565.365 \pm 21.651	9,48 \pm 0,26%	90,52 \pm 0,26%
Recubiertas por profesionales	5	422 \pm 234	3.883.926 \pm 614.361	4.474.075 \pm 614.361	46,47 \pm 7,35%	53,53 \pm 7,35%
Recubiertas por profesionales	7	199 \pm 40	3.067.252 \pm 826.627	5.290.749 \pm 826.627	36,70 \pm 9,89%	63,30 \pm 9,89%
Recubiertas por profesionales	9	419 \pm 298	2.889.675 \pm 900.634	5.468.326 \pm 900.634	34,57 \pm 10,78%	65,43 \pm 10,78%

Las muestras de la réplica 3 no se han analizado mediante el microscopio electrónico de barrido, puesto que en las anteriores dos técnicas analíticas se observa que dichas muestras no son representativas.

Los resultados para las muestras de partículas recubiertas con proteínas en el laboratorio de la universidad no se han podido obtener mediante SEM, debido a la imposibilidad del recuento de partículas en las fotografías tomadas. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 21, donde se observa una gran cantidad de restos orgánicos y cristales de sales inorgánicas que cubren las partículas, impidiendo su detección. La elevada cantidad de dichos restos orgánicos (Figura 21a)) se da presente en las muestras de partículas recubiertas en el laboratorio de la UPC y no se observan en las otras muestras debido a la presencia de proteína, la cual no se ha acoplado correctamente a la superficie de las partículas y ha quedado dispersa en el líquido. Las sales inorgánicas presentes y que se observan en la Figura 21b) corresponden mayoritariamente a sodio y cloro, debido a la solución salina utilizada para aportar la fuerza iónica necesaria en la parte experimental; y minoritariamente a potasio y fósforo, por la presencia de PBS utilizada para disolver la proteína.

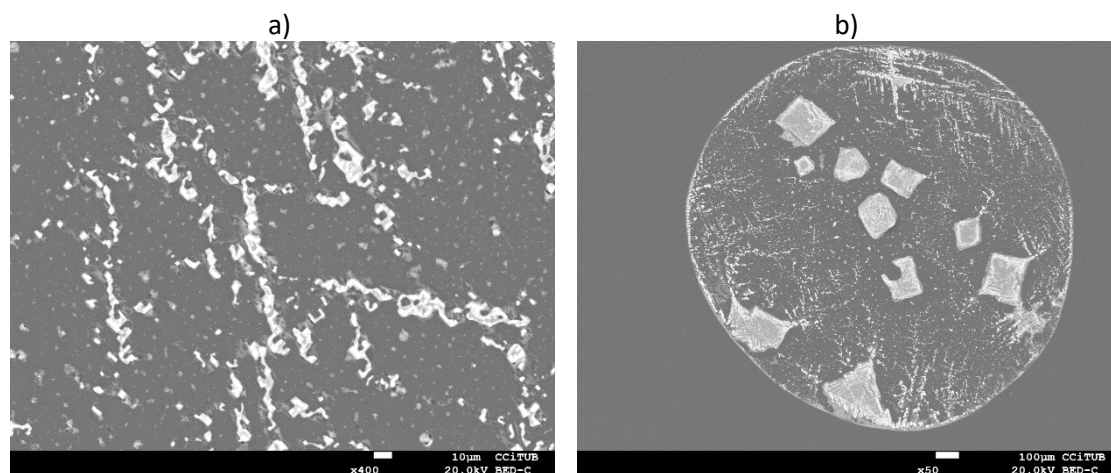


Figura 21: Fotografías captadas de la muestra de partículas recubiertas en el laboratorio a pH = 5 de la réplica 1, a) sección de la gota analizada, donde se observan restos orgánicos y b) fotografía de toda la gota con cristales de sales inorgánicas

El error cometido al realizar el recuento de partículas presentes en las muestras entre la réplica 1 y la réplica 2 es del 16,87%. Sin embargo, el porcentaje de adsorción de las muestras recubiertas por profesionales de la réplica 2 a pH = 7 y pH = 9 son demasiado elevados, en comparación con los resultados obtenidos en las otras dos técnicas. Esta elevada adsorción posiblemente se deba a errores cometidos al coger los 0,5 µL de muestra o a una degradación de las partículas, ya que en las gotas fotografiadas se han contabilizado menos partículas de las que debería haber. No obstante, no considerando el resultado obtenido en dichas muestras para el cálculo del error, éste se obtiene del 11,47%.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente en la Tabla 11, se observa que mediante el microscopio electrónico de barrido se obtiene una adsorción entre el 75 y 95% para las partículas que no presentan recubrimiento proteico, con un valor medio de 87,63% y una desviación estándar de 2,11%. En cambio, este valor de adsorción se sitúa entre el 46 y el 65% para las partículas recubiertas por profesionales, con un valor medio del 60,75% y una desviación estándar de 5,18%. Estos valores medios de adsorción, resumidos en la Tabla 12, se han calculado considerando todos los resultados de los 3 pH, ya que se ha visto que el pH no ha afectado significativamente en la adsorción.

Tabla 12: Porcentaje medio de adsorción de partículas al medio poroso y desviación estándar obtenido mediante el microscopio electrónico de barrido

Tipo de microesfera	Porcentaje medio de adsorción de partículas
Recubiertas en el laboratorio	-
Sin recubrir	87,63 ± 2,11%
Recubiertas por profesionales	60,75 ± 5,18%

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La discusión de los resultados presentados en el capítulo anterior se desarrolla en los siguientes subapartados: 1) comparación de los resultados entre técnicas analíticas; 2) viabilidad del recubrimiento de partículas en los laboratorios de la UPC y 3) procesos de adsorción y efecto del pH.

7.1. Comparación de los resultados de las distintas técnicas analíticas utilizadas

Comparando los resultados obtenidos mediante las técnicas analíticas utilizadas se observa que, en general, las tres técnicas presentan resultados comparables, puesto que éstos se sitúan en el mismo intervalo de confianza (Figura 22). Así pues, las tres técnicas permiten determinar datos cuantitativos comparables.

De manera general, con las tres técnicas analíticas se obtiene que la sorción no es estadísticamente diferente entre las partículas recubiertas en el laboratorio y las partículas sin recubrir; en cambio, sí que se observa una diferencia remarcable con las partículas recubiertas por profesionales. Estos resultados pueden indicar que el recubrimiento realizado en la UPC no ha sido efectivo y el comportamiento de estas partículas es equivalente al de las partículas sin recubrir.

Más detalladamente, analizando la Figura 22 se observa que los resultados obtenidos con el microscopio de epifluorescencia son ligeramente superiores, en comparación con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, para cualquiera de los tres tipos de microesferas estudiados. Sin embargo, en las partículas recubiertas por profesionales, se obtiene una elevada adsorción al realizar el análisis con SEM. Este exceso en la adsorción puede ser causado por un incorrecto recuento de las partículas en las fotografías capturadas mediante dicho microscopio.

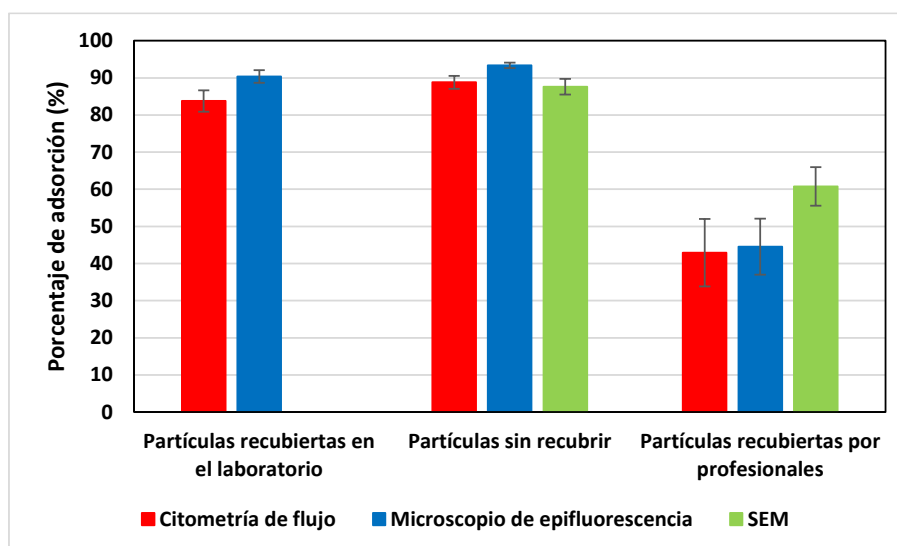


Figura 22: Adsorción media calculada en las distintas técnicas analíticas utilizadas a partir de los resultados obtenidos para todos los pH, ya que se ha visto que el pH no ha afectado significativamente en la adsorción

Aunque las distintas técnicas analíticas han dado resultados similares, presentan diferencias remarcables en lo que se refiere a la gestión de la muestra, resultados obtenidos (a nivel de imágenes), detección de aglomeraciones y tiempo de análisis. A continuación, se comparan dichas técnicas.

- Comparación entre las distintas técnicas: citometría de flujo *versus* microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM)

La ventaja que presenta la citometría de flujo frente a la utilización de ambos microscopios es la rápida velocidad en la que se cuentan las partículas. Mientras que con la primera técnica se ha tardado un minuto por cada muestra en hacer el recuento, con la microscopía se ha necesitado emplear mucho más tiempo. Concretamente, con el microscopio de epifluorescencia se ha tardado, para cada muestra, una hora en capturar las imágenes de 1/4 de la superficie del cubreobjetos más otra hora en analizar esas fotografías y contar las partículas; mientras que con el microscopio electrónico de barrido, se ha necesitado emplear alrededor de 3 horas por cada muestra, ya que es necesario capturar las imágenes manualmente, hacer el montaje de estas imágenes y contabilizar de manera manual las partículas que aparezcan en ellas.

En cambio, la ventaja que presentan ambos microscopios frente a la citometría de flujo es la observación de las partículas físicamente. Es decir, con los microscopios se pueden observar las partículas y si hay aglomeraciones, de manera que, aquello que en el citómetro se supone que son aglomeraciones, los microscopios permiten comprobar si realmente lo son o si se trata de partículas de mayor diámetro. Además, en este caso, las aglomeraciones detectadas en el citómetro se han considerado como la unión de únicamente 2 o 3 partículas, en cambio, mediante la microscopía se puede observar la cantidad de partículas que forman realmente cada aglomeración, permitiendo una mejor cuantificación. No obstante, el recuento no será exacto, pues muchas partículas quedan enmascaradas por otras que se sitúan encima. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 23, donde se observa una imagen capturada con SEM de una aglomeración de, aproximadamente, 38 partículas detectada en la muestra de partículas recubiertas por profesionales a pH = 9 de la réplica 1.

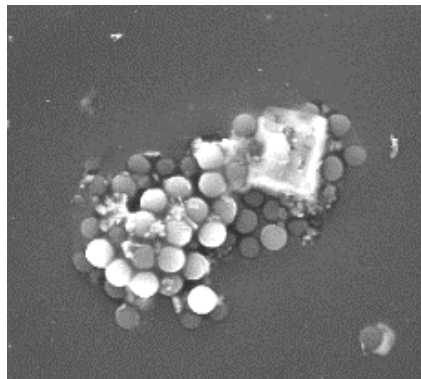


Figura 23: Aglomeración observada con el microscopio electrónico de barrido en la muestra de partículas recubiertas por profesionales a pH = 9 en la réplica 1

Uno de los factores a tener en cuenta en el momento de elegir una técnica u otra es el aspecto económico. En este caso, el equipo utilizado en citometría de flujo y SEM es mucho más caro que el necesario en microscopía de epifluorescencia. Sin embargo, si se contrata el servicio de análisis y, por lo tanto, no es necesario comprar el equipo, el precio de utilización de cada una de las técnicas es similar.

No obstante, pese a las diferencias comentadas entre las tres técnicas, los valores obtenidos en el número de partículas y, por lo tanto, en la adsorción al medio poroso son muy similares. En la Figura 24 se observa el porcentaje de adsorción obtenido mediante las tres técnicas en función del pH para cada tipo de microesfera utilizada.

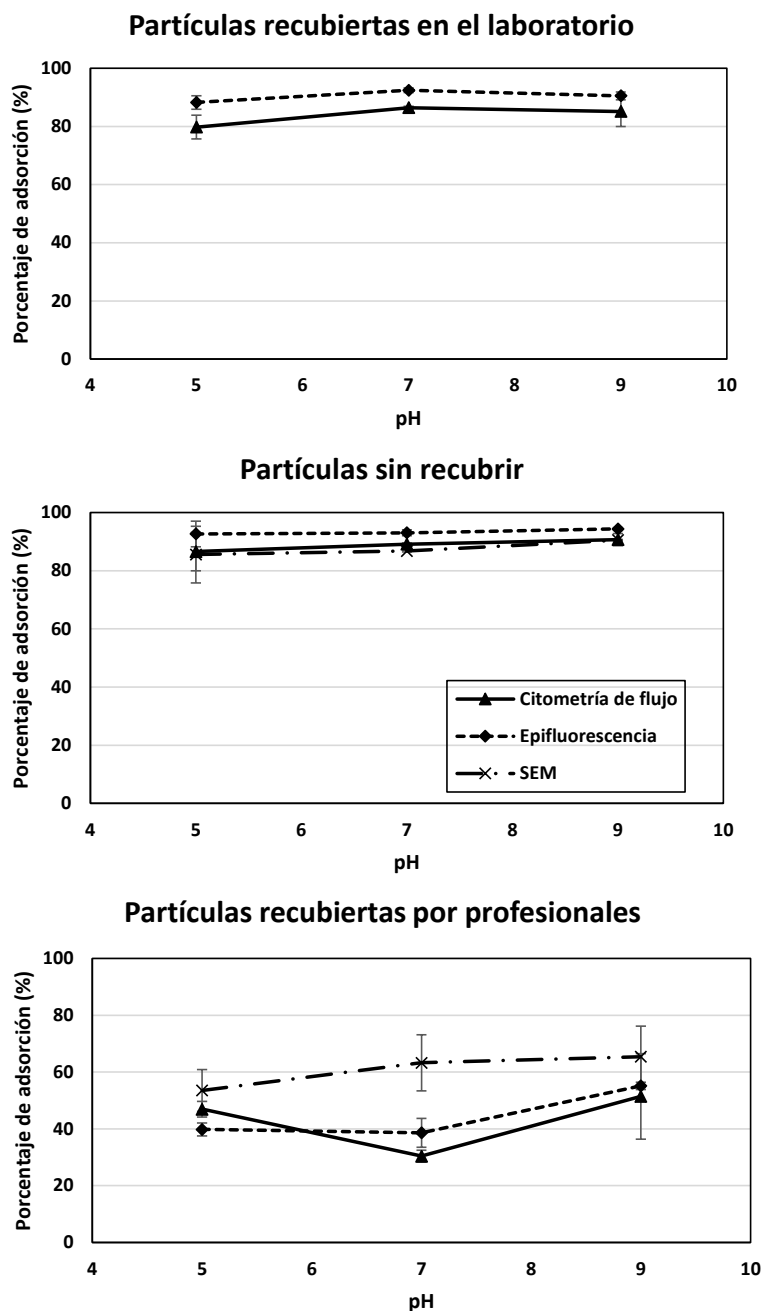


Figura 24: Porcentaje de adsorción en función del pH obtenido con las tres técnicas analíticas para cada uno de los tipos de microesferas

En las Tablas 13 y 14 se recogen las diferencias en el porcentaje de adsorción y el error medio entre las tres técnicas analíticas utilizadas para cada tipo de microesfera estudiada. Tanto las diferencias medias en la adsorción como los errores medios cometidos están calculados considerando los tres pH experimentales, ya que se ha observado que dicho parámetro no ha afectado significativamente a la adsorción.

Tabla 13: Diferencias de los porcentajes de adsorciones obtenidas entre las tres técnicas analíticas para cada tipo de microesfera

Diferencias adsorción (%)	Partículas recubiertas en el laboratorio				Partículas sin recubrir				Partículas recubiertas por profesionales			
	pH 5	pH 7	pH 9	Media	pH 5	pH 7	pH 9	Media	pH 5	pH 7	pH 9	Media
Citometría de flujo y microscopio de epifluorescencia	8,48	5,99	5,40	6,62 ± 1,34	6,10	3,90	3,65	4,55 ± 1,10	7,13	8,22	3,71	6,35 ± 1,92
Microscopio de epifluorescencia y SEM	-	-	-	-	7,11	6,23	3,85	5,73 ± 1,37	13,70	24,69	10,27	16,22 ± 6,15
Citometría de flujo y SEM	-	-	-	-	1,01	2,33	0,20	1,18 ± 0,88	6,57	32,92	13,99	17,83 ± 11,09

Tabla 14: Errores medios obtenidos entre las tres técnicas analíticas para cada tipo de microesfera

ERRORES MEDIOS (%)	Partículas recubiertas en el laboratorio	Partículas sin recubrir	Partículas recubiertas por profesionales
Citometría de flujo y microscopio de epifluorescencia	7,35 ± 1,61%	4,88 ± 1,21%	15,31 ± 6,22%
Microscopio de epifluorescencia y SEM	-	6,58 ± 1,71%	26,77 ± 9,55%
Citometría de flujo y SEM	-	1,36 ± 1,01%	28,55 ± 16,99%

Analizando las Tablas 13 y 14 anteriores, se observa que, para cada comparación de técnicas y cada tipo de microesfera, la menor diferencia en la adsorción se obtiene a pH = 9. Es decir, la adsorción de partículas al sedimento se obtiene de manera más similar entre técnicas cuando el medio es más básico; a excepción de la comparación entre citometría de flujo y SEM en las partículas recubiertas por profesionales, donde la menor discrepancia entre los resultados se obtiene a pH = 5.

Comparando los resultados obtenidos entre el microscopio de epifluorescencia y SEM y entre citometría de flujo y SEM, se observa que la mayor discrepancia entre los resultados obtenidos se da en las partículas recubiertas por profesionales a pH = 7. Esto se debe a la alta adsorción obtenida con SEM en dicho pH, probablemente por algún error metodológico cometido como, por ejemplo, haber cogido mal la gota de muestra o haber realizado un recuento de partículas incorrecto.

Además, observando el comportamiento de cada uno de los diferentes tipos de microesferas se puede afirmar que, en las que se ha cometido un menor error y se ha obtenido una menor diferencia en los resultados entre técnicas y, por lo tanto, una adsorción más parecida, es en las partículas sin recubrir. En cambio, las partículas que han estado recubiertas por profesionales presentan una mayor discrepancia en los resultados obtenidos y un mayor error, sobre todo entre el microscopio electrónico de barrido y las otras dos técnicas. Esto posiblemente es debido

a los errores metodológicos comentados al analizar las muestras con SEM ya que, si únicamente se compara la citometría de flujo y el microscopio de epifluorescencia, los resultados obtenidos para este mismo tipo de partículas entre ambas técnicas no difieren tanto.

- Comparación entre las imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia y SEM

Existen varias diferencias al comparar el microscopio de epifluorescencia con el microscopio electrónico de barrido. Por un lado, el primero ha permitido capturar fotografías de manera automática, a diferencia del segundo, donde la captura de imágenes se ha hecho manualmente. No obstante, existen microscopios de epifluorescencia en los que la captura de fotografías también se debe realizar manualmente.

Por otro lado, se observan diferencias al realizar el conteo de partículas. Mientras que las imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia permiten ser tratadas con el programa Fiji – Image J para realizar un conteo de partículas automático, el conteo automático de las partículas con SEM es más costoso. Esto se debe a que, con el microscopio de epifluorescencia, únicamente se detecta la fluorescencia de las partículas, eliminando así la observación de impurezas de la muestra; a diferencia de SEM, donde en sus imágenes se observa todo aquello que tenga la muestra, como partículas, sales o suciedad. Por este motivo, la automatización para el conteo de las partículas en SEM es mucho más compleja, siendo muchas veces imposible.

En la Figura 25 se muestra una comparación entre las fotografías obtenidas con cada una de las dos técnicas. A la izquierda (a)) se encuentra una imagen obtenida con el microscopio de epifluorescencia, donde cada punto azul corresponde a una partícula. A la derecha (b)) se muestra una imagen obtenida con SEM, en la que se puede observar dos partículas, suciedad, restos del recubrimiento de carbono y otras impurezas.

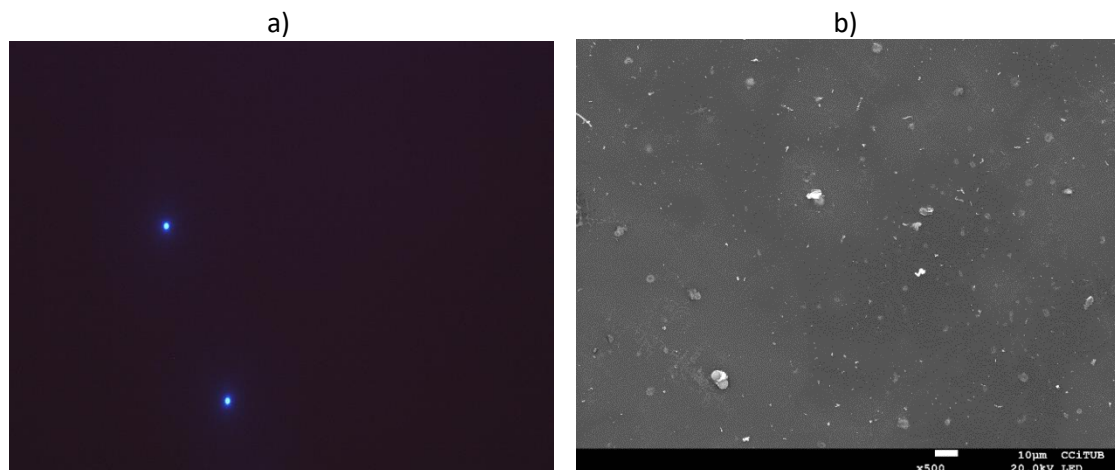


Figura 25: Imágenes de la muestra de partículas sin recubrir a pH = 9 de la réplica 1 obtenidas con a) el microscopio de epifluorescencia y b) el microscopio electrónico de barrido

Otra diferencia observada entre ambas técnicas de recuento de partículas es el estado en la que se observa la muestra. Por un lado, en el microscopio de epifluorescencia se observan las gotas de muestra en estado líquido, mientras que en SEM se deben dejar secar por completo. Por este motivo, en las fotografías de SEM se observan los cristales de sales y la suciedad que pueda tener la muestra, ya que se evapora todo el líquido, precipitando las sales. Esto provoca que algunas partículas puedan quedar enmascaradas por los cristales, impidiendo su visualización, o se

confundan con las impurezas, obteniendo un recuento de partículas en exceso. Esto, sumado al hecho de no observar su fluorescencia, conlleva a un posible recuento incorrecto de partículas.

Finalmente, en cuanto al conteo de las partículas que forman grandes aglomeraciones, las imágenes obtenidas con SEM permiten una mejor cuantificación que las fotografías capturadas con el microscopio de epifluorescencia. Esto se debe a que, con la primera técnica, la superficie de las partículas se observa bien definida; en cambio, en la segunda técnica, la fluorescencia de las partículas aglomeradas impide que se pueda realizar un buen recuento. No obstante, en ambos casos se puede obtener un recuento erróneo al quedar partículas enmascaradas por otras que se sitúen en un plano superior.

Considerando todo lo expuesto anteriormente, la Tabla 15 muestra un resumen de las tres técnicas analíticas utilizadas comparando la cuantificación de partículas en la muestra, las imágenes obtenidas de las muestras, la detección de aglomeraciones, el tiempo de análisis necesario y la interpretación de los resultados.

Tabla 15: Tabla resumen de comparación de las tres técnicas analíticas utilizadas

	Citometría de flujo	Microscopio de epifluorescencia	SEM
Cuantificación de partículas en la muestra	Rápida cuantificación al obtener directamente el número de partículas en la suspensión	Fácil cuantificación, ya que en las imágenes únicamente se observan las partículas	Difícil cuantificación, puesto que se puede obtener un número de partículas erróneo al observar impurezas
Imágenes de la muestra	No se obtienen imágenes de las muestras	Sí se obtienen imágenes y permiten una fácil identificación de las partículas fluorescentes	Sí se obtienen imágenes, pero éstas presentan una difícil identificación de las partículas por la presencia de sales e impurezas
Detección de aglomeraciones	Se puede suponer su presencia, pero no se puede comprobar	Se observan, pero puede costar la cuantificación de partículas que las forman debido a la fluorescencia que presentan	Buena observación y conteo, ya que cada partícula está bien definida. No obstante, algunas quedan enmascaradas por la presencia de partículas en un plano superior
Tiempo de análisis	1 minuto/muestra	2 horas/muestra	3 horas/muestra
Interpretación de los resultados	Fácil interpretación	Fácil interpretación	Fácil interpretación

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que, de las tres técnicas analíticas utilizadas, la menos viable para hacer el recuento de partículas en una suspensión y, por lo tanto, obtener resultados de adsorción, es la microscopía electrónica de barrido. Esto se debe a 1) la dificultad de identificar y cuantificar las partículas en las imágenes capturadas por

la visualización de impurezas, 2) las horas necesarias que se deben invertir para el análisis de cada muestra y 3) las diferencias en la adsorción de partículas al medio poroso obtenidas y el error cometido, ya que han sido mayores que con cualquiera de las otras dos técnicas utilizadas.

En cuanto a la citometría de flujo y el microscopio de epifluorescencia, pese a no haber obtenido grandes diferencias entre las adsorciones calculadas y ambas tener facilidad para la cuantificación de partículas en la muestra y la interpretación de los resultados, se considera que la técnica de análisis más viable para realizar el recuento de partículas en una suspensión es la citometría de flujo. La característica que hace decantarse por dicha técnica es la rápida velocidad de análisis, ya que únicamente se necesita destinar un minuto por cada muestra que se quiera analizar. Por lo tanto, para todos aquellos experimentos en los que el número de muestras sea elevado, la citometría de flujo reduce mucho la inversión de tiempo necesaria para su análisis.

7.2. Viabilidad del recubrimiento de partículas en los laboratorios de la UPC

Comparando los porcentajes de adsorción obtenidos de las partículas recubiertas con proteína en el laboratorio de la universidad con las que no presentan recubrimiento proteico, se puede afirmar que ambas partículas se comportan de manera similar, ya que los dos tipos de microesfera han presentado una adsorción alrededor del 80 – 95% (ver Figura 22).

El hecho de que las partículas que teóricamente deberían tener proteína en su superficie se adsorban al medio poroso de manera prácticamente igual a las partículas que no contienen proteína en su superficie permite afirmar que el proceso de recubrimiento de partículas no se ha realizado correctamente.

Las causas que podrían haber provocado un incorrecto recubrimiento de las partículas se asocian a problemas en la metodología experimental. Por un lado, el incorrecto control de la temperatura en el proceso pudo afectar negativamente a la interacción de la proteína con la superficie de las partículas. Como se comenta en el proceso experimental, para que la proteína se ensamble a la superficie de las microesferas es necesario incubar dicha solución a 20°C, aproximadamente. No obstante, el experimento se realizó a una temperatura de 25-27°C, ya que el proceso se realizó durante el mes de julio con imposibilidad de enfriar el laboratorio y de preparar un baño de agua a la temperatura necesaria durante 21 horas. Si la temperatura es un punto clave en el proceso, esta diferencia de 5-7°C pudo haber provocado que el proceso no se completara correctamente.

Por otro lado, otro posible problema metodológico que pudo causar un mal recubrimiento fue una insuficiente agitación. El sistema utilizado, junto con los tipos de viales en los que se encontraba la solución, no permitía una agitación agresiva. Una posible solución a este aspecto sería utilizar viales herméticos, de manera que permitieran ser colocados en posición horizontal, para así aumentar el volumen en el que se puede agitar la muestra.

Así pues, para mejorar la viabilidad en el proceso de recubrimiento de la superficie de las partículas con proteína, es necesario mejorar el control de la temperatura y el sistema de agitación.

7.3. Procesos de sorción y formación de aglomeraciones: efecto del pH

Los resultados muestran que la adsorción de las partículas estudiada en los experimentos en *batch* no depende del pH en ninguno de los escenarios contemplados (ver Figura 24). Sin embargo, las partículas recubiertas con α_1 -glicoproteína ácida por parte de un laboratorio profesional presentan una menor adsorción al medio poroso que las partículas no recubiertas o

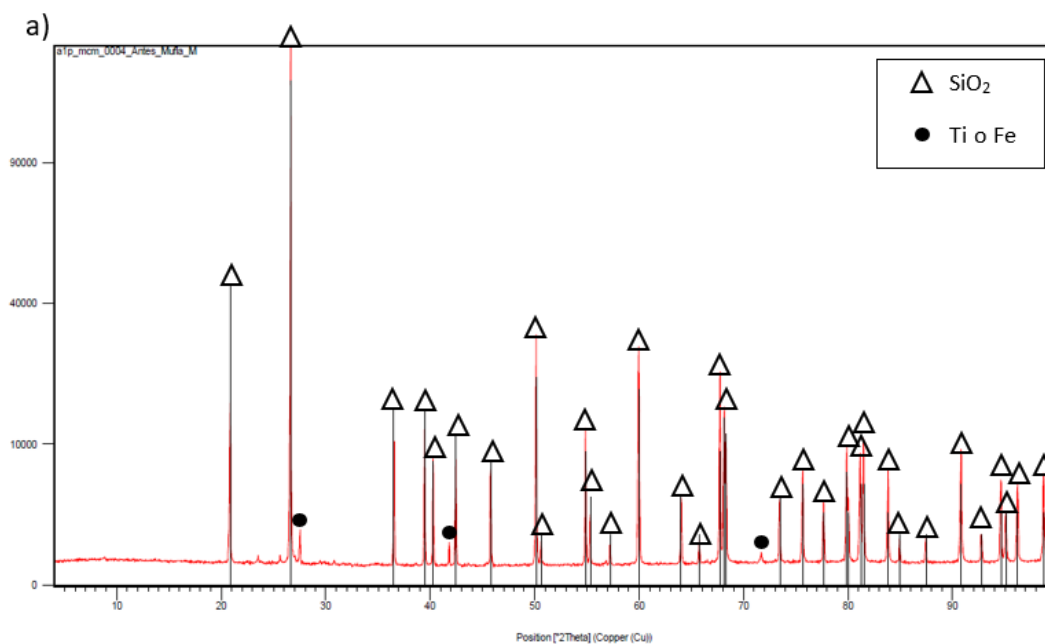
recubiertas en la UPC (Figura 22). Estas observaciones se mantienen en todas las técnicas analíticas utilizadas.

La alta adsorción de las partículas que no están recubiertas con proteínas se debe a una elevada afinidad electrostática entre ellas y el sedimento. Por un lado, las partículas sin recubrimiento están cargadas negativamente, ya que están carboxiladas. Esto significa que su superficie se ha tratado con ácido carboxílico, de manera que presentan cargas negativas localizadas.

Por otro lado, el punto isoeléctrico de la sílice pura (SiO_2) es de 2,9. Esto implica que, a este pH, su carga superficial neta es neutra, es decir, presenta tantos radicales positivos como negativos. Cuando el pH del medio es menor que el del punto isoeléctrico (más ácido), las cargas positivas son superiores a las negativas; por el contrario, si el pH es mayor, la carga superficial neta del SiO_2 es negativa.

En este trabajo, los pH en los que se ha estudiado la adsorción están por encima de $\text{pH} = 2,9$, de manera que la carga superficial neta del cuarzo es negativa en los tres escenarios de pH estudiados, por lo que se esperaría muy poca interacción entre el sedimento de sílice puro y las microesferas.

Sin embargo, a posteriori, se analiza el sedimento utilizado y se observa que la sílice que se empleó en los experimentos no es pura, sino que presenta trazas que se atribuyen a un metal, probablemente titanio o hierro. Para analizar el sedimento, se realizó una difracción de rayos X que permitió observar la existencia de picos no atribuidos a la sílice y que, probablemente, corresponden a dichos metales traza. No obstante, a día de hoy, aún no se han podido analizar con precisión esos picos y se desconoce a qué tipo de metal corresponden. En la Figura 26 se muestran los difractogramas de rayos X obtenidos para el sedimento antes de ser muflado (Figura 26a) y después de ser muflado (Figura 26b)), donde los picos marcados con un triángulo corresponden al óxido de silicio IV, concretamente al SiO_2 con el código de referencia 00-005-0490; mientras los indicados con un círculo son los que podrían corresponder a titanio (Ti) o hierro (Fe).



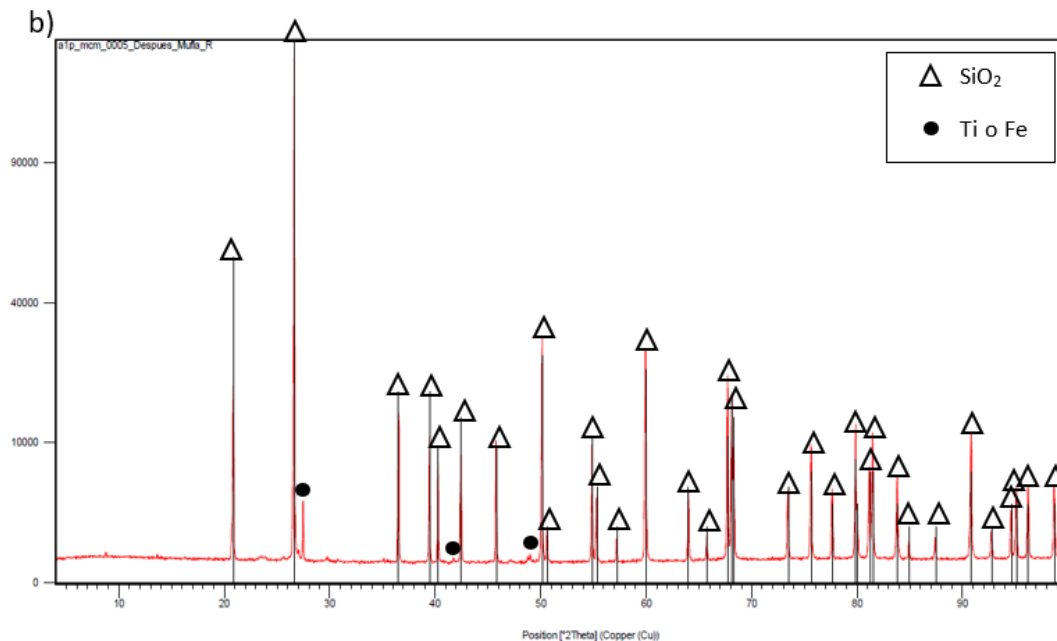


Figura 26: Difractograma de rayos X del sedimento a) antes de ser muflado y b) después de ser muflado

Pese a que no se observan grandes diferencias entre el difractograma del sedimento antes y después del tratamiento térmico aplicado, puede ser que calentarlo a 550°C durante 4 horas haya provocado un cambio en su estructura cristalina o una deshidratación del mineral, manifestándose en un cambio de color. Esta coloración, junto con la difracción de rayos X, ha permitido corroborar que no se trata de cuarzo puro, sino que contiene trazas.

Si las trazas correspondiesen a dióxido de titanio (TiO_2), el punto isoeléctrico de éstas estaría alrededor de 6 – 7 (Appelo & Postma, 2005; Fernández Ibáñez, 2003), de manera que al ser más básico que el del SiO_2 , le aportaría radicales positivos al cuarzo. De igual modo ocurriría si dichas trazas fueran de hierro, pues minerales como la hematita y la goethita presentan un punto isoeléctrico situado entre 8 y 9, aproximadamente (Appelo & Postma, 2005). De esta manera, el sedimento utilizado en los experimentos presentaría en su superficie tanto cargas positivas como negativas.

Debido a las cargas positivas del sedimento y las cargas negativas de las partículas, la elevada adsorción de este tipo de microesferas se justifica por producirse una alta interacción electrostática.

En cambio, las partículas que sí contienen proteína en su superficie se adsorben en menor cantidad, concretamente entre un 40 y un 60%. El motivo de esta baja adsorción se debe a la anisotropía en la distribución de cargas de la proteína (Hartvig et al., 2011).

El punto isoeléctrico de este tipo de microesferas utilizadas lo marca el punto isoeléctrico de la proteína que cubre su superficie y tiene un valor de 2,7, de manera que a los pH estudiados dichas partículas presentan una carga superficial neta negativa. A priori, se debería esperar un comportamiento en la adsorción similar a la de las partículas sin recubrimiento, ya que la carga neta de ambas es negativa. Sin embargo, la adsorción de proteínas a superficies cargadas no se puede explicar a partir de su carga neta, debido a una distribución asimétrica de los grupos de diferente carga en la superficie de la proteína. Es decir, la parte de la proteína que está en

contacto con la superficie de adsorción no lleva, necesariamente, el mismo signo de carga que la proteína general (Hartvig et al., 2011). Por lo tanto, pese a que la carga superficial neta de la α_1 -glicoproteína ácida sea negativa a pH = 5, 7 y 9, es probable que la parte de la proteína que marca la orientación preferida en la adsorción al sedimento contenga cargas positivas y negativas, produciendo una repulsión con las cargas del medio poroso y, por lo tanto, reduciendo su adsorción.

La diferencia en la cantidad de partículas adsorbidas entre las que no están recubiertas con proteína y las que sí lo están es contrario a la hipótesis inicial, ya que en el apartado 3.3.1 se encuentra referenciado un artículo científico en el que se demuestra que las partículas que presentan un recubrimiento proteico se adsorben más al medio poroso que las partículas que no están recubiertas. El motivo que da explicación a este hecho es el tipo de sedimento utilizado. Mientras que Pang *et al.* (2012) utilizan arena como sedimento, en los experimentos de este trabajo se ha utilizado cuarzo. Esta diferencia en el sedimento utilizado supone un cambio en su punto isoeléctrico y, por lo tanto, en las cargas superficiales que presenta. Probablemente, la utilización de otro tipo de sedimento con un punto isoeléctrico más básico que el del SiO₂ haga que la adsorción de las partículas que presentan proteína en su superficie sea mayor que aquellas que no la presentan.

Las partículas que han quedado adsorbidas al sedimento se pueden observar en la Figura 27, la cual se ha obtenido mediante el microscopio de epifluorescencia. Las zonas sombreadas en color marrón son el sedimento, mientras que las partículas son los puntos azules. El sedimento fotografiado corresponde al experimento realizado con la muestra de partículas recubiertas en el laboratorio a pH = 5 de la primera réplica. La alta cantidad de partículas observadas se debe a que, como se ha justificado anteriormente, este tipo de partículas ha presentado una alta adsorción.

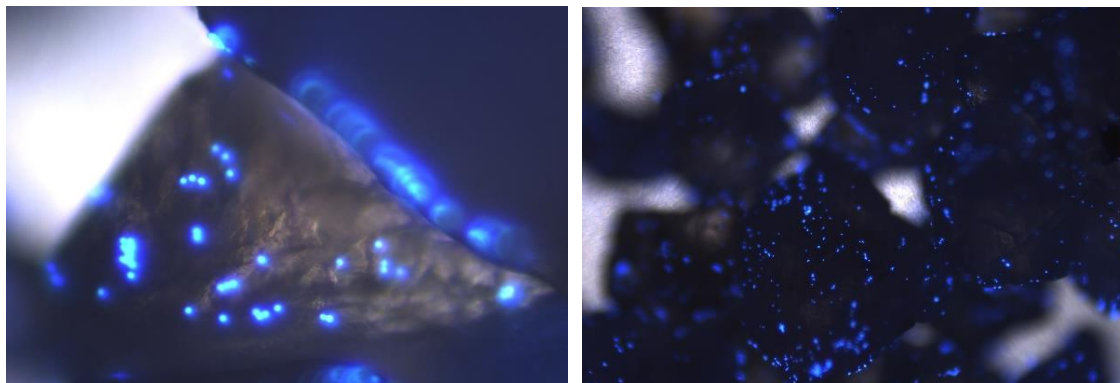


Figura 27: Partículas recubiertas con proteína en el laboratorio a pH = 5 de la réplica 1 adsorbidas al sedimento

7.3.1. Efecto del pH en la sorción entre partículas y sedimentos y en la formación de aglomeraciones

- Sorción entre partículas – sedimento y dependencia con el pH

En general, no se observa una correlación entre el pH del medio y la adsorción de las partículas al sedimento. Sin embargo, en el caso de las partículas recubiertas por profesionales, donde la interacción se produce entre la proteína y el sedimento, se puede observar una pequeña parábola positiva (ver Figura 24), es decir, la adsorción de dichas partículas disminuye al pasar de pH = 5 a pH = 7 y vuelve a aumentar al pasar a pH = 9. Este comportamiento se observa en

los resultados obtenidos mediante citometría de flujo y el microscopio de epifluorescencia y no se da en los resultados obtenidos con SEM. Aunque el error experimental asociado es elevado, este comportamiento se ha observado en otros estudios (Lund & Jönsson, 2005).

Esta relación entre la adsorción de partículas que presentan proteína en su superficie y el pH en forma de parábola positiva se debe a la regulación de carga, una propiedad de las proteínas que indica que la carga de sus grupos ionizables no es constante, sino que se ve afectada por el entorno electrostático en el que se encuentran. Esto, sumado a la capacitancia, es decir, a la cuantificación de las fluctuaciones de carga de una proteína (Lund & Jönsson, 2005), hacen que la adsorción de dichas partículas varíe con el pH.

Más detalladamente, aquellas proteínas que en su secuencia de aminoácidos presentan altas cantidades de ácido aspártico y ácido glutámico, la capacitancia aumenta hasta un valor de pH = 4, a partir del cual empieza a disminuir. Pero, si también contienen grandes cantidades de lisina y arginina, dicha capacitancia alcanza un nuevo máximo a pH = 11, aproximadamente (Lund & Jönsson, 2005). De esta manera, representando la capacitancia en función del pH, la curva obtenida indica que la fluctuación de carga de una proteína con dichos aminoácidos disminuye al pasar de pH = 5 a pH = 7 y vuelve a aumentar cuando el medio pasa a ser más básico, a pH = 9, generando una curva en forma de U.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la α_1 -glicoproteína ácida (Dente et al., 1985) y sabiendo que tiene gran cantidad de ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina, se puede suponer que su capacitancia en función del pH del medio seguirá la curva descrita.

De esta manera y relacionándolo con la correlación entre la adsorción de microesferas recubiertas con proteína y el pH, se puede justificar que la α_1 -glicoproteína ácida presenta mayor adsorción a sedimentos a aquellos pH en los que la capacitancia es mayor y, consecuentemente, se ha producido una mayor regulación de sus cargas.

Sin embargo, es probable que el patrón de adsorción de partículas al medio poroso en función del pH sea diferente al descrito si los pH estudiados fueran otros. Es decir, el punto isoeléctrico de la proteína utilizada es de 2,7, de manera que en los tres pH estudiados la carga neta de la α_1 -glicoproteína ácida es negativa. Pero, si los pH en los que se hubiera realizado la parte experimental hubieran sido inferior y superior al punto isoeléctrico, la correlación entre la adsorción y el pH del medio hubiera sido diferente, pues se hubiera estudiado un rango de pH en los que la carga superficial neta de la proteína pasa de ser positiva a negativa. Además, el comportamiento de la capacitancia a dicho rango de pH sería totalmente diferente al comentado anteriormente. No obstante, estudiar pH por debajo del punto isoeléctrico no tiene cabida en este trabajo, ya que el medio representado son las aguas subterráneas y éstas no presentan un pH tan ácido.

En cambio, en los resultados obtenidos para las partículas que no presentan recubrimiento proteico – tanto las que están sin recubrir como las que se le ha hecho el recubrimiento en el laboratorio de la universidad – se observa que su adsorción al medio poroso es prácticamente constante en los tres pH. Esto se debe a que, al no tener proteínas en su superficie, la carga de las partículas siempre se mantiene constante. Este comportamiento también se puede observar en la Figura 24 anterior.

- Formación de aglomeraciones y dependencia con el pH

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se ha observado que la formación de aglomeraciones entre las partículas con recubrimiento proteico depende del pH. Concretamente, se observa que a medida que el medio es más básico, la interacción entre partículas recubiertas por profesionales aumenta.

En la Figura 28 se muestra el gráfico en el que se compara el porcentaje medio de aglomeraciones en función del pH de la muestra de partículas recubiertas por profesionales. En dicho gráfico se encuentra la línea de tendencia y el coeficiente R^2 , superior a 0,8, valor con el que se puede considerar que hay una buena correlación entre los dos parámetros. Así pues, a partir de este análisis se puede afirmar que hay una dependencia entre la formación de aglomeraciones y el pH, es decir, que a medida que aumenta la basicidad del medio, la interacción entre partículas se ve favorecida.

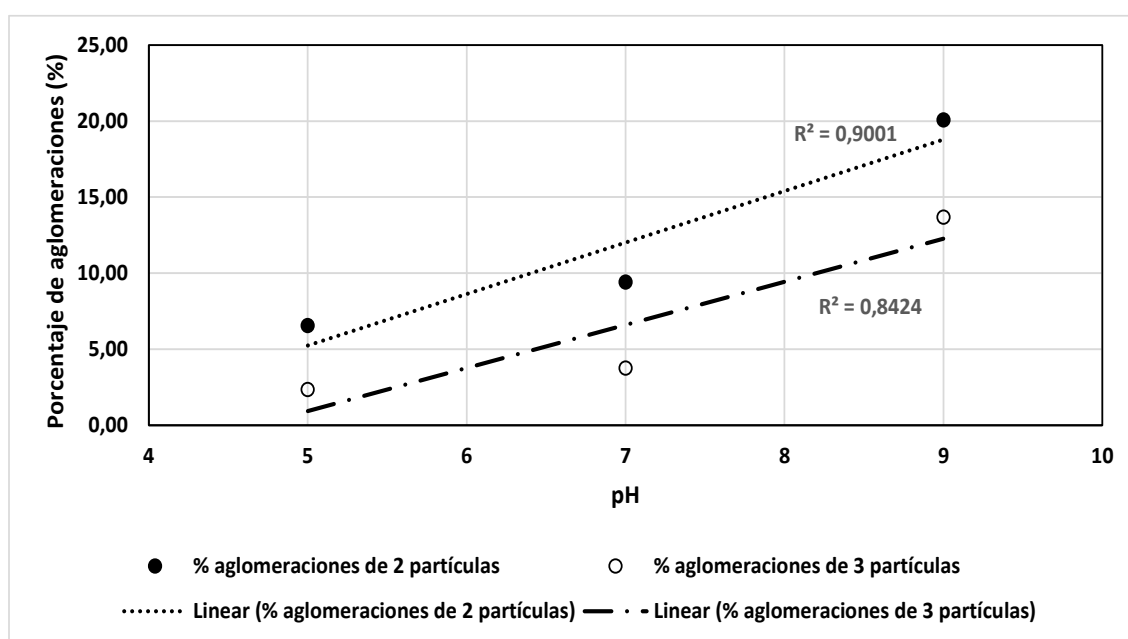


Figura 28: Porcentaje medio de presencia de aglomeraciones en las muestras de partículas recubiertas por profesionales en función del pH

Las aglomeraciones entre este tipo de microesfera son debidas a la interacción entre proteínas. Grant (2001) estudió que aquellas proteínas que contienen sus cargas repartidas de manera heterogénea y que, por lo tanto, presentan una distribución irregular de sus cargas, reducen la repulsión al encontrarse cerca de proteínas similares, en comparación con aquellas proteínas que tienen las cargas repartidas uniformemente. En este caso, la formación de aglomeraciones indica que se ha producido una baja repulsión entre las proteínas a medida que el pH del medio aumentaba.

Por lo tanto, y dado que la heterogeneidad de carga de una molécula es función del pH (Grant, 2001), el aumento en la formación de aglomeraciones al aumentar el pH se podría deber a que, a medida que el medio se vuelve más básico, la distribución de las cargas de la α_1 -glicoproteína ácida se vuelve más heterogénea y, por lo tanto, su repulsión con la proteína de otras partículas es menor, favoreciendo así su interacción.

8. DISEÑO DE EXPERIMENTOS FUTUROS

El objetivo del trabajo es estudiar el proceso de adsorción de virus al medio poroso y ver qué efecto tiene el pH en esta adsorción. No obstante, este proceso no sólo depende de la acidez del agua subterránea, sino que depende de otros factores como la fuerza iónica o el tipo de sedimento y el contenido de materia orgánica presente en los acuíferos.

El proceso de sorción depende de 1) el sorbato, aquella sustancia que se adsorbe, en este estudio son los virus representados mediante partículas; 2) el sorbente, la fase sólida donde se adsorben los virus, en este caso, el sedimento del acuífero y 3) el medio, representando el agua subterránea.

En este trabajo, el sorbato ha sido representado mediante microesferas de poliestireno carboxilado recubiertas con proteína, concretamente, α_1 -glicoproteína ácida, con un punto isoeléctrico de 2,7. El sorbente se caracteriza por una determinada carga superficial, por una superficie específica y por el material que lo forma, ya sea mineral o materia orgánica. Finalmente, el medio está definido en función del pH y la fuerza iónica que presente.

Así pues, para poder entender al completo el proceso de adsorción de virus al medio poroso de los acuíferos es necesario realizar una serie de experimentos adicionales en los que se vayan modificando los factores que influyen en dicho proceso. Por ejemplo, se plantea utilizar distintos tipos de sedimentos, diferentes valores de pH, varias proteínas para el recubrimiento de las nanopartículas con distintos puntos isoeléctricos, diferentes concentraciones de electrolitos y varias sales que aporten diferentes fuerzas iónicas, ya que se ha observado que la fuerza iónica aportada por sales monovalentes o divalentes puede afectar de una manera u otra a la adsorción.

Por tanto, y con el objetivo de seguir trabajando en esta nueva línea de investigación, se diseña una serie de experimentos *batch* a realizar en el futuro. En concreto, se consideran experimentos a tres pH diferentes: 5, 7 y 9; diferentes sales que proporcionen la fuerza iónica: cloruro de sodio (NaCl) y cloruro de calcio (CaCl_2); y cuatro tipos de sedimentos: sílice (SiO_2), ferrihidrita (FeOOH), calcita (CaCO_3) y materia orgánica. La elección de estos sedimentos se debe a que, por un lado, la sílice presenta un punto isoeléctrico ácido (2,9, aproximadamente), mientras que la ferrihidrita y la calcita tienen un punto isoeléctrico básico (alrededor de 9), de manera que, a los tres pH comentados, se trabajará con cargas netas del sedimento tanto positivas como negativas.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto y sabiendo que todo proceso experimental se debe replicar tres veces, el total de experimentos asciende a 66, ya que la opción del escenario formada por el sedimento de calcita y el pH = 5 no se contempla, pues dicho mineral actúa como tampón, fijando el pH alrededor de 8 y provocando una imposibilidad de bajar dicho parámetro a un valor de 5.

En estos nuevos experimentos, la única técnica de contaje de partículas que se utilizará será la citometría de flujo. Además, los virus no serán representado mediante microesferas, sino que se utilizarán nanopartículas, ya que tienen un tamaño diametral en la escala de los nanómetros, el cual se aproximada más al tamaño de los virus.

Los 66 experimentos comentados se realizarán únicamente con nanopartículas recubiertas con proteínas, para así representar la adsorción de los virus. No obstante, en aquellos escenarios en los que se observe un comportamiento peculiar o de mayor interés para su estudio, también se realizará con nanopartículas sin recubrir y con bacteriófagos. De este modo, se podrá comprobar

que la adsorción de los virus al medio poroso se puede representar de manera más similar mediante nanopartículas con proteína en su superficie y no únicamente con nanopartículas sin modificar. Para poder corroborar que la sorción es similar entre las nanopartículas con recubrimiento proteico y los virus, es necesario utilizar unas partículas que tengan una simetría y un diámetro similar al del bacteriófago utilizado. Además, la proteína elegida para recubrir la superficie de las nanopartículas deberá presentar un punto isoeléctrico próximo al de dicho bacteriófago.

Finalmente, en aquellos escenarios más interesantes, se fijará el tipo de sedimento utilizado, el pH y la fuerza iónica y se realizarán diferentes experimentos en los que se irá modificando la cantidad de partículas suspendidas en la solución. De esta manera, se podrá estudiar qué cantidad de partículas quedan adsorbidas al sedimento en función de la concentración inicial que haya, obteniendo así una isoterma de adsorción.

Por último, en estos futuros experimentos se añadirá un proceso de desorción, con el objetivo de conseguir desorber el máximo número de partículas que hayan quedado adsorbidas al sedimento. De esta manera, no se contarán únicamente las partículas que hayan quedado suspendidas en la fase líquida después de los experimentos *batch*, sino que se cerrará el balance de masa al contabilizar también las partículas adsorbidas.

9. IMPACTO AMBIENTAL

Al realizar un proyecto de investigación, es importante evaluar y tener en cuenta el impacto ambiental que éste supone e intentar reducir todos los efectos negativos que pueda generar su realización. Para ello, la ejecución de la parte experimental debe suponer una generación de residuos mínima, depositándolos y gestionándolos correctamente, un uso del agua únicamente necesario y un consumo eléctrico moderado para evitar la emisión de grandes cantidades de CO₂ a la atmósfera.

En este trabajo, la gestión de los residuos generados no ha supuesto un gran impacto negativo en el medio ambiente, pues la mayor parte de ellos corresponden a soluciones acuosas, las cuales pueden ser vertidas directamente a la línea de saneamiento.

En cuanto a la utilización de agua, su consumo ha sido mínimo ya que, pese a que todas las disoluciones y reactivos preparados han sido acuosos, para realizar los experimentos se han necesitado volúmenes muy pequeños, implicando también un volumen pequeño de agua. Además, ninguno de los procesos llevados a cabo en el laboratorio ha supuesto un consumo contante de dicho recurso.

Finalmente, el consumo eléctrico puede haber provocado un mayor impacto negativo en el medio ambiente, en comparación con la generación de residuos y el consumo de agua. Esto es debido a que, durante el recubrimiento de las partículas con proteína, era necesaria una agitación constante durante 21 horas. Esto, sumado al hecho de que las partículas y la proteína debían almacenarse a 4°C en la nevera y al elevado tiempo que se han estado utilizando los microscopios para capturar las imágenes, el consumo eléctrico necesario ha sido elevado.

Sin embargo, al realizar un proyecto de investigación no hay que considerar únicamente el impacto ambiental negativo que pueda suponer su realización, sino que también es importante tener en cuenta el objetivo que pretende satisfacer y así conocer qué impacto positivo puede tener sobre el medio ambiente.

Como se ha comentado en la introducción, disponer de agua de calidad es sumamente importante para el medio ambiente y la salud de la población, pues un consumo de agua contaminada puede provocar graves enfermedades.

Uno de los contaminantes que pueden estar presentes en las aguas de consumo son los virus. No obstante, conociendo y estudiando los mecanismos de transporte de este tipo de patógenos a través del medio poroso de los acuíferos se podría llegar a establecer un protocolo que ayude a mejorar la gestión de la calidad de las aguas.

Además, actualmente se está viviendo una emergencia sanitaria provocada por el coronavirus de tipo SARS-CoV-2, un virus del cual la información disponible es escasa. Sin embargo, a través del estudio realizado en este trabajo y siguiendo con la investigación, se podría llegar a definir una técnica útil que permitiera trazar el transporte de dicho virus. De esta manera, si este patógeno llega a las aguas continentales y éstas se infiltran en los acuíferos, conociendo la adsorción del SARS-CoV-2 al medio poroso se podría reducir su contenido en las aguas subterráneas y, por lo tanto, evitar la infección de la población producida por el consumo de agua, en caso que se demostrara su trasmisión a través de ésta.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha realizado un estudio experimental de sorción entre virus y sedimentos utilizando partículas recubiertas de proteínas como símiles de virus. Este trabajo se ha llevado a cabo en el laboratorio y ha sido una prueba de concepto que forma parte de una nueva línea de investigación del Grupo de Hidrología Subterránea de la Universitat Politècnica de Catalunya. Una vez realizada toda la parte experimental y analizados los resultados obtenidos, se puede extraer una serie de conclusiones.

En primer lugar, la comparación de los resultados obtenidos mediante las tres técnicas analíticas utilizadas (citometría de flujo, microscopio de epifluorescencia y microscopio electrónico de barrido) ha permitido concluir que, pese a que los resultados obtenidos han sido muy similares, a excepción de alguna réplica o muestra, la citometría de flujo es la mejor técnica que se puede emplear para realizar el recuento de partículas suspendidas en una solución, ya que es la que necesita una menor inversión de tiempo.

En segundo lugar, los resultados obtenidos con las partículas recubiertas en el laboratorio de la Universitat Politècnica de Catalunya se asimilan más a las partículas sin recubrir que a las recubiertas con proteínas por laboratorios profesionales. Por lo tanto, el proceso recubrimiento en la universidad no ha funcionado correctamente, debido a posibles errores experimentales. Éstos se asocian al control de la temperatura y al sistema de agitación.

En tercer lugar, la adsorción de las partículas sin recubrir es muy superior a las partículas que sí presentan una capa superficial de proteína. Concretamente, las primeras se adsorben entre un 80 y un 95%, mientras que las segundas lo hacen entre un 40 y un 60%, aproximadamente.

Este comportamiento es debido a las interacciones electrostáticas entre las cargas superficiales de las partículas y del sedimento. Mientras que el medio poroso presenta cargas positivas y negativas, las partículas sin recubrir presentan únicamente cargas negativas, adsorbiéndose prácticamente todas a los cationes del sedimento. En cambio, las partículas con proteína en su superficie no se han adsorbido tanto, debido a la distribución asimétrica de los grupos de diferente carga de la proteína, ya que es probable que la parte de la proteína adsorbida al sedimento contenga cargas positivas y negativas, produciendo una atracción y repulsión con las cargas del SiO₂.

Este último resultado ha sido contrario a la hipótesis inicial, ya que en los artículos científicos referenciados se refleja una adsorción de partículas sin recubrimiento proteico inferior a la de partículas con dicho recubrimiento. No obstante, este suceso es debido a la utilización de un tipo de sedimento diferente, provocando una carga superficial del medio poroso distinto entre los dos experimentos. Por lo tanto, es necesaria una caracterización intensa del sedimento.

En cuarto lugar, no se ha observado una correlación entre la adsorción y el pH del medio en las partículas sin recubrir; en cambio, sí que se ha observado una correlación (débil) en las partículas recubiertas. Esto es debido a que, por un lado, las partículas sin recubrimiento mantienen su carga superficial constante, de manera que la adsorción al medio poroso es prácticamente regular a cualquiera de los tres pH estudiados. Por otro lado, en las partículas con proteína se ha observado una adsorción en función del pH descrita a través de una parábola positiva, es decir, dicha adsorción disminuía al pasar de pH = 5 a pH = 7 y volvía a aumentar a pH = 9. Debido a la regulación de carga de las proteínas y a su capacitancia, la adsorción de dichas moléculas orgánicas aumenta en aquellos pH en los que se produce una mayor fluctuación de sus cargas.

En quinto lugar, a través de la citometría de flujo se ha detectado una interacción de partículas recubiertas con proteínas en función del pH. Concretamente, se ha producido una mayor formación de aglomeraciones y, por lo tanto, una mayor interacción entre las proteínas de las partículas a medida que aumentaba el pH del medio. Probablemente, el motivo que dé explicación a este hecho es la distribución irregular de las cargas de las proteínas, ya que, cuando dichas cargas están repartidas heterogéneamente, se reduce la repulsión entre proteínas similares. Por lo tanto, la repulsión entre las proteínas de la superficie de las partículas ha ido disminuyendo a medida que el pH del medio se volvía más básico.

En sexto lugar, la realización de todo el trabajo final de máster, desde el recubrimiento de las partículas hasta el recuento de ellas a través de las tres técnicas analíticas empleadas, pasando por la realización de los experimentos *batch*, no ha supuesto un elevado impacto ambiental negativo. En cambio, este trabajo sí puede suponer un gran impacto positivo en el medio ambiente, ya que, a través del estudio del proceso de adsorción de virus al medio poroso de los acuíferos, se puede mejorar la calidad de las aguas subterráneas y evitar futuros brotes epidémicos provocados por un consumo de agua contaminada por dichos patógenos.

Por último, considerando todo el conocimiento generado y las conclusiones de este trabajo, se ha diseñado un conjunto de experimentos a realizar en un futuro próximo como continuación de este trabajo. En estos experimentos se investigará el efecto que tienen sobre la adsorción de nanopartículas recubiertas con proteínas el tipo de sedimento, el pH del medio y la fuerza iónica. De este modo, variando los principales factores que afectan a la adsorción, se podrá estudiar qué efecto tienen en este proceso de transporte y así entenderlo con mayor detalle.

11. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer la confianza depositada en mí por parte de mis tutores: Paula Rodríguez Escales y Xavier Sánchez Vila. Ellos fueron quienes pensaron que yo podría ser una buena alumna para iniciar la nueva línea de investigación en la que estamos trabajando. Además, siempre me han dado apoyo y me han orientado cuando lo necesitaba, involucrándose en el correcto desarrollo del proyecto.

En segundo lugar, me gustaría agradecer la ayuda ofrecida por parte de los profesionales con los que he ido trabajando en la parte experimental y análisis de los resultados. Por un lado, en la Universitat Politècnica de Catalunya, Marta Fernández Gatell ha sido un gran apoyo durante la realización de los experimentos de laboratorio. Por otro, en la Universitat de Barcelona y en los Servicios Científicotécnicos de dicha universidad he recibido una gran ayuda por parte de Jaume Comas en los análisis mediante citometría de flujo, de Francesc Gómez Coloma y Humbert Salvadó Cabré en los análisis con el microscopio de epifluorescencia y de José Antonio Padilla Sánchez y Elena Xuriguera Martín en la utilización del microscopio electrónico de barrido. A todos ellos, muchas gracias por vuestra predisposición a trabajar conjuntamente desde el minuto uno.

Por último, también quiero dar las gracias a mi familia, ya que desde el primer momento han estado conmigo apoyándome, no sólo durante la realización del trabajo final de máster, sino desde el inicio de mis estudios, tanto los obligatorios como los universitarios. Ellos siempre han sabido animarme cuando veían que las cosas no salían como yo quería.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Sandoval, O., Ortiz-Hernández, E., Cruz-Sánchez, M., & Cruz-Chávez, E. (2004). El papel de óxidos de hierro en suelos. *TERRA Latinoamericana*, 22(4), 485–497.
- Alarcón, B. (2017). Contar partículas en una imagen con ImageJ. Crear una macro para automatizar el conteo. *Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC)*, 1–8. [http://www.ibv.csic.es/es/SMicroscopia/Documentos/Contar partículas en una imagen con ImageJ.Crear una macro para automatizar el conteo.pdf](http://www.ibv.csic.es/es/SMicroscopia/Documentos/Contar%20particulas%20en%20una%20imagen%20con%20ImageJ.Crear%20una%20macro%20para%20automatizar%20el%20conteo.pdf)
- Alden, A. (2019). *Quartz, One of the Most Common Minerals on Earth*. ThoughtCo. <https://www.thoughtco.com/all-about-quartz-1440958>
- Appelo, C. A. J., & Postma, D. (2005). Geochemistry, groundwater and pollution. *Geochemistry, Groundwater and Pollution*. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90585-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90585-1)
- Aranberri, I., & Bismarck, A. (2007). Caracterización superficial de minerales arcillosos presentes en los depósitos de crudo. *Real Sociedad Española de Química*, 103(2), 23–27.
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Abad, F. X. (2006). *Survival and Transport of Enteric Viruses in the Environment*.
- Dente, L., Ciliberto, G., & Cortese, R. (1985). Structure of the human α 1-acid glycoprotein gene: Sequence homology with other human acute phase protein genes. *Nucleic Acids Research*, 13(11), 3941–3952. <https://doi.org/10.1093/nar/13.11.3941>
- Espigares García, M. (2006). Virus en aguas de consumo. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 6, 173–189. https://saludpublica.ugr.es/sites/departamentos_files/departamentos_saludpublica/public/inline-files/bc510159f5f2fa3_Hig.Sanid_.Ambient.6.173-189%282006%29.pdf
- Fernández Ibáñez, P. (2003). *Propiedades coloidales de partículas de TiO₂: aplicación al tratamiento fotocatalítico solar de aguas*. Universidad de Granada.
- Gavande, S. A. (1968). *Introducción a la Física de Suelos - Google Libros*. https://books.google.es/books?id=J8cOAQAIAAJ&pg=PA1&lpg=PA1&dq=diferencia+entre+textura+y+superficie+especifica&source=bl&ots=4CCnIDrbx&sig=ACfU3U2INLenLXpzSRcQVaqco8nsSP_Cqg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewjY6tDhpLDoAhUluRoKHfjmA6IQ6AEwAnoECAcQAQ#v=onepage&q=dif
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2007). Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0122-01>
- Grant, M. L. (2001). Nonuniform charge effects in protein-protein interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(14), 2858–2863. <https://doi.org/10.1021/jp0039823>
- Gutierrez, L., Li, X., Wang, J., Nangmenyi, G., Economy, J., Kuhlenschmidt, T. B., Kuhlenschmidt, M. S., & Nguyen, T. H. (2009). Adsorption of rotavirus and bacteriophage MS2 using glass fiber coated with hematite nanoparticles. *Water Research*, 43(20), 5198–5208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.031>
- Hartvig, R. A., Van De Weert, M., Østergaard, J., Jorgensen, L., & Jensen, H. (2011). Protein adsorption at charged surfaces: The role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation. *Langmuir*, 27(6), 2634–2643. <https://doi.org/10.1021/la104720n>
- Hernández, J., & Meurer, E. (1997). Iron Oxides in the Soils: Their Properties and Characterization with Emphasis in Phosphorus Sorption Studies. *Agrociencia*, 1(1), 1–14.

- IARC, W. G. on the E. of C. R. to H. (2007). Human Papillomavirus (HPV) Infection. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321770/>
- Ipohorski, M., & Bozzano, P. B. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e Investigación*, 63(3), 43–53.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. In *Beilstein Journal of Nanotechnology* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1050–1074). Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jurado, A., Bofill-Mas, S., Vázquez-Suñé, E., Pujades, E., Girones, R., & Rusiñol, M. (2019). Occurrence of pathogens in the river–groundwater interface in a losing river stretch (Besòs River Delta, Spain). *Science of the Total Environment*, 696, 134028. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134028>
- Katzourakis, V. E., & Chrysikopoulos, C. V. (2014). Mathematical modeling of colloid and virus cotransport in porous media: Application to experimental data. *Advances in Water Resources*, 68, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2014.03.001>
- Khan Academy. (2020). *Introducción a los virus*. <https://es.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-human-body-systems/hs-the-immune-system/a/intro-to-viruses>
- Kumar, S. (2020). Drug and Vaccine Design against Novel Coronavirus (2019-nCoV) Spike Protein through Computational Approach. *Researchgate.Net*, February. <https://doi.org/10.20944/preprints202002.0071.v1>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Viruses: Structure, Function, and Uses. In *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>
- López-Goñi, I. (2015). *Los virus más grandes del mundo | El rincón de Pasteur | SciLogs | Investigación y Ciencia*. <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/43/posts/los-virus-ms-grandes-del-mundo-13053>
- Lund, M., & Jönsson, B. (2005). On the charge regulation of proteins. *Biochemistry*, 44(15), 5722–5727. <https://doi.org/10.1021/bi047630o>
- Mahdi, K. N. M., Peters, R., van der Ploeg, M., Ritsema, C., & Geissen, V. (2018). Tracking the Transport of Silver Nanoparticles in Soil: a Saturated Column Experiment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229(10), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3985-9>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current Protocols in Immunology*, 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Metcalf, W., & Eddy, C. (2014). Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery, Fifth Edition. In *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery, Fifth Edition*.
- Michen, B., & Graule, T. (2010). Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 388–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>
- Microptic. (2020). *Leja - MICROPTIC Automatic Diagnostic Systems*. <https://www.micropticsl.com/es/productos/fungibles/movilidad-y-concentracion/leja/>
- Ministerio de Sanidad. (2020). *Enfermedad por coronavirus, COVID-19*. <https://www.aemps.gob.es/>

- Negróni, M. (2007). Virus: Generalidades. In *Microbiología Estomatológica - Fundamentos y guía práctica* (p. 636). <https://books.google.es/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA65&dq=definicion+virus&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwinoardipnmAhUM8xQKHQymD3AQ6AEIKTAA#v=onepage&q=definicion+virus&f=false>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *OMS | La OMS publica una revisión de las guías para la calidad del agua potable con el fin de prevenir brotes epidémicos y enfermedades relacionados con el agua*. <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr67/es/index1.html>
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Fichas informativas sobre agentes microbiológicos. *Guías Para La Calidad Del Agua de Consumo Humano*, 271–356.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Agua*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>
- Pang, L., Farkas, K., Bennett, G., Varsani, A., Easingwood, R., Tilley, R., Nowostawska, U., & Lin, S. (2014). Mimicking filtration and transport of rotavirus and adenovirus in sand media using DNA-labeled, protein-coated silica nanoparticles. *Water Research*, 62, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.055>
- Pang, L., Nowostawska, U., Ryan, J. N., Williamson, W. M., Walshe, G., & Hunter, K. A. (2009). Modifying the Surface Charge of Pathogen-Sized Microspheres for Studying Pathogen Transport in Groundwater. *Journal of Environmental Quality*, 38(6), 2210–2217. <https://doi.org/10.2134/jeq2008.0451>
- Pang, L., Nowostawska, U., Weaver, L., Hoffman, G., Karmacharya, A., Skinner, A., & Karki, N. (2012). Biotin- and glycoprotein-coated microspheres: Potential surrogates for studying filtration of cryptosporidium parvum in porous media. *Environmental Science and Technology*, 46(21), 11779–11787. <https://doi.org/10.1021/es302555n>
- Patel, J. P., & Parsania, P. H. (2018). Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites. In *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications* (pp. 55–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1>
- Ryu, W.-S. (2017). Other Negative-Strand RNA Viruses. In *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 213–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800838-6.00016-3>
- Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I., & Bootman, M. D. (2014). Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(10), 1042–1065. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Sasidharan, S., Bradford, S. A., Šimůnek, J., Torkzaban, S., & Vanderzalm, J. (2017). Transport and fate of viruses in sediment and stormwater from a Managed Aquifer Recharge site. *Journal of Hydrology*, 555, 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2017.10.062>
- Schijven, J. F., Hassanizadeh, S. M., Dowd, S. E., & Pillai, S. D. (2000). Modeling virus adsorption in batch and column experiments. *Quantitative Microbiology*, 2(1), 5–20. <https://doi.org/10.1023/A:1010062728286>
- Sim, Y., & Chrysikopoulos, C. V. (2000). Virus transport in unsaturated porous media. *Water Resources Research*, 36(1), 173–179. <https://doi.org/10.1029/1999WR900302>

- Sorensen, J. P. R., Lapworth, D. J., Read, D. S., Nkhuwa, D. C. W., Bell, R. A., Chibesa, M., Chirwa, M., Kabika, J., Liemisa, M., & Pedley, S. (2015). Tracing enteric pathogen contamination in sub-Saharan African groundwater. *Science of the Total Environment*, 538, 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.119>
- Stumm, W., & Morgan, J. J. (1996). *Aquatic Chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. Third edition.*
- Suzan-Monti, M., La Scola, B., & Raoult, D. (2006). Genomic and evolutionary aspects of Mimivirus. *Virus Research*, 117(1), 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.07.011>
- Syngouna, V. I., & Chrysikopoulos, C. V. (2016). Cotransport of clay colloids and viruses through water-saturated vertically oriented columns packed with glass beads: Gravity effects. *Science of the Total Environment*, 545–546, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.091>
- Thermo Scientific. (2020). *Fluorescence Tutorials | Thermo Fisher Scientific - ES.* <https://www.thermofisher.com/es/es/home/support/tutorials.html#vid4>
- Universidad de Alicante. (2011). *Microscopía de fluorescencia y epifluorescencia.* <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-5.pdf>
- Vlasova, I. M., & Saletsky, A. M. (2009). Study of the denaturation of human serum albumin by sodium dodecyl sulfate using the intrinsic fluorescence of albumin. *Journal of Applied Spectroscopy*, 76(4), 536–541. <https://doi.org/10.1007/s10812-009-9227-6>
- Walshe, G. E., Pang, L., Flury, M., Close, M. E., & Flintoft, M. (2010). Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. *Water Research*, 44(4), 1255–1269. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.034>
- Yap, M. L., & Rossmann, M. G. (2014). Structure and function of bacteriophage T4. In *Future Microbiology* (Vol. 9, Issue 12, pp. 1319–1327). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.91>
- Yechezkel, Y., Dror, I., & Berkowitz, B. (2016). Transport of engineered nanoparticles in partially saturated sand columns. *Journal of Hazardous Materials*, 311, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.027>