



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES  
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

*“Estudio de nanopartículas de W en la construcción de un prototipo de un nano(bio)sensor”*

## TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA

EURYDICE CAROLINA ARROYO SAHAGÚN

TUTOR

DRA. AMELIA OLIVAS SARABIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

BAJA CALIFORNIA, MEX. ENERO 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tesis avalada por el comité tutor:

COMITÉ TUTOR:

FIRMA:

Dra. Amelia Olivas Sarabia

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Dr. Enrique Cuauhtémoc Sámano Tirado

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Dr. Juan Manuel Quintana Melgoza

Universidad Autónoma de Baja California

JURADO:

FIRMA:

Dr. Donald Homero Galván Martínez

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Dra. Amelia Olivas Sarabia

Centro de Nanociencias y Nanotecnología

Dr. Luis Enríquez Paredes

Universidad Autónoma de Baja California

Dr. José Manuel Cornejo Bravo

Universidad Autónoma de Baja California

Dr. Alejandro Sánchez González

Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada



## DEDICATORIA

*A Dios.*

Por haberme permitido llegar hasta este punto de mi carrera profesional y haberme dado salud para lograr mis objetivos. Además de ponerme a las personas indicadas en mí camino que me han ayudado a ser la persona que ahora soy.

*A mis Padres.*

Por su apoyo incondicional desde el día de mi nacimiento y que a pesar de las diferencias y mis berrinches siempre han estado a mi lado.

*A mis Hermanos.*

Por ese gran soporte que han sido toda la vida, tanto en las buenas y principalmente en las malas, y sé que estarán para mí en cualquier momento.

*Ustedes son el Sentido de mi Vida.*

"Nada de lo que sucede se olvida aunque tú no puedas recordarlo."  
El viaje de Chihiro

## AGRADECIMIENTOS

Llegado el final de esta tesis, y tras echar la vista atrás, considero injusto que mi nombre sea el único que figure en la portada de esta memoria. Son muchas las personas que han hecho posible que yo esté hoy aquí escribiendo estas líneas. Unas con su trabajo y esfuerzo, otras con su apoyo y cariño. Unas conscientemente, otras sin saberlo. Y todas ellas, sin haber pedido nada a cambio y sin haber desistido nunca en su empeño.

Agradezco el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la realización de la investigación fuera posible.

Correspondo la confianza y el apoyo de mi directora de tesis, Dra. Amelia Olivas Sarabia, para el desarrollo del presente trabajo y por toda la guía y comprensión que me procuró durante todo el tiempo que tengo de conocerla, pues más que una buena tutora una excelente amiga.

Agradezco al Dr. Luis Enríquez Paredes de la UABC por el apoyo brindado para el impulso de esta tesis, en cuanto a la experimentación bacteriana, al Dr. Alejandro Sánchez González del CICESE por su ayuda y recomendaciones. Y especialmente a Marcela Ovalle que fue el faro del siempre difícil primer año de tesis. Ese en el que un recién licenciado deambula por un laboratorio sin comprender nada.

A mis miembros de mi comité tutorial por su amable aceptación, por el tiempo y las recomendaciones vertidas en la investigación: Dr. Enrique Sámano Tirado, Dr. Juan Manuel Quintana Melgoza,

A mis familiares y amigos, por todo el cariño que me han brindado en los momentos difíciles animándome a continuar ante las adversidades y seguir adelante con mi vida profesional cuando desisto. Esos que siempre están en lo bueno y en lo malo, y que uno presume con orgullo. A todos ellos se les echa mucho de menos, y aunque piensen que no han contribuido a esta tesis, lo han hecho de forma decisiva.

Seguro que me olvido de alguien. Mil perdones por adelantado.

Mi gratitud a todos los técnicos y personas que laboran en el centro de Nanociencias y Nanotecnología – UNAM, por su apoyo y por hacerme pasajera mi estancia, a Eric Flores Aquino, por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo.

# ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE.....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
SIGLAS Y ABREVIATURAS .....	IX
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo I. Marco Teórico .....	5
1.1 Hipótesis .....	5
1.2 Objetivo general. ....	5
1.3 Objetivos específicos.....	5
1.4 Metas. ....	5
1.5 Antecedentes.....	6
1.5.1 Estado del arte de nanociencia y nanotecnología .....	6
1.5.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras y aplicaciones .....	7
1.5.3 Propiedades del tungsteno y el óxido de Tungsteno.....	8
1.5.3.1 Propiedades del tungsteno.....	8
1.5.3.2 Óxido de Tungsteno.....	10
1.5.3.2.1 Trióxido de tungsteno.....	12
1.5.3.2.2 Nanoestructuras de WO <sub>3</sub> .....	14
1.5.4 Vitamina B <sub>12</sub> .....	15
1.5.4.1 Estructura química de la vitamina B <sub>12</sub> .....	15
1.5.4.2 Causas de la deficiencia de cobalamina .....	17
1.5.5 Biosensor .....	18
1.5.5.1 Nanobiosensores electroquímicos.....	23
CAPITULO II. Desarrollo Experimental .....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Cepa bacteriana <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	24
2.1.2 Cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.1.3 Medios de cultivo y soluciones.....	26
2.2 Métodos .....	29
2.2.1 Métodos espectrofotométricos para curva de crecimiento bacteriano.....	29
2.2.1.1 Táctica de la curva de crecimiento de la <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	29
2.2.1.2 Táctica de la curva de crecimiento de la <i>Escherichia coli</i> .....	30
2.2.2 Bioensayo de toxicidad por WO <sub>3</sub> en cultivos de <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> . ....	30
2.2.2.1 Cultivos en caldos de triptona con óxido de tungsteno.....	30
2.2.2.2 Cultivos en agar BHI con óxido de tungsteno .....	31
2.2.3 Preparación de muestras para SEM .....	32
2.2.4 Sensor bacteriano.....	33
2.2.4.1 Características del sensor bacteriano adoptado.....	33

2.2.4.2 Técnica de fijación bacteriana en la membrana de grenetina. ....	34
CAPÍTULO III. Resultados y Discusiones.....	35
3.1 Obtención de las curvas de crecimiento bacterianas .....	35
3.1.1 Curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> .....	35
3.1.2 Curva de crecimiento para <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	36
3.2 Resultados de toxicología .....	37
3.3 Análisis de espectros por EDS .....	40
3.4 Discusión del sensor bacteriano.....	44
CAPÍTULO IV. Conclusiones.....	46
LITERATURA CITADA.....	47
ANEXOS .....	52
A.1 Revivir el cultivo liofilizado .....	52

**LISTA DE TABLAS**

TABLAS	PÁGINAS
Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas selectas del tungsteno .....	10
Tabla 2. Información de los estados cristalinos del $WO_3$ .....	12
Tabla 3. Derivados de la cobalamina .....	15
Tabla 4. Requerimientos diarios de vitamina $B_{12}$ por grupo de edades .....	16
Tabla 5. Las causas de deficiencia de vitamina $B_{12}$ .....	17
Tabla 6. Composición del medio BHI.....	26
Tabla 7. Composición del medio con triptona .....	27
Tabla 8. Composición del caldo LB.....	27
Tabla 9. Composición de la solución ringer 1/4 .....	28
Tabla 10. Composición de la solución PBS .....	29

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINAS
Figura 1. Patente No. 223 898 .....	9
Figura 2. Sistema tungsteno-oxígeno .....	11
Figura 3. Estructura cristalina de $WO_3$ .....	12
Figura 4. Comparación de los diferentes óxidos utilizados en la detección de gases .....	14
Figura 5. Estructura química de la cobalamina. ....	16
Figura 6. Esquema básico de funcionamiento de un biosensor .....	19
Figura 7. Tipos de biosensores .....	20
Figura 8. Esquemas de inmovilización de una biomolécula .....	22
Figura 9. <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	24
Figura 10. Micrografía de la bacteria <i>Escherichia coli</i> . ....	25
Figura 11. Electrodo de oxígeno multicátodo con frente plano con ampliaciones al 50 % .....	33
Figura 12. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .....	35
Figura 13. Curva de crecimiento de la bacteria <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	36
Figura 14. Sembrado de placas por la técnica A. ....	37
Figura 15. Sembrado de placas por la técnica B.....	37
Figura 16. Micrografías de SEM para las muestras bacterianas con $WO_3$ .....	38
Figura 17. Micrografías de SEM para las partículas de $WO_3$ .....	39
Figura 18. Micrografías de SEM de los bacilos de la <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> .....	39
Figura 19. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 10 mg de $WO_3$ .....	40
Figura 20. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 25 mg de $WO_3$ .....	41
Figura 21. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 50 mg de $WO_3$ .....	42
Figura 22. Espectro de EDS de las partículas de $WO_3$ .....	42
Figura 23. Espectro de EDS de la bacteria <i>Tetrasphaedra duodecadis</i> . ....	43
Figura 24. Respuestas de la <i>E. coli</i> a la adición de $V_{B12}$ sin $WO_3$ .....	44
Figura 25. Respuestas de la <i>E. coli</i> a la adición de $V_{B12}$ con $WO_3$ . ....	45

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
$L$	Longitud	mm
$M$	Molaridad	$\frac{\text{mol}}{\text{l}}$
$T$	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
$t$	Tiempo	s
$V$	Volumen	ml

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
$\alpha$	Ángulo del cristal	grado
$\beta$	Ángulo del cristal	grado
$\gamma$	Ángulo del cristal	grado

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
a. C.	Antes de Cristo
$\text{cm}^3$	Centímetros cúbicos
conc.	Concentrado
d. C.	Después de Cristo
eV	Electrón volt
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
K	Grados Kelvin
$\mu\text{l}$	Microlitro
mA	Miliamperes
ml	Miligramos
mg	Mililitro
Pa	Pascales
$\text{V}_{\text{B12}}$	Vitamina B12
W	Watts

## Siglas

Sigla	Término
AFC	Aerosol flow condensation
ATCC	American type culture collection
ALD	Atomic layer deposition
CVD	Chemical vapor deposition
CFU	Colony forming units
CPD	Critical point drying
EDS	Energy dispersed spectroscopy
HMDS	Hexamethyldisilazane
HRTEM	High resolution transmission electron microscopy
LVCC	Laser vapor controlled condensation
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PTFE	Polytetrafluoroethylene (Teflón)
RGC	Reactive gas condensation
SEM	Scanning electron microscope
SWNT	Single wall nanotube
TEM	Transmission electron microscopy
VLS	Vapor-liquid-solid

## RESUMEN

Actualmente, los óxidos metálicos compuestos por nanogranos (nanoaglomerados o nanocúmulos) son muy importantes, no sólo como conocimiento fundamental, sino también desde un punto de vista industrial debido a las numerosas aplicaciones en varios dispositivos electrónicos. Por ejemplo, en el campo de los sensores de gas la relación superficie-volumen de las capas basadas en nanogranos de óxidos metálicos, ofrece la posibilidad de mejorar las propiedades de detección de estos dispositivos. Por esta razón, gran parte del total de la investigación y desarrollo en el campo de los sensores de gas basados en óxidos metálicos está dirigida a obtener capas activas compuestas por nanogranos.

Por otro lado, la vitamina B<sub>12</sub> desempeña un papel clave como coenzima en la síntesis de DNA y en la maduración celular, así como en la síntesis de lípidos neuronales. El organismo humano es incapaz de sintetizarla por lo que debe ser aportada por los alimentos (carnes, leche y derivados, huevos, pescados). Los métodos tradicionales para cuantificar los niveles de Vitamina B<sub>12</sub> en el humano son costosos y requieren de mucho tiempo para llevarlos a cabo, lo que los hace poco prácticos en la obtención de un diagnóstico rápido que permita establecer el tratamiento adecuado cuando hay deficiencia. El presente estudio exploró el potencial del uso de *Tetrasphaedra duodecadis*, bacteria que teóricamente cataboliza de forma específica a la vitamina B<sub>12</sub>, como componente de un sensor para la cuantificación de esta molécula, cuya degradación aeróbica fue medida a través de un electrodo de oxígeno de Clark modificado. Al soporte de la bacteria le adicioné partículas de WO<sub>3</sub> y comprobé la no toxicidad de este material hacia la bacteria. En general, la adición del óxido dió como resultado mayor sensibilidad, rapidez de respuesta y amortiguamiento de la señal.

*Palabras clave:* trióxido de tungsteno, nanogranos, *Tetrasphaedra duodecadis*, sensor de gas.



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el prefijo '*nano*' es de uso común, se utiliza en la descripción de aparatos electrónicos de uso personal, así como en reproductores de música, televisores y monitores, computadores, pasando por software, herramientas eléctricas y dispositivos de seguridad. Cuando se discute de ciencia o tecnología en cualquier foro especializado es prácticamente imposible que se prescinda de esta palabra.

El término '*nano*' es un prefijo matemático, con valor a  $10^{-9}$  (o 0.000000001 veces). Cuando se habla de nanotecnología, nanociencia y nanomateriales, se hace referencia a que una de las tres dimensiones del material u objeto de estudio en cuestión se encuentra en la escala de los nanómetros [1].

La investigación en materiales nanoestructurados está motivada por la creencia de que la capacidad de controlar los bloques de construcción o nanoestructura de los materiales puede resultar en mejores propiedades en la macroescala dando mayor o menor dureza, ductilidad, campo magnético, la mejora catalítica, la absorción selectiva, o una mayor eficiencia electrónica o comportamiento óptico.

Este interés por la escala nanométrica tiene un fundamento muy fuerte y especial: los materiales micrométricos poseen propiedades que no difieren de las que tiene su contrapartida volumétrica ("bulk" en la literatura anglosajona). En cambio, los materiales nanoestructurados presentan generalmente cualidades muy distintas a las del sistema macro, tanto en términos de magnitudes como de tipos de propiedades, como por ejemplo: los puntos de fusión y constantes de red de los sistemas nanopartículas son menores que en la gran escala ya que el número de átomos o iones existentes en la superficie pasa a ser una cantidad considerable del total de átomos o iones, lo que conlleva a que la energía en la superficie juegue un papel importante en la estabilidad del sistema [2,3].

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas y estructuras, pero es importante hacer una diferenciación entre aquellos métodos que son '*químicos*' (en los que la producción de nanoestructuras se debe principalmente a reacciones químicas en condiciones especiales de presión, acidez, temperatura, etc.) y aquellos que son '*físicos*' (es decir, la producción de nanopartículas se debe mayormente a fenómenos físicos). Entre los métodos de

producción químicos los más utilizados son: el método sol-gel [4,5], el depósito químico en fase de vapor (CVD) [6], el método hidrotérmico [7], entre otros. De los procesos de producción física podemos destacar: la condensación controlada por evaporación láser (LVCC) [8], y la ablación por haz de electrones [9].

Los diversos semiconductores de óxido metálico como  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{WO}_{3-x}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{MoO}_3$ , y  $\text{TiO}_2$ , se han utilizado ampliamente para la detección de gases tóxicos como el  $\text{NO}_x$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{SO}_x$  [10,11,12,13]. Estos materiales han demostrado resistencia a los ataques químicos presentando una estabilidad tanto térmica como física. Además que, poseen una estructura única en los granos, en los límites de grano y en las propiedades de los poros, que los hacen adecuados para el empleo de sensores [14].

En los últimos años, diversos materiales nanoestructurados como nanohilos, nanotubos y nanocintas, han sido evaluados como candidatos ideales para aplicaciones de sensores de gas por sus grandes valores de superficie específica. A través de una extensa investigación de varios semiconductores de óxido metálico, el óxido de tungsteno ( $\text{WO}_{3-x}$ ), con una banda prohibida de 2.6–2.8 eV [15] y comportamiento semiconductor tipo  $n$ , ha demostrado ser un material prometedor para la detección de gases tóxicos [16,17].

El mecanismo de detección está basado en los cambios en la conductividad eléctrica de los óxidos metálicos en presencia de gases tóxicos y oxígeno debido a las reacciones catalíticas de óxido/reducción que ocurren en la superficie de los óxidos metálicos. Por lo tanto, el aumento de la superficie activa de los semiconductores de óxido conduce a la mejora de la detección de los gases [18,19]. La sensibilidad hacia el gas está determinada por los procesos que ocurren en la superficie, es decir, por adsorción de las moléculas de gas y las reacciones en la superficie con los iones quimisorbidos de oxígeno. Por consiguiente, los cambios de resistencia eléctrica son reversibles en un sensor bajo la acción del gas detectado [20].

Específicamente, el trióxido de tungsteno ( $\text{WO}_3$ ), las propiedades físicas y químicas que presenta sugiere el uso potencial de este material en una multitud de aplicaciones como la fotocatalisis, sensor de gas, baterías, fotoluminiscencia, electrocrómico y la foto-oxidación del agua [21]. Existen estudios acerca del tungsteno que proponen la no toxicidad en el ser

humano, ya que la excreción de tungsteno es muy rápida, debido a la poca solubilidad que presenta, con una vida media biológica de unas pocas horas para los tejidos blandos **Fuente especificada no válida.**

Hoy en día, los avances en biosensores basados en semiconductores de óxidos metálicos nanoestructurados son de importancia práctica y teórica en ciencias biológicas, ciencias ambientales y de análisis químico [22]. Como tal son los casos del óxido de magnesio, óxido de zirconio, óxido de titanio, óxido de tungsteno, óxido de hierro, óxido de níquel, óxido de iridio y óxido de cobre [23]. Recientemente, la combinación de moléculas biológicas con nanomateriales, como partículas y nanopartículas de óxidos metálicos, están generando mucho interés, debido en gran parte por la gama de propiedades que presentan estos nanomateriales; impulsando así el interés por llevar a cabo este estudio.

Por otro lado, la cianocobalamina o vitamina B<sub>12</sub> es una molécula que, aunque forma parte del complejo de vitaminas B, presenta en su estructura un enlace carbono-cobalto; (organometálico); que la hace única entre el resto de las biomoléculas. Su desempeño es muy importante en el metabolismo, contribuyendo con el crecimiento, el desarrollo normal del sistema nervioso, la síntesis de glóbulos rojos y el correcto funcionamiento del tracto gastrointestinal.

La naturaleza hidrosoluble de esta vitamina no permite que se almacene y su exceso es rápidamente excretado, por lo que debe ingerirse diariamente. Se le encuentra en cantidades importantes en alimentos de origen animal como la leche, huevos, hígado, pescado y moluscos bivalvos, razón por la que la ocurrencia de cuadros de desequilibrio nutricional es más común en los vegetarianos estrictos.

Si bien el requerimiento diario de vitamina B<sub>12</sub> es muy bajo con respecto al de otras vitaminas (1-2 µg en adultos), su deficiencia, ya sea producto de una baja ingesta o una deficiente absorción, resulta en dos tipos de síntomas clínicos: anemia y disfunción neurológica. En un principio, puede conducir a la aparición de megaloblastos, que es el crecimiento anormal de células que dan lugar a la anemia y de síntomas tales como un cansancio excesivo, dificultad para respirar, apatía y depresión inmunológica. Una deficiencia prolongada conduce a la degeneración del nervio y daño neurológico irreversible, aunque

tratable [24]. De aquí la relevancia de la determinación confiable de los niveles de vitamina B<sub>12</sub>.

De entre los distintos métodos con los que actualmente se cuenta para el diagnóstico de deficiencia en la vitamina B<sub>12</sub>, ninguno de ellos ha sido reconocido como universal, altamente específico o suficientemente sensible. Es por ello que los métodos electroquímicos basados en biosensores representan una alternativa potencial a las técnicas convencionales.

Un biosensor [25] es un dispositivo integrado autónomo, capaz de proporcionar información analítica específica cuantitativa o semi-cuantitativa, que utiliza un elemento biológico de reconocimiento (enzima, célula o tejido) que se mantiene en contacto directo con un elemento de transducción (electrodo). Para el caso particular de biosensores para la cuantificación de vitamina B<sub>12</sub>, que usan a *Escherichia coli* como elemento de reconocimiento, se han reportado varias interferencias asociadas a la baja especificidad de esta especie hacia la vitamina [26].

Para el presente estudio, se plantea el uso de *Tetrasphaedra* (= *Arthrobacter*) *duodecadis*, que requiere indispensablemente de vitamina B<sub>12</sub> para crecer [27,28]. La carencia de información unificada sobre su tasa de crecimiento y sus requerimientos nutricionales, hace necesaria la obtención de datos confiables para poder evaluar la viabilidad y el potencial de esta especie como elemento de reconocimiento biológico en un biosensor que use como transductor un electrodo de oxígeno de Clark modificado.

## Capítulo I. Marco Teórico

### 1.1 Hipótesis

Las bacterias *Tetrasphaedra duodecadis* crecerán en el medio de cultivo con nanopartículas de  $WO_3$  sin complicaciones para el desarrollo de las mismas, comprobándose la no toxicidad del óxido hacia las bacterias. Además le proporcionará estabilidad estructural y electrónica al nano(bio)sensor, lo que se comprobará al tener en un tiempo menor las mediciones, debido a que este compuesto mejorará la transferencia de electrones.

### 1.2 Objetivo general.

Estudiar la compatibilidad de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis* y nanopartículas de óxido de tungsteno  $WO_3$ , para su posterior aplicación en la construcción de un prototipo de un nano(bio)sensor sensible a la vitamina  $B_{12}$ .

### 1.3 Objetivos específicos.

- ✓ Corroborar el crecimiento bacteriano de la *Tetrasphaedra duodecadis* en medio de cultivo que contenga vitamina  $B_{12}$ .
- ✓ Obtener la curva de crecimiento de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis*.
- ✓ Estudiar bioensayos toxicológicos de *Tetrasphaedra duodecadis* con exposición a  $WO_3$ .
- ✓ Definir el modelo de desarrollo bacteriano en las partículas de  $WO_3$ .
- ✓ Establecer una metodología que permita la fijación bacteriana con  $WO_3$  en el electrodo del sensor.
- ✓ Obtención de un prototipo del nano(bio)sensor.

### 1.4 Metas.

- 1.4.1 Lograr un crecimiento de las bacterias en un medio con  $WO_3$ .
- 1.4.2 Aplicar las técnicas SEM para caracterizar la infiltración de la bacteria en el  $WO_3$ .
- 1.4.3 Obtener el grado de Maestro en ciencias.

## 1.5 Antecedentes

### 1.5.1 Estado del arte de nanociencia y nanotecnología

El desarrollo de la nanociencia aparece a mediados de siglo XX, aunque paradójicamente las aplicaciones nanotecnológicas se remontan a tiempos anteriores al concepto de nanociencia, entre los cuales se encuentra la presencia de fulerenos en la tinta india o china conocida por su gran durabilidad (siglo III a.C.) [29], nanotubos de carbono y cementita ( $\text{Fe}_3\text{C}$ ) presentes en el acero de Damasco conocido por su legendarios filo y dureza (siglo XI d.C.) [30], o como el caso del vaso de Licurgo, del antiguo imperio romano, cuya coloración característica se debe a la presencia de nanopartículas de oro y plata y de la orientación de la luz hacia el vaso [31].

Si bien el primer informe 'oficial' de los nanotubos de carbono fue realizado por Iijima en el año 1991, los primeros informes sobre nanoestructuras corresponden a 1952, cuando L. V. Radushkevich y V. M. Lukyanovich publicaron imágenes de 50 tubos de carbono de diámetro nanométrico en el diario oficial de química física en la Unión Soviética, poco después de la invención del microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HRTEM). Este descubrimiento pasó en gran medida inadvertido [32]. Otro ejemplo de que los nanotubos de carbono se han producido y observado bajo una variedad de condiciones desde antes del trabajo de Iijima es el trabajo de Oberlin, Endo, y Koyama publicado en 1976 usando microscopia electrónica de transmisión (TEM), el cual mostró claramente fibras huecas de carbono a escala nanométrica, utilizando depósito químico de vapor (CVD por su sigla en inglés). También informaron sobre un compuesto de nanotubos de una sola pared de grafito, conocido más adelante como nanotubo de pared simple (SWNT) [33].

En 1981 un grupo de científicos soviéticos publico los resultados de la estructura química y caracterización de las nanopartículas de carbono, producidas por una reacción termocatalítica de monóxido de carbono. Usando imágenes TEM y patrones de difracción de rayos x, los autores sugirieron que sus "cristales tubulares de carbono multicapa", fueron formados mediante el enrollamiento de grafeno (monocapas de grafito) en forma de cilindros y que en este tipo de formación son posibles muchos arreglos diferentes de grafito (en forma de redes

hexagonales), planteando dos posibilidades de estas distribuciones: en forma circular (nanotubo sillón) y en forma espiral helicoidal (nanotubo quirál) [34] .

A partir de estos trabajos se organizaron las bases para la nanociencia y la nanotecnología del carbono. Un hito importante, fue el trabajo de M. P. Campbell et. al. [35], en el cual mediante modelamiento matemático de nanotubos de pared simple concluía que estos tenían una resistencia a la tracción de aproximadamente 300 GPa, casi 80 veces mayor que la del acero, convirtiendo a los nanotubos de carbono en un material estructural inigualable.

### 1.5.2 Métodos de síntesis de nanoestructuras y aplicaciones

Existen diversos métodos para la síntesis de nanopartículas y estructuras, pero es importante hacer una diferenciación entre aquellos métodos que son químicos; en los que la producción de nanoestructuras se debe principalmente a reacciones químicas en condiciones especiales de presión, acidez, temperatura, etc., y aquellos que son físicos, es decir, la producción de nanopartículas se debe mayormente a fenómenos físicos.

Entre los métodos de producción químicos los más frecuentemente utilizados son:

- Método sol-gel [4,5]
- Depósito químico en fase de vapor (CVD) [6]
- Método hidrotérmico [7]
- Condensación por flujo de aerosol (AFC) [36]
- Método electroquímico [37]

Ahora, entre los llamados métodos 'físicos' se puede incluir:

- Condensación controlada por evaporación laser (LVCC) [8]
- Ablación por haz de electrones [9]
- Pulverización iónica (Sputtering) [38]
- Descarga de arco [39]
- Método de condensación en gas inerte [40,41,42]

Otra forma de clasificar los distintos métodos de fabricación de nanomateriales y nanoestructuras es de acuerdo al medio de crecimiento y es la siguiente [1]:

- Crecimiento en fase de vapor: por ejemplo, la pirólisis inducida por láser para la síntesis de nanopartículas y depósito de capas atómicas (ALD) para películas delgadas, y la condensación en gas reactivo (RGC).
- Crecimiento en fase líquida: por ejemplo, el procesamiento coloidal para la formación de nanopartículas y, monocapa auto ensamblada.
- Formación en fase sólida: por ejemplo, la segregación de fase para generar partículas metálicas en matriz vítrea y la polimerización inducida por fotones para la fabricación de cristales tridimensionales.
- Crecimiento híbrido: por ejemplo, el crecimiento vapor-líquido-sólido (VLS) para la síntesis de nanoalambres.

### 1.5.3 Propiedades del Tungsteno y el Óxido de Tungsteno

#### 1.5.3.1 Propiedades del Tungsteno

Hasta antes de 1880, el tungsteno o wolframio, W, era muy poco conocido, pero se hizo muy común en la vida cotidiana a raíz del invento de la bombilla eléctrica por Tomás Alva Edison (véase la figura 1)[1].

El tungsteno es un metal de color blanco grisáceo acerado y lustroso; es muy duro y denso, por lo que se usa en soldaduras, en aleaciones con diferentes metales, en bujías de encendido y en las puntas de algunos bolígrafos. No obstante, su principal aplicación es como emisor de luz en los focos, pues por sus propiedades fisicoquímicas, enumeradas en la tabla 1, es el material idóneo para ser utilizado como resistencia en las bombillas eléctricas, pues tiene el punto de fusión más alto de todos los metales puros, la presión de vapor más baja a temperaturas altas y es inerte a los gases de llenado de la bombilla a las temperaturas de operación del foco [43].

---

<sup>1</sup> La invención de la bombilla eléctrica fue disputada por Heinrich Göbel, quien reclamó haber inventado la primera bombilla eléctrica en 1854, usando un filamento de bambú carbonizado (Incandescent, 2008).

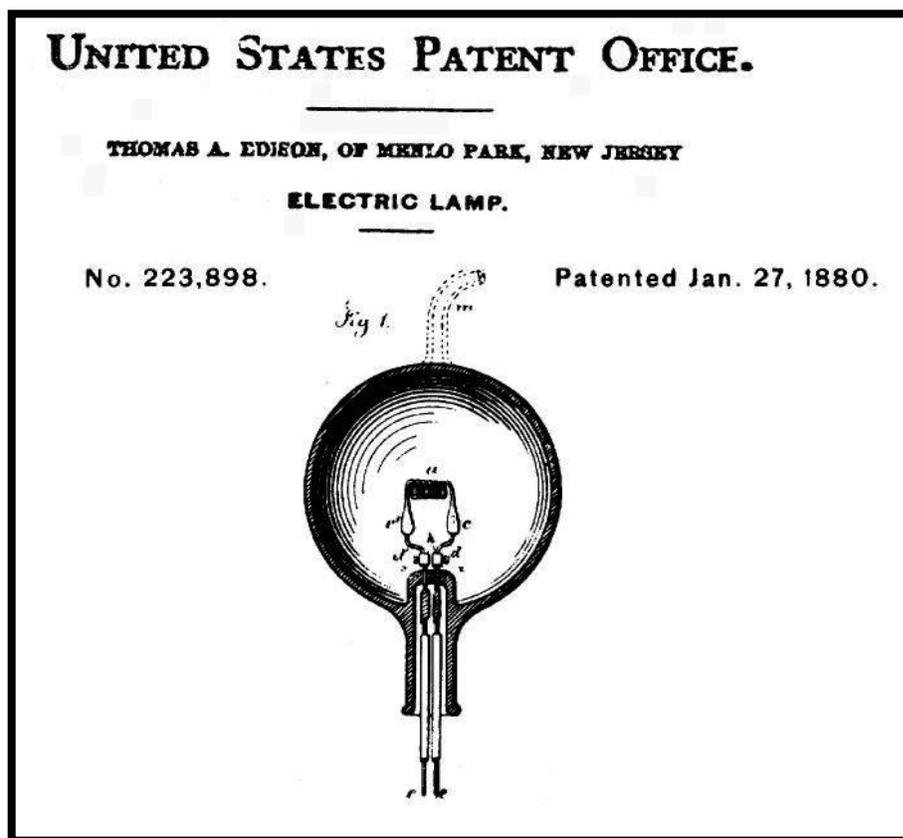


Figura 1. Patente estadounidense de la bombilla eléctrica concedida a Tomás Alva Edison en 1880 (modificado de: Edison, 2008) [43].

El tungsteno es un metal poco reactivo, aún a altas temperaturas, reaccionando solamente con agua regia y soluciones alcalinas y caústicas, poseyendo una excelente resistencia a la corrosión. Se caracteriza por tener el más alto punto de fusión (3 422 °C), la mayor resistencia a la tracción a altas temperaturas y la más baja presión de vapor (133.32 Pa. a 3 990 °C) entre todos los metales existentes y tiene un bajo coeficiente de expansión térmica,  $4.5 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ . En la naturaleza se encuentra formando óxidos y sales; se encuentra por ejemplo en la wolframita ( $\text{FeWO}_4/\text{MnWO}_4$ ), en la scheelita ( $\text{CaWO}_4$ ), en la ferberita ( $\text{FeWO}_4$ ) y la hubnerita ( $\text{MnWO}_4$ ). Su abundancia en la superficie de la Tierra se estima en 1.25 mg/kg y la concentración promedio en el mar es cercana a  $0.1 \text{ ng/m}^3$ , escasamente en el sol y en los meteoritos [44].

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas selectas del tungsteno [45]

Tungsteno	W
Número atómico	74
Configuración electrónica	[Xe] 4f145d46s2
Números de oxidación	6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, -1
Masa atómica	183.85 g/mol
Estado físico	Sólido a 25°C
Estructura cristalina	Cúbica centrada en el cuerpo
Calor específico	130 J/(K·kg)
Conductividad térmica	174 W/(K·m)
Módulo elástico	411 GPa
Velocidad del sonido	5174 m/s a 293,15 K (20 °C)

Su importancia biológica ha quedado establecida en la última década, ya que se han descubierto enzimas que contienen tungsteno [46,47,48], y su transcendencia química se debe a la facilidad que tienen sus compuestos de coordinación para intercambiar ligantes, razón por la cual se explotan como catalizadores en la síntesis de olefinas por metátesis [49].

El tungsteno es ampliamente usado como material de aleación, para darle resistencia y dureza al acero. Los carburos de tungsteno son excepcionalmente duros y por tanto muy utilizados para herramientas de corte y perforación industrial. Las aleaciones con cobre y plata se usan como contactos e interruptores eléctricos, y combinado con molibdeno para componentes aeroespaciales [44].

El tungsteno puro posee otros importantes usos, como los filamentos de las ampollitas y la fabricación de electrodos para soldadura de arco. Se utiliza como elemento de calefacción en hornos de alta temperatura, en tubos electrónicos y de rayos catódicos, en los sellos de uniones vidrio-metal y en dispositivos de energía solar, aún en desarrollo. Así, dado su gran alcance, es necesario mencionar que el mayor productor de tungsteno, con más de 75% de la producción a nivel mundial es China [50].

### 1.5.3.2 Óxido de Tungsteno.

El sistema tungsteno-oxígeno es uno de los más complejos, un esquema de este sistema se muestra en la figura 2. Además de la estequiometría estable de los óxidos binarios, como el de  $\text{WO}_3$  ( $\alpha$ -óxido de tungsteno),  $\text{W}_{20}\text{O}_{58}$  ( $\beta$ -óxido de tungsteno),  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  ( $\gamma$ -óxido de tungsteno,  $\text{WO}_{2.72}$ ) y el dióxido de tungsteno ( $\text{WO}_2$ ), existen una gran variedad de óxidos de tungsteno no estequiométricos. También existen una gran cantidad de compuestos de óxidos de tungsteno ternarios, tales como lo son el tungstato y los ácidos túngsticos.

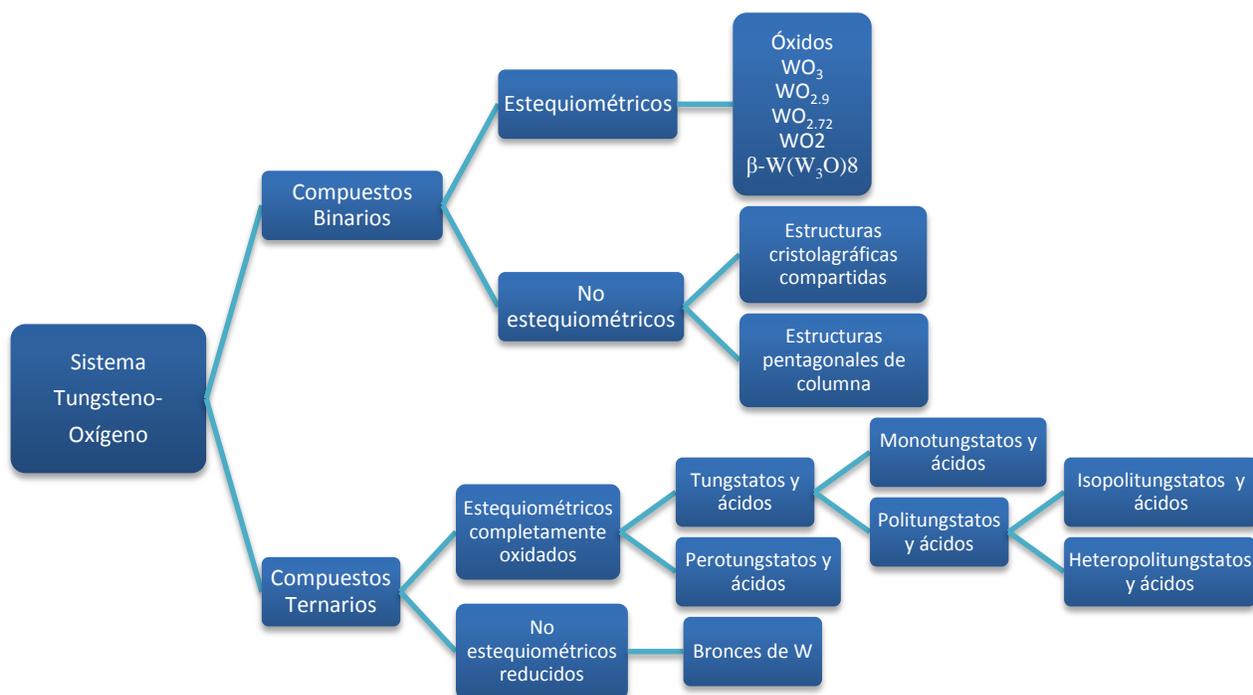


Figura 2. Sistema Tungsteno-oxígeno [46].

En la mayoría de los óxidos predomina el estado de oxidación +6, con 6 átomos de oxígeno enlazados a cada átomo de tungsteno en una configuración octaédrica. En el estado completamente oxidado ( $\text{WO}_3$ ), el trióxido de tungsteno exhibe una estructura cúbica con octaedros  $\text{WO}_6$  arreglados en una configuración donde se comparten esquinas (véase la figura 3). En óxidos reducidos ( $\text{WO}_x$ ,  $2 < x < 3$ ), se presentan combinaciones intercaladas de esquina, borde y compartimientos de las caras y donde arreglos de octaedros de  $\text{WO}_6$  comúnmente están presentes. Una mayor complicación de la estructura cristalográfica de estos compuestos

son los tetraedros de  $\text{WO}_4$  y bipirámides pentagonales de  $\text{WO}_7$  que son frecuentemente encontrados en óxidos completamente oxidados y en óxidos parcialmente reducidos respectivamente.

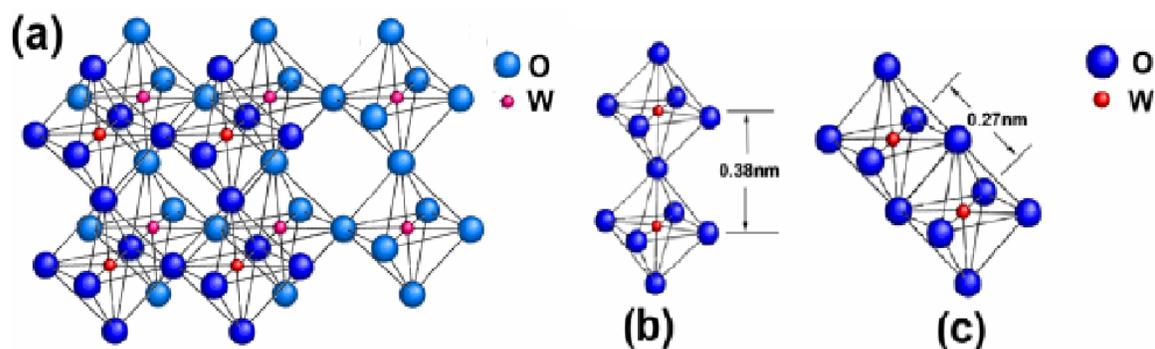


Figura 3. Estructura cristalina de  $\text{WO}_3$  en la fase cúbica. (b) Dos unidades de octaedros de  $\text{WO}_6$  comparten esquinas. (c) Dos unidades de octaedros de  $\text{WO}_6$  comparten bordes [51].

#### 1.5.3.2.1 Trióxido de Tungsteno.

El trióxido de tungsteno ( $\text{WO}_3$ ) es un polvo de coloración amarilla; se vuelve de color naranja oscuro al ser calentado; revierte su estado de coloración a amarillo al ser enfriado; su densidad es  $7.2 \text{ g/cm}^3$ ; su punto de fusión es  $1,472^\circ\text{C}$ ; es insoluble en agua y levemente soluble en ácidos; es soluble en soluciones alcalinas cáusticas. Puede reaccionar ligeramente con  $\text{N}_2$  para formar trazas de nitruro de tungsteno a temperaturas sobre los  $1,500^\circ\text{C}$  [52].

Se conocen cuatro fases cristalinas estables para este material, dependientes de la temperatura a la que se encuentra el óxido, más la fase cúbica que es metaestable.

Tabla 2. Información de los estados cristalinos del  $\text{WO}_3$  [53].

Fase Cristalográfica	Temperatura $^\circ\text{C}$	a	b	c	$\alpha$ ( $^\circ$ )	$\beta$ ( $^\circ$ )	$\gamma$ ( $^\circ$ )
Triclínico	-40 a 17	7.309	7.522	7.678	88.81	90.92	90.93
Monoclínico	17 a 330	7.301	7.539	7.690	89.57	90.89	89.57
Cúbico*	200 a 310	3.714	3.714	3.714	90	90	90
Ortorrómbico	310 a 740	21.431	17.766	3.783	90	90	90
Tetragonal	740 o más	7.390	7.390	3.810	90	90	90

(\*El caso de la estructura cúbica es especial, dado que es metaestable y sólo logra sintetizarse en redes con alto estrés energético).

La resistividad eléctrica del trióxido de tungsteno ( $\alpha$ -óxido de tungsteno) está entre 0.14 y 0.18  $\Omega\text{cm}$ , lo cual muestra que el óxido de tungsteno completamente oxidado tiene una baja conductividad (típicamente la resistividad de un material conductor esta alrededor de  $1 \times 10^{-4}$   $\Omega\text{cm}$ ). Sin embargo, en la estructura del trióxido de tungsteno están presentes vacancias de oxígeno, las cuales incrementan la formación de estados donadores de electrones, lo cual hace al óxido de tungsteno un material semiconductor [54].

El trióxido de tungsteno tiene un Gap de  $\sim 2.6$  eV [55], siendo un semiconductor de tipo *n*. Esta característica lo hace muy útil para un amplio espectro de aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, el trióxido de tungsteno es un importante material electrocrómico [56] y también se utiliza en la construcción de dispositivos fotoelectroquímicos [57], como catalizador [58] y en sensores de gases [10,59].

Como un material de detección, el  $\text{WO}_3$  ha demostrado tener ciertas ventajas debido a su muy buena movilidad,  $10 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$  [60]. Además,  $\text{WO}_3$  ha mostrado buena estabilidad térmica y baja interferencia a la humedad [61]. Es importante mencionar que en la actualidad trióxido de tungsteno ocupa hasta el 7% de las aplicaciones de detección de gases en comparación con otros óxidos metálicos, un análisis comparativo se presenta en la figura 4. Aunque en los últimos 15 años, la atención al  $\text{WO}_3$  como sensor de gas ha aumentado y existen muchos estudios publicados sobre su aplicación, sus propiedades de detección no son completamente conocidas y se considera que su potencial no se aprovecha plenamente.

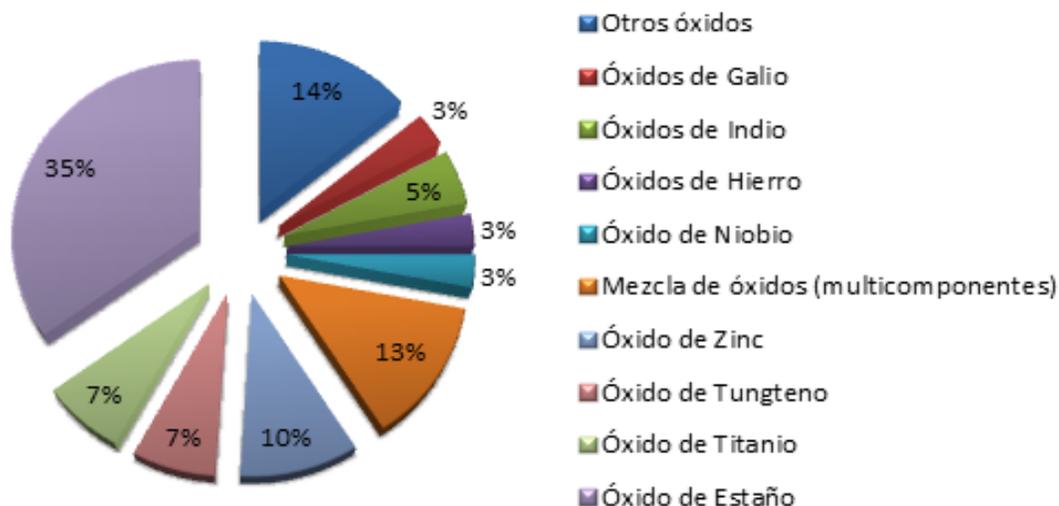


Figura 4. Comparación relativa de los diferentes óxidos utilizados en la detección de gases [10].

#### 1.5.3.2.2 Nanoestructuras de $WO_3$

En la literatura se describen múltiples usos para las nanopartículas de  $WO_3$ . El sólo hecho de cambiar el sistema de  $WO_3$  de la escala micro a la escala nano potencia fuertemente las aplicaciones anteriormente mencionadas así como otras asociadas a otras particularidades de las estructuras obtenidas, tales como: redes tridimensionales de nanoalambres de  $WO_3$  utilizadas para generar sensores de gas ultrasensibles [62] y películas de nanopartículas para celdas solares [63], ambas aplicaciones a escala de laboratorio; sensores en base a nanoalambres de  $WO_3$ , utilizados para detectar gases, proteínas, virus y marcadores de cáncer individuales, esta última en proceso de patente comercial, entre otros.

Las nanopartículas de  $WO_3$  amorfo ya son utilizadas como puntas emisoras de campo en detectores y medidores electrónicos de última generación para medidores industriales de radiación y campo magnético ultra finos [64]. Pronto se espera el uso de nanotubos de óxido de  $WO_{3-x}$  para crear pantallas electrocrómicas flexibles de manera industrial, a partir de los resultados de laboratorio [65].

Debido a la electronegatividad del  $WO_3$ , es buen detector de compuestos ácidos, pero su reactividad respecto a compuestos de naturaleza neutra o básica se incrementa a medida que el óxido de tungsteno es reducido químicamente a  $WO_{3-x}$  [66,67]. También es importante para la

reactividad la cantidad de posibles sitios de adsorción, lo que implica que el área superficial sea grande o que la relación entre el largo y el diámetro de la nanoestructura (razón de aspecto) sea lo más grande posible [62] y en consecuencia, nanopartículas finas enmarañadas, partículas nanoporosas, nanotubos, nanodiscos y nanohilos, por mencionar algunos, son los mejores candidatos para aplicaciones de esta naturaleza.

#### 1.5.4 Vitamina B<sub>12</sub>

##### 1.5.4.1 Estructura química de la vitamina B<sub>12</sub>

El término cobalamina se refiere a una familia de compuestos con una estructura determinada. La vitamina B<sub>12</sub> es una cobalamina (PM 1355) formando un grupo macrocíclico casi planar (núcleo corrina) en torno a un átomo central de cobalto. El Co posee 6 valencias de coordinación, 4 de las cuales establecen enlace covalente con los correspondientes nitrógenos de los anillos. La quinta valencia de coordinación se halla siempre unida a un seudonucleótido complejo, el 5,6 dimetilbencimidazol, casi perpendicular al núcleo y la sexta valencia al unirse a diferentes radicales origina los diversos derivados de la cobalamina (véase la figura 5, tabla 3).

Tabla 3. Derivados de la cobalamina

Radical	Nombre del derivado
CN <sup>-</sup> (ciano)	Cianocobalamina
OH <sup>-</sup> (hidroxilo)	Hidroxicobalamina
CH <sub>3</sub> (metilo)	Metilcobalamina
5'desoxiadenosil	Desoxiadenosilcobalamina

La hidroxicobalamina y la cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) son formas no fisiológicas de la cobalamina; en el organismo se transforman de forma espontánea en metil y 5'desoxiadenosil que son las formas fisiológicamente activas o coenzimas de la vitamina B<sub>12</sub>. La cianocobalamina por exposición a la luz y a los agentes reductores pasa rápidamente a la forma de hidroxicobalamina.

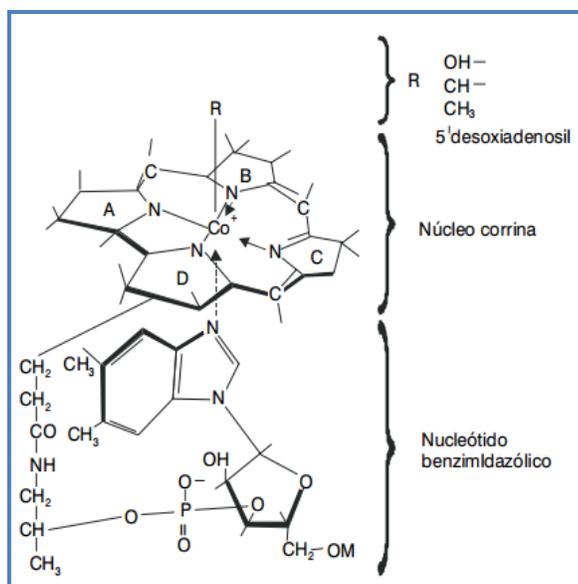


Figura 5. Estructura química de la cobalamina [68].

La vitamina B<sub>12</sub> desempeña un papel clave como coenzima en la síntesis de DNA y en la maduración celular, así como en la síntesis de lípidos neuronales. El organismo humano es incapaz de sintetizarla por lo que debe ser aportada por los alimentos (carnes, leche y derivados, huevos, pescados) [68].

Tabla 4. Requerimientos diarios de Vitamina B<sub>12</sub> por grupo de edades [68].

	Grupo de edades	µg Vitamina B <sub>12</sub> /día
Lactantes	0-2.9 meses	0.3
	3-5.9 meses	0.4
	6-11.9 meses	0.5
	1-1.9 años	0.7
Niños	2-5.9 años	1.0
	6-9.9 años	1.5
	10 años o más	2.0
Adultos	Hombre-mujer	2.0
	Mujer embarazada	2.5
	Mujer lactando	2.5

Los requerimientos mínimos diarios de vitamina B<sub>12</sub> oscilan alrededor de los 2 µg (véase tabla 4), cantidad completamente cubierta por una alimentación mixta normal que contenga entre 5 y 30 µg de cobalamina, de los que se absorben de 1 a 5 µg. El requerimiento mínimo es la cantidad de vitamina que cubre las necesidades provocadas por las pérdidas diarias de ésta, que se producen fundamentalmente por la orina, las heces y las descamaciones cutáneas y que son de 0,1 %/día (1,3 µg) [69].

#### 1.5.4.2 Causas de la deficiencia de cobalamina

Existen múltiples causas de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, ya que el fallo de cualquiera de los pasos del complejo proceso de asimilación que sufren las cobalaminas desde los alimentos hasta su utilización al nivel celular, ocasiona la interrupción de éste y por lo tanto, la posibilidad potencial de desarrollar una deficiencia de cobalaminas.

Tabla 5. Las causas de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> [68].

1. Insuficiencia dietética.	Vegetarianos estrictos o veganos. Lactantes de madres vegetarianas.
2. Desórdenes gástricos.	Ausencia de factor intrínseco (FI) <sup>2</sup> Anemia perniciosa (adulto y juvenil). Anemia perniciosa congénita. Desórdenes infiltrativos del estómago.
3. Desórdenes mixtos.	Enfermedad posgastrectomía. Derivación gástrica. Malabsorción de la cobalamina de los alimentos.
4. Desórdenes intestinales.	Defectos luminales. Sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado. Infestación por parásitos. Síndrome de Zollinger-Ellison. Insuficiencia pancreática.
5. Defectos ileales.	Enfermedad ileal. Resección ileal. Malabsorción inducida por drogas. Malabsorción congénita de cobalaminas.

<sup>2</sup> El FI es una proteína, segregada por las células de la mucosa del estómago que se une a la vitamina B<sub>12</sub> y la lleva hasta el intestino donde es absorbida. La ausencia de FI es la causa más común de anemia perniciosa y suele ser el resultado típico de la atrofia de la mucosa del estómago relacionada con la edad.

6. Desórdenes del transporte plasmático.	Déficit congénito de transcobalamina II. Déficit de proteína R.
7. Desórdenes del metabolismo celular.	Exposición al óxido nitroso. Errores congénitos del metabolismo.

La captación celular de la vitamina y sus formas modificadas depende de la unión a las proteínas portadoras, el factor intrínseco (FI) producido en el estómago, y transcobalamina, presente en la circulación y diversos fluidos tisulares.

#### 1.5.5 Biosensor

Fue en el año 1962, cuando L.C. Clark diseñó el primer biosensor [70] basado en la inclusión de la enzima glucosa-oxidasa en un electrodo de oxígeno, pudiendo determinar la concentración de glucosa en sangre a partir de la disminución de la concentración de oxígeno.

Un biosensor se define como un dispositivo analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, ADN, anticuerpos, células o un microorganismo) en contacto con un transductor (electroquímico, óptico, magnético, mecánico) capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que hay entre el receptor biológico y su molécula complementaria, y convertirla en una señal que pueda ser cuantificada.

En un biosensor (véase figura 6), la muestra a analizar se pone en contacto con el dispositivo, siendo posible detectar el analito, que es la sustancia a determinar y que en nuestro caso de estudio es el  $O_2$ , para el cual está diseñado el receptor biológico. Cuando tiene lugar la reacción de reconocimiento biológico se producen una serie de cambios físico-químicos detectados por el transductor, produciendo este último una señal cuantificable proporcional a la concentración del analito detectado.

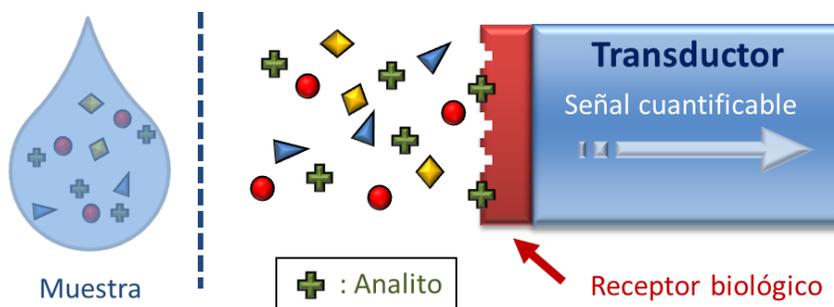


Figura 6. Esquema básico de funcionamiento de un biosensor [71].

Los dos constituyentes del biosensor, receptor biológico y transductor, están integrados conjuntamente, confiriendo a los dispositivos biosensores sus especiales características de selectividad y sensibilidad.

Teniendo en cuenta la naturaleza, características y propiedades del receptor biológico, los biosensores pueden dividirse según el tipo de interacción que se produce entre el analito y el receptor (directa o indirecta), el tipo de receptor empleado (anticuerpo, enzima, ADN, aptámeros) o la naturaleza del proceso bioquímico empleado. Dentro de la categoría del tipo de receptor suele ser habitual clasificar a los biosensores como se muestra en la figura 7:

RECEPTOR BIOLÓGICO	
Tipo	Clase
Proceso bioquímico	Catalíticos
	Afinidad
Tipo de interacción	Directa
	Indirecta
Tipo de receptor	Anticuerpos, ADN, enzimas, aptámeros, microorganismos, células, secciones de tejidos, polímeros de huella molecular, etc.

TRANSDUCTOR	
Tipo	Clase
<b>Electroquímicos</b>	Amperométricos
	Potenciométricos
	Conductimétricos
	Impedimétricos
<b>Mecano-acústicos</b>	Piezoeléctrico
	Nanomecánico
<b>Magnéticos</b>	Efecto Hall
	Magneto-resistivos
	Magneto-impedancia
<b>Ópticos</b>	Bio-optroodos
	Campo evanescente

Figura 7. Tipos de biosensores según el tipo de receptor o transductor empleado [71].

La inmovilización es un proceso en el que se confina o localiza la biomolécula en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad biológica y que, en ocasiones, pueden ser reutilizadas repetidamente; posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad del biorreceptor, por su unión al soporte [72].

El buen funcionamiento de un biosensor depende en gran medida, de la inmovilización del sistema de reconocimiento biológico sobre el transductor. El objetivo fundamental de la inmovilización es permitir un íntimo contacto entre la enzima y el transductor manteniendo inalterable en lo posible la estabilidad de dicho sistema de reconocimiento biológico. Los métodos de inmovilización comprenden métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, y métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento como se muestra en el esquema de la figura 8.

Las principales ventajas del empleo de biomoléculas fijadas sobre soportes sólidos, son:

- ◆ Aumento de la estabilidad del biorreceptor
- ◆ Orientación del biorreceptor
- ◆ Disposición en zonas críticas del biosensor

- ◆ Reutilización
- ◆ Diseño de dispositivos biosensores de fácil manejo y alta sensibilidad, adaptados a diferentes escenarios

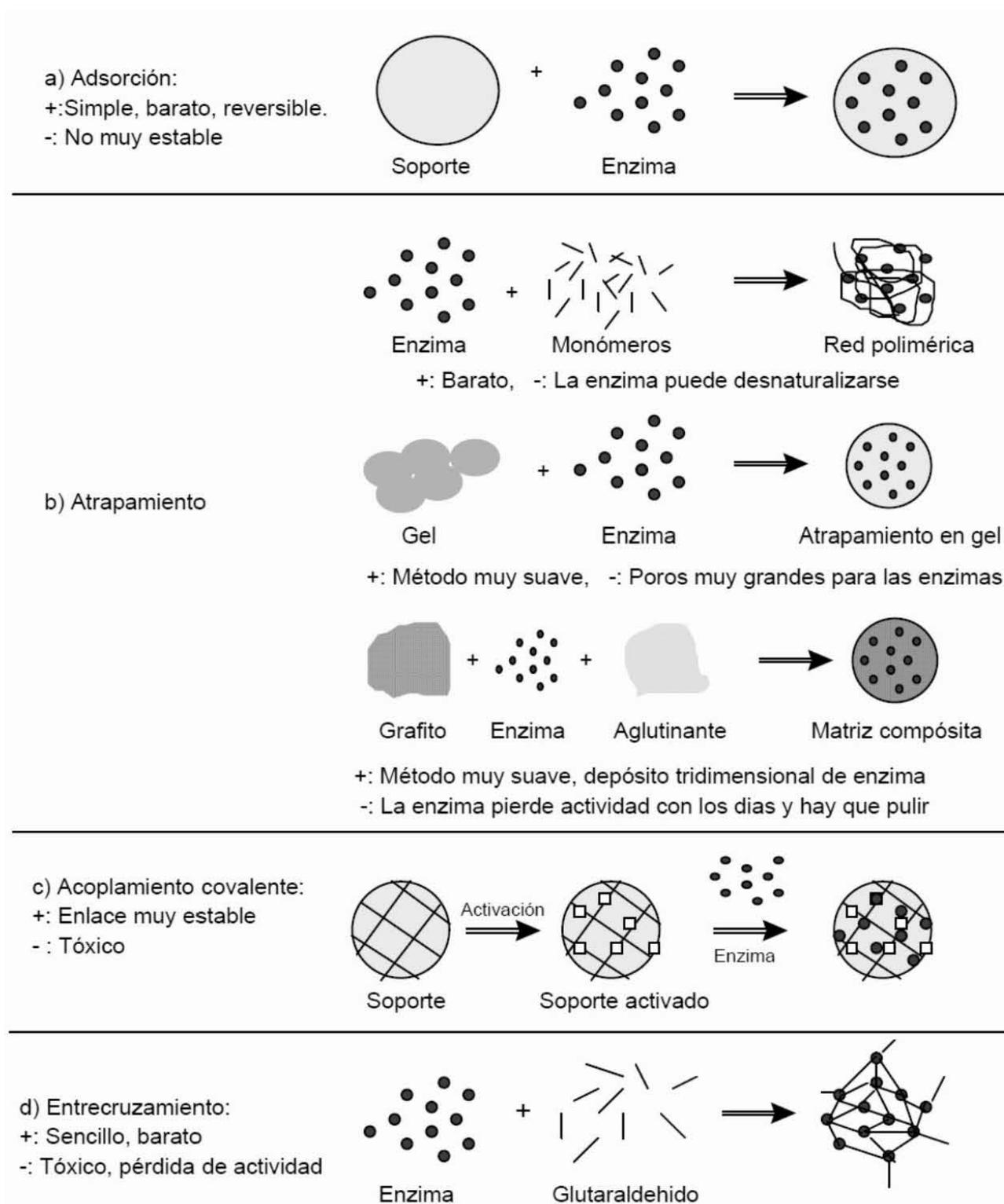


Figura 8. Esquemas de inmovilización de una biomolécula por adsorción (a), por atrapamiento (b), acoplamiento covalente (c) y entrecruzamiento (d) [73].

### 1.5.5.1 Nanobiosensores electroquímicos

Los nanomateriales han tenido un gran impacto en el desarrollo de biosensores electroquímicos. La nanotecnología brinda nuevas posibilidades para la construcción de biosensores y el desarrollo de novedosos bioensayos electroquímicos, de igual manera, los nanomateriales han sido usados para lograr el atrapamiento de enzimas a la superficie del electrodo para promover una reacción electroquímica y de esta forma, promover la amplificación de la señal del proceso de bioreconocimiento o bien, una mejora en la sensibilidad, selectividad y/o estabilidad de la señal.

Sin duda alguna, los nanobiosensores electroquímicos pueden llegar a ser una herramienta altamente selectiva y sensible aplicable a determinaciones médicas, alimentarias y de seguridad. Para ello, deben ser exploradas diversas estrategias para amplificar la señal, como por ejemplo, hay grupos de investigación tratando de aumentar el diámetro de los nanotubos de carbono para este fin; así mismo, otra estrategia que es estudiada es la posibilidad de que los biosensores sean totalmente a nanoescala y para lograrlo, los dispositivos deben integrar analitos, transductores de señal y electrónica todo a nanoescala [74].

Los transductores electroquímicos son simples de fabricar y usar [75]. También son fiables, de respuesta rápida, precisan instrumentación de bajo costo y no requieren del tratamiento previo de la muestra. Entre estos biosensores, se incluyen: los biosensores amperométricos, los potenciométricos (donde destacan los ISFET, transistores de efecto de campo iónico sensibles), impedimétricos y los conductimétricos.

## CAPITULO II. Desarrollo Experimental

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Cepa bacteriana *Tetrasphaedra duodecadis*.

Para este estudio se ha empleado la bacteria gram-negativa *Tetrasphaedra duodecadis*. Dicha bacteria ha sido obtenida de la colección de cepas bacterianas de la American Type Culture Collection (ATCC) No. 13347, es un género de bacterias que se encuentra comúnmente en el suelo. Las células jóvenes son bacilos irregulares, que luego, durante el crecimiento exponencial, se unen en forma de V (véase la figura 9a). Los cultivos en la fase estacionaria consisten casi enteramente de cocos (véase la figura 9b). Las colonias son de coloración crema o café. Las bacterias son gram negativas, catalasas positivas, aeróbicas y tienen un metabolismo de oxidación.

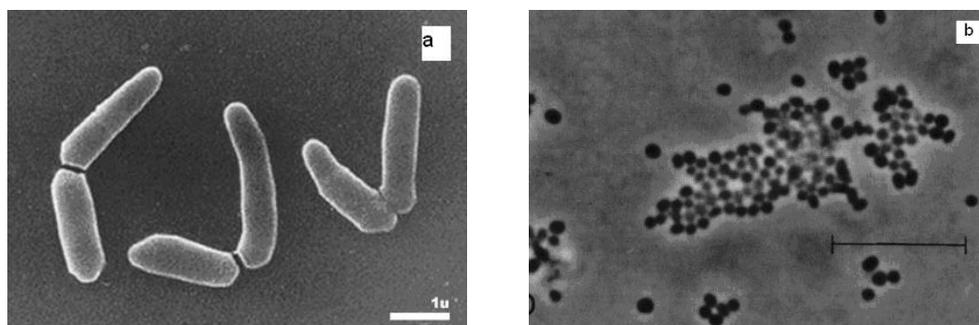


Figura 9. *Tetrasphaedra duodecadis*.

Para el caso de estudio de esta investigación se deberá adicionar Vitamina B<sub>12</sub> al medio de cultivo [76], para que la bacteria obtenga la especificidad de oxidar este compuesto. Las cepas se cultivaron a una temperatura de 26 °C durante 48 horas en agitación de 250 rpm. Después, el cultivo bacteriano se filtra y centrifuga para obtener una masa de células concentradas para su posterior utilización en los bioensayos de WO<sub>3</sub>.

### 2.1.2 Cepa bacteriana *Escherichia coli*.

Las cepas de *Escherichia coli*, empleadas en este trabajo para ser utilizadas como material de referencia en este estudio de construcción de un sensor de la vitamina B<sub>12</sub> es la TOP10 *E. coli*, de la marca invitrogen™ No. C4040-10; que fueron cultivadas normalmente en medio de cultivo LB en un incubador a 37 °C con agitación continua (250 rpm).

Las bacterias del género *Escherichia coli* (*E. coli*) son gram-negativas, en forma de bacilos (véase figura 10) del tipo anaeróbico facultativo y pertenecen a la familia *Enterobacteria*. Esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el de los humanos y es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que, esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo.



Figura 10. Micrografía de la bacteria *Escherichia coli*, [77].

Entre tanto, la forma precisa en que las bacterias son capaces de la absorción de la vitamina B<sub>12</sub> es incierta. Puesto que las bacterias, en particular *E. coli*, toma la vitamina B<sub>12</sub> in vitro, típicamente se supone que las bacterias utilizan B<sub>12</sub> en competencia con su anfitrión bajo condiciones fisiológicas. Por tanto, parece poco probable que bacterias interfieran con la absorción de B<sub>12</sub> y sea por ende válido utilizarla como receptor biológico en el sensor [78].

### 2.1.3 Medios de cultivo y soluciones.

Para poder hacer crecer (cultivar) bacterias en el laboratorio se deben satisfacer todos los requerimientos físicos y de nutrientes del microorganismo que se requiere que crezca. Los medios de cultivo líquidos (medios en caldo) o sólidos (medios en agar) proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo se han utilizado los siguientes medios de cultivo:

#### I. Agar BHI (Infusión de cerebro y corazón)

Es un medio altamente nutritivo para el cultivo de una variedad de microorganismos fastidiosos (por su crecimiento lento) incluyendo los estreptococos, neumococos y meningococos. Debido a sus cualidades nutritivas también es ideal para el cultivo de muestras procedentes de sangre. Se ha utilizado para el cultivo de los microorganismos en medio sólido; su composición en 500 ml de agua destilada es la siguiente:

Tabla 6. Composición del medio BHI

Reactivo	Cantidad
Agar BHI	26 g
Extracto de Levadura	0.5 g
V <sub>B12</sub>	1ppm

Para hacer la preparación se debe disolver los reactivos del medio en polvo en medio litro de agua destilada o desionizada; luego esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### II. Caldo de Triptona

Es un digerido pancreático de caseína, se utiliza como fuente de nitrógeno en los medios de cultivos capaz de soportar el crecimiento exigente y no exigente de microorganismos. Medio líquido, con una rica y abundante base nutritiva que hace que pueda ser utilizado para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, estos reactivos son preparados en 500

ml de agua destilada/desionizada y posteriormente esterilizándolo al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Tabla 7. Composición del medio con Triptona

Reactivo	Cantidad
Glucosa	0.5 g
MgSO <sub>4</sub>	0.5 g
Triptona	5 g
Extracto de Levadura	1 g
V <sub>B12</sub>	1ppm
NaCl	2.5 g

### III. Caldo LB

El caldo de Luria se utiliza para el mantenimiento y la propagación de *Escherichia coli*. La *E. coli* crece más rápido en caldo Luria por la levadura de triptona y factores de crecimiento esenciales suministro para este tipo de bacteria. El caldo de Luria también contiene electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico, debido al componente del cloruro de sodio.

Tabla 8. Composición del caldo LB

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
V <sub>B12</sub>	1ppm
NaCl	5 g

Estos reactivos son preparados en un litro de agua destilada/desionizada y posteriormente esterilizándolo al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### IV. Solución de Ringer ¼

La solución de Ringer se utiliza rutinariamente, en los estudios sobre bacterias, a una disolución de 1/4 para obtener suspensiones celulares o para hacer un banco de soluciones. Al

proporcionar una presión osmótica similar a la que tiene -en su interior- la célula bacteriana permite mantener las bacterias durante un cierto tiempo sin que éstas se destruyan. Esta solución es un medio isotónico más equilibrado que la simple solución salina de cloruro sódico y su composición permite su esterilización en autoclave sin que se formen precipitados. Su composición para 500 ml es:

Tabla 9. Composición de la solución Ringer 1/4

Reactivo	Cantidad
Cloruro Sodio (NaCl)	3.6 g
Cloruro Potasio (KCl)	0.185 g
Cloruro de Calcio Dihidratado (CaCl 2H <sub>2</sub> O)	0.115 g
Bicarbonato Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	0.050 g

Es la solución isotónica que se ha utilizado para las suspensiones celulares y se debe esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## V. Solución PBS

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos.

El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal, es de aquí su manejo para lavar células a través de centrifugación. Además que, se recurre como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida. Esta monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación.

Tabla 10. Composición de la solución PBS (250ml de solución stock 10X)

Reactivo	Cantidad
Cloruro Sodio (NaCl)	20 g
Cloruro Potasio (KCl)	0.5 g
(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.6 g
Bicarbonato Sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3.6 g

De igual manera, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## VI. Solución Tris HCl

Es el nombre común de tris(hidroximetil) aminometano. Se trata de un compuesto muy utilizado en el laboratorio para preparar disoluciones tampón; el grupo ácido-base que ejerce el taponamiento es el amino. Se comercializa en sus formas básica ("Tris base") y ácida ("Tris hidrocioruro"), aunque la primera es la de uso más común. Tris es un producto químico con propiedades básicas, que tiene un pKa de 8.1. Puede ser utilizado para amortiguar los cambios de pH de soluciones drásticas, manteniéndolas en el intervalo de pH de 7.0 a 9.0.

Para preparar una solución de Tris-HCl a 50 mM y pH 7 se pesó 6.057 g de Tris y se disolvió en 1L de agua destilada previamente llevada al pH indicado con HCl diluido.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Métodos espectrofotométricos para curva de crecimiento bacteriano.

#### 2.2.1.1 Táctica de generación de la curva de crecimiento de la *Tetrasphaedra duodecadis*

Una vez que se revivió el cultivo liofilizado (véase el anexo 1) y se prosiguió con la inoculación de *Tetrasphaedra duodecadis* por medio de sembrado en medio líquido (presemilla en caldo de Triptona) para uso inmediato y en los medio sólido (Agar BHI) como reserva bacteriana, realizado este último mediante estriado en placas de Petri y tubos de ensayo inclinados con agar; posteriormente se continuó con la curva de crecimiento, la cual, se monitoreó mediante conteo de Unidades formadoras de colonias (UFC) y densidad óptica (OD).

Para la caracterización se tomó 5 ml del cultivo del tubo presemilla, se sembró en 50 ml de medio de líquido y se incubó a 26°C durante 24 horas. Luego se hizo un subcultivo y se incubó en las mismas condiciones. A partir de este cultivo se extrajo 5µl del cultivo cada dos horas y se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 en tubos eppendorf, finalmente se sembró 10ml de cada dilución en el agar infusión cerebro corazón y se incubó a 26°C.

En cuanto a la determinación de la concentración bacteriana se empleó el método turbidimétrico; ya que un cultivo líquido puede ser analizado por un espectrofotómetro como una herramienta para evaluar el crecimiento bacteriano, conforme estas van creciendo la turbidez de la solución aumenta y es esta cantidad de luz dispersada la que determina la densidad del cultivo. Es por esto que se analizó el cultivo bacteriano cada dos horas a 620nm con el espectrofotómetro UV-VIS HACH modelo DR5000.

#### 2.2.1.2 Táctica de generación para la curva de crecimiento de la *Escherichia coli*

Primeramente, se tomó la caja de Petri que contenía a la cepa de *Escherichia coli* y se introdujo a la incubadora a 37 °C por dos horas, para tomar una colonia de esta cepa e inocular un tubo con 5 ml del caldo LB. De este cultivo se extrajo 5µl del cultivo cada dos horas y se analizó en el espectrofotómetro con una longitud de onda  $\lambda = 600\text{nm}$ .

#### 2.2.2 Bioensayo de toxicidad por $\text{WO}_3$ en cultivos de *Tetrasphaedra duodecadis*.

##### 2.2.2.1 Cultivos en caldos de Triptona con óxido de Tungsteno<sup>3</sup>

Se sonificaron por 10 minutos en tubos de ensayo con tres diferentes concentraciones (50 mg, 25 mg, 10 mg) del óxido de tungsteno 99.8 % (Alfa Aesar) en medio nutritivo de triptona y se inoculó con 100µl de la bacteria. Los tubos se hicieron por duplicado más dos tubos de

---

<sup>3</sup> En cada uno de los experimentos se dejó un blanco (sin inocular) para corroborar la esterilidad del proceso y del ambiente de trabajo. Una vez obtenidos los resultados, las cajas se taparon con papel aluminio para proceder con su esterilización y su correcta disposición de los residuos generados.

control el negativo y positivo que contenían el caldo inoculado sin y sólo con solución de  $WO_3$ , respectivamente. Los tubos se incubaron a 26 °C durante 48 h [79].

#### 2.2.2.2 Cultivos en Agar BHI con óxido de Tungsteno

##### Técnica A [79]

Se disolvieron 50, 25 y 10 mg de óxido de tungsteno 99.8 % (Alfa Aesar) en 5 ml de agua destilada en tubos de ensayo, para ser sonificadas por 10 minutos y así garantizar la dispersión en toda la solución; posteriormente se esterilizo en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Las placas de Petri utilizadas en los ensayos se prepararon usando un medio de agar BHI, las cuales se inocularon al extenderlas uniformemente sobre la parte superior de las placas empleando una espátula de Drigalsky estéril. Después de permitir que las bacterias se sequen (entre 5-10 min) las soluciones de  $WO_3$  de diferentes concentraciones se gotearon dentro de las cajas de Petri con agar. Se examinaron después de 48 h de incubación.

##### Técnica B [80]

Con tres concentraciones de óxido de tungsteno (50, 25, 10 mg) se disolvieron en agua destilada y para una buena dispersión se colocaron en un sonificador por 10 minutos que posteriormente se añadieron al medio de crecimiento BHI y se agitó durante 10 min. Los medios de crecimiento se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C. A continuación los medios estériles se vertieron en placas de Petri y se dejó solidificarse a temperatura ambiente, para después ser inoculadas por estriado e incubadas a 26 °C para proporcionar condiciones óptimas de crecimiento.

Aunque es importante reconocer el papel del área de superficie disponible de las nanopartículas en evaluaciones de toxicidad, área de superficie disponible de las partículas se espera que cambie durante el curso de los experimentos, como resultado de aglomeración y precipitación. Por lo tanto, el presente estudio se centró en la respuesta a la dosis sobre la base de partículas de concentración en lugar de área de superficie.

### 2.2.3 Preparación de muestras para SEM

Ya que se prepararon los medios de cultivos líquidos con óxido de Tungsteno (véase apartado 2.2.2.1), y alcanzándose una biomasa bacteriana adecuada se prosiguió con el siguiente protocolo para su examinación en SEM y análisis de EDS.

- I. Se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min y antes de resuspender las bacterias en PBS (Phosphate Buffered Saline) se lavan dos veces con una solución de Ringer  $\frac{1}{4}$ .
- II. Se resuspendieron las bacterias en PBS se dejándolas 10 min a 4 °C, para recentrifugar a 6000 rpm durante 15 min. El proceso de lavado con PBS se repite dos veces más.
- III. Se fijaron las bacterias añadiendo glutaraldehído al 2.5 % en PBS 0.1 M y dejándolas en contacto con la solución fijadora durante 1 h a 4 °C.
- IV. Se eliminó la solución fijadora efectuando 4 lavados con el PBS. Finalmente se hacen dos lavados de 10 min a 4 °C con agua destilada antes de proceder a la deshidratación.
- V. Deshidratación de las bacterias mediante pases de 10 minutos por una serie de alcoholes, resuspendiendo y centrifugando cada vez. Se empieza con uno en alcohol al 50, 60, 70 y 90 %, dos pases en alcohol de 95 % y finalmente dos pases en alcohol absoluto.
- VI. Finalmente se someten las células a secado por liofilizado por 48 horas.

### Características del equipo SEM y EDS

El equipo que se utilizó para realizar este análisis fue un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5300 integrado con un analizador de energía por dispersión de electrones Thermonoran, modelo SuperDry II con ventana para la detección de elementos ligeros. La corriente utilizada fue de 15 kV del haz de electrones, utilizando un filamento de tungsteno. La presión de operación del equipo fue de  $1 \times 10^{-5}$  Torr. Cada muestra se adhirió a una cinta de grafito previamente colocada en un portamuestras.

## 2.2.4 Sensor bacteriano

### 2.2.4.1 Características del sensor bacteriano adoptado.

El sensor bacteriano de la presente tesis consistió en un electrodo de oxígeno usado como transductor y una membrana bacteriana usada como elemento de detección. Para satisfacer los requisitos específicos de los sensores bacterianos, el electrodo de oxígeno se modificó en comparación con los sensores comerciales de oxígeno.

Primero, el frente esférico convencional que se usa generalmente en los electrodos de oxígeno tipo Clark comerciales se sustituyó por uno plano, asegurando así un buen contacto con la membrana bacteriana. En segundo lugar, el cátodo pequeño con forma de disco se sustituyó por un multicátodo de oro dispersado uniformemente sobre la superficie entera del frente plano (véase figura 11). Por lo tanto, se eliminarán las limitaciones debidas a la difusión de las moléculas de  $O_2$  en la periferia de la membrana del polímero al cátodo.

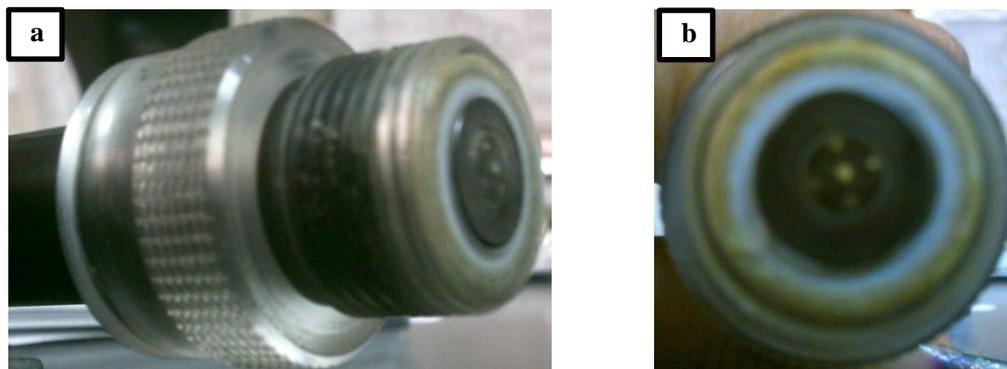


Figura 11. Electrodo de oxígeno multicátodo con frente plano con ampliaciones al 50 %  
a) vista lateral, b) vista frontal.

La membrana bacteriana consistió en una capa delgada de *Escherichia coli* con grenetina (véase sección 2.2.4.2), la cual, se fijó sobre la membrana del polímero del electrodo de oxígeno. La masa bacteriana permanece confinada entre la membrana del polímero PTFE Politetrafluoroetileno (Teflón) y la membrana de grenetina.

#### 2.2.4.2 Técnica de fijación bacteriana en la membrana de grenetina.

Para poder fijar la masa bacteriana a la membrana polimérica PTFE del sensor, se prosiguió con el siguiente protocolo:

- I. Se retiró el cultivo de las bacterias en la fase logarítmica (14 horas)
- II. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- III. Posteriormente se lavó con una solución de NaCl al 0.89% (p/v) y se centrifuga de nuevo a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- IV. El precipitado se colocó en 5 ml de 0.89% NaCl y se liofilizó por 48 horas.
- V. Se mezcló 15.5 mg de las bacterias liofilizadas y 26 mg de la grenetina disolviendo en tampón Tris-HCl (pH 7.0, 50 mM) a 38 °C. (A este paso también se le agregó 25 mg de WO<sub>3</sub>, una vez que se logró el patrón de prueba sin el óxido).
- VI. Se tomó 15 µl de la solución extendiéndola sobre el electrodo y se dejó secar a 4 °C durante 30 min.
- VII. Finalmente, se trata con glutaraldehído (0.5% en tampón fosfato, pH 7.5, 50 mM) durante 3 min.

Cuando se concluyó con el tratado en glutaraldehído de las membranas de grenetina, se procedió a realizar las pruebas con el sensor, donde una vez estabilizada la señal del transductor con el oxígeno disponible en la solución de Tris-HCl (pH 7.0, 50 mM, 30 ml) con el mínimo de agitación que permitió la plancha eléctrica, procurando no generar burbujas de aire durante el agitado, ya que estas ralentizan el tiempo de estabilización.

Procedí a agregar 50 µl de vitamina B<sub>12</sub> 0.005 M a la solución Tris-HCl de estudio, concediendo el tiempo necesario para la reestabilización de la señal, para volver añadir otros 50 µl de vitamina B<sub>12</sub>, y así sucesivamente hasta no conseguir lectura de perturbación en el sistema por la adicción de esta, es decir, ya que la bacteria se encuentre saturada de la vitamina B<sub>12</sub>.

Características del equipo Amper potencioestado y detector de amperímetro.

El equipo que se utilizó para realizar este análisis fue un potencioestado ACM Instruments GillAC serial No. 1305 Gill 6. Para la detección de amperímetro se utilizó Amperometric Detector LC-4B BAS.

## CAPÍTULO III. Resultados y Discusiones

### 3.1 Obtención de las curvas de crecimiento bacterianas

#### 3.1.1 Curva de Crecimiento para *Escherichia coli*

En base a las densidades ópticas por el espectrofotómetro durante 24 horas, se observa notoriamente las 4 fases características: latencia (0 a 5 horas) que representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición; exponencial (5 a 19 horas) periodo en el que cada vez que pasa un tiempo dado de generación la población se duplica; estacionaria (19 a 24 horas) periodo durante el cual cesa el crecimiento ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial.

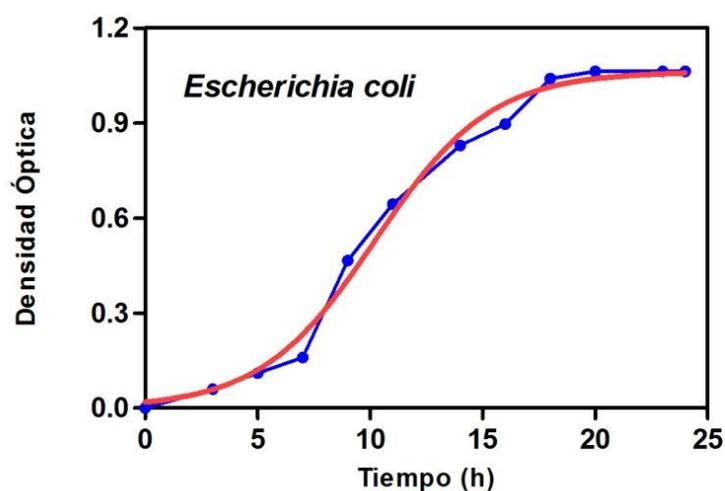


Figura 12. Curva de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*

Para nuestro caso de estudio se ve factible el uso de la biomasa bacteriana *Escherichia coli* a la mitad de la fase exponencial, puesto que en mencionada etapa es cuando la demanda de oxígeno que se requiere para oxidar la vitamina B<sub>12</sub> aumenta y, sea por lo tanto, posible la medición del cambio de concentraciones de oxígeno en la solución.

### 3.1.2 Curva de Crecimiento para *Tetrasphaedra duodecadis*

Los resultados mostrados de las densidades ópticas fueron conseguidos por el espectrofotómetro durante 80 horas. Partiendo de los datos procesados se observa claramente las 4 fases características: latencia (0 a 16 horas) que representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición; exponencial (16 a 60 horas) periodo en el que cada vez que pasa un tiempo dado de generación la población se duplica; estacionaria (60 a 80 horas) periodo durante el cual cesa el crecimiento ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, o porque se alcanzó un número de células elevado para el espacio; muerte (80 horas) si la incubación continúa después de la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero con una disminución progresiva en el número de células viables. Para nuestro caso de estudio se ve factible el uso de las biomasa bacteriana a la mitad de la fase exponencial.

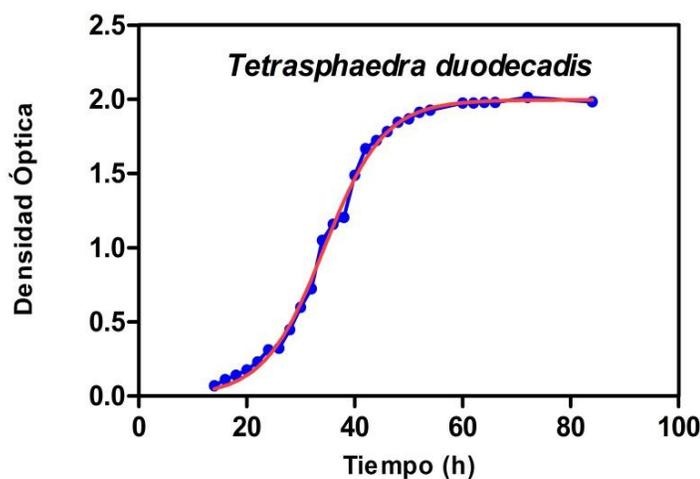


Figura 13. Curva de crecimiento de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis*

La densidad óptica se relacionó con el número de las células viables obtenidas por recuentos de placas. La curva de calibración construida (OD frente al  $UFC \times 10^6$ ) es lineal en el rango de concentración estudiado con intersección en Y de 0,01316 y una pendiente de 62.3 ( $r^2 = 0,9732$ ), esta curva nos permite determinar la concentración de bacterias midiendo sólo la densidad óptica de la muestra.

### 3.2 Resultados de toxicología

Presentación de fotografías de los medios de cultivos bacterianos en BHI por ambas técnicas toxicológicas descritas en la sección 2.2.2.2, para la determinación de biotoxicidad de las partículas de  $WO_3$  en el microorganismo *Tetrasphaedra duodecadis*.

#### Técnica A

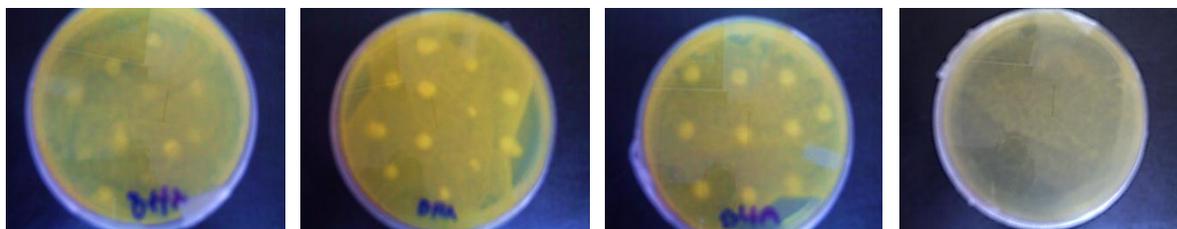


Figura 14. Sembrado de placas por la técnica A. Las concentraciones van de izquierda a derecha respectivamente: 10, 25, 50 mg y un blanco (crecimiento sin el óxido de tungsteno).

#### Técnica B

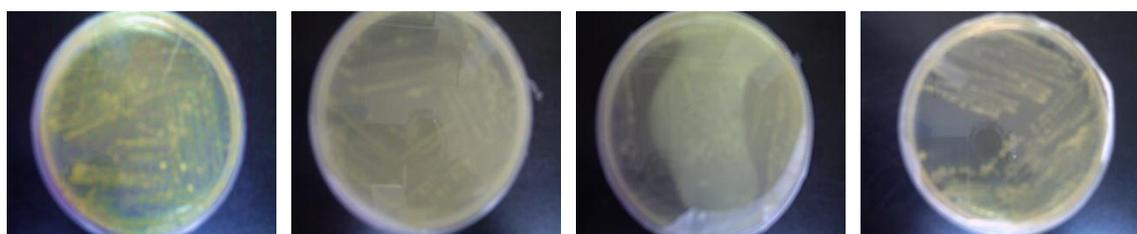


Figura 15. Sembrado de placas por la técnica B. Las concentraciones van de izquierda a derecha respectivamente: 10, 25, 50 mg y un blanco (crecimiento sin el óxido de tungsteno).

Como bien se puede apreciar las partículas de  $WO_3$  no presenta propiedades antibacteriales ni bacteriostáticas, puesto que no inhibe el crecimiento bacteriano durante el desarrollo de las mismas ni mucho menos el tamaño de las colonias por la adicción del óxido en la pre o pos inoculación de los medios bacterianos. Ya que, mencionadas bacterias presentaron un crecimiento y distribución uniforme e igual en las placas con y sin el compuestos de estudio. En la técnica A, donde se gotearon las partículas de óxido, se observó que las colonias bacterianas inclusive crecieron sobre estas sin perturbar su propagación sobre la placa. En la técnica B, que se concentraba en más la cantidad del óxido en ciertas regiones, no exhibo ningún tipo de alteración al florecimiento de la *Tetrasphaedra duodecadis*.

### 3.2 Análisis de las imágenes de SEM

Las micrografías de SEM obtenidas nos muestran una morfología de agregados esféricos huecos para las partículas de  $WO_3$  y bacilos para la *Tetrasphaedra duodecadis*. Cuyos diámetros de las esferas oscilan de 6-16  $\mu m$  y las longitudes de los bacilos varían entre 2-6  $\mu m$ .

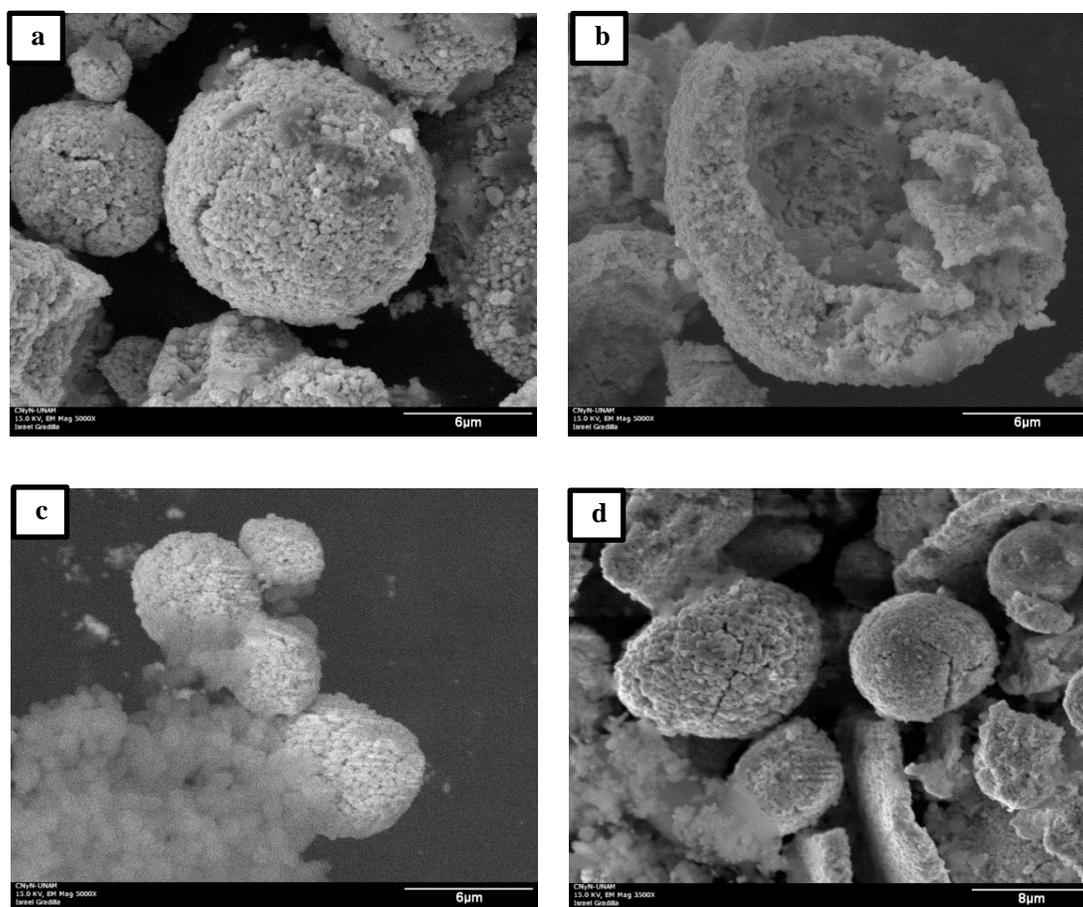


Figura 16. Micrografías de SEM para las muestras bacterianas con concentraciones de  $WO_3$ : a) 10 mg, b) esfera por la mitad con concentración de 10 mg, c) 25 mg y d) 50 mg.

Como se aprecian en las anteriores micrografías, es posible notar que la bacteria se desarrolla entorno a las partículas de  $WO_3$ , tanto en la superficie como dentro de las esferas, formando colonias bacterianas a lo largo muestras, sin presentar inhibición en su proliferación; sin embargo no se distingue biopelículas ni patrón de desenvolvimiento de la *Tetrasphaedra duodecadis*.

Las micrografías de la figura 17, se llevaron a cabo para establecer la morfología original del  $\text{WO}_3$  antes de ser adicionadas a los medios de cultivos de la *Tetrasphaedra duodecadis*, y así determinar si hubo cambios en cuanto a su microestructura.

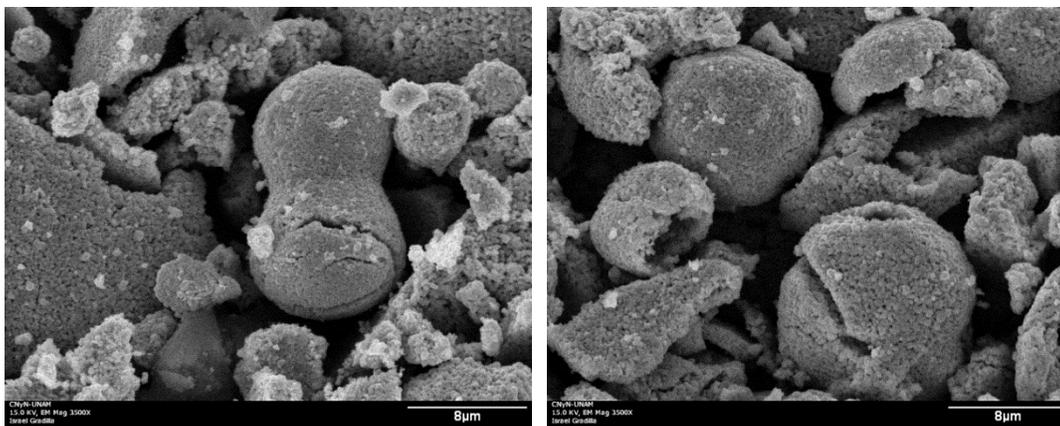


Figura 17. Micrografías de SEM para las partículas de  $\text{WO}_3$  sin crecimiento bacteriano.

Las micrografías obtenidas del  $\text{WO}_3$  puro nos presentan una morfología de microesferas huecas, con una pared de espesor entre 3 a 4.5  $\mu\text{m}$  aproximadamente; pudiendo decir, por lo tanto, que esta estructura no se la da proceso a la cual fueron sometidas las muestras para las micrografías de la figura 18. Concediéndose a especular sobre el posible uso de este óxido para el encapsulado de moléculas dentro de él.

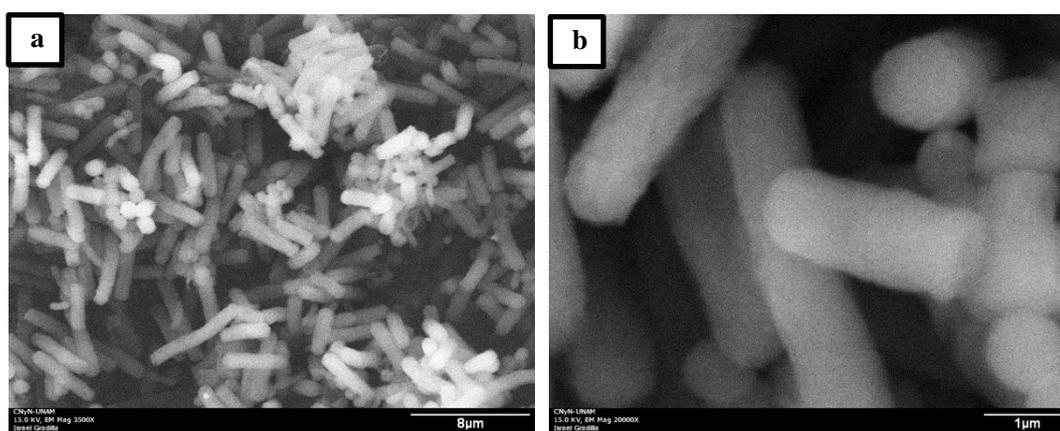


Figura 18. Micrografías de SEM de los bacilos de la *Tetrasphaedra duodecadis*  
a) Baja magnificación, b) alta magnificación.

Las micrografías exhibidas anteriormente, se efectuaron para definir la morfológica de la cepa bacteriana *Tetrasphaedra duodecadis*, definiendo una estructura en forma de pequeños bastones llamados bacilos con longitudes que varían aproximadamente entre 2-6  $\mu\text{m}$ .

Por otro lado, la claridad de las imágenes se debe en gran medida de los elementos que contienen las muestras, aquellas en las que se rodean de elementos orgánicos ‘cargan’ las micrografías dándoles una menor definición, en cuanto al brillo, las zonas analizadas entre más expuestas y, por lo tanto, puede que se cargue con más electrostática.

### 3.3. Análisis de espectros por EDS

En las siguientes figuras se presentan los espectros resultantes tras someter las muestras al análisis EDS. En él, se proporcionan el análisis químico elemental, obteniéndose que las muestras bacterianas expresen C, Na, S, Al, O<sub>2</sub> y otros elementos orgánicos contenidos en organismos vivos. Esta técnica fue realiza para comprobar que no existieran contaminaciones en las mezclas del óxido de tungsteno con la bacteria puesto que ello conllevaría a un descuido durante el desarrollo del experimento.

Las pruebas se realizaron a 5 muestras con 3 diferentes cantidades del óxido de tungsteno, un blanco de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis* y otro de WO<sub>3</sub>, con el fin de evaluar los elementos que contenían dichas muestras.

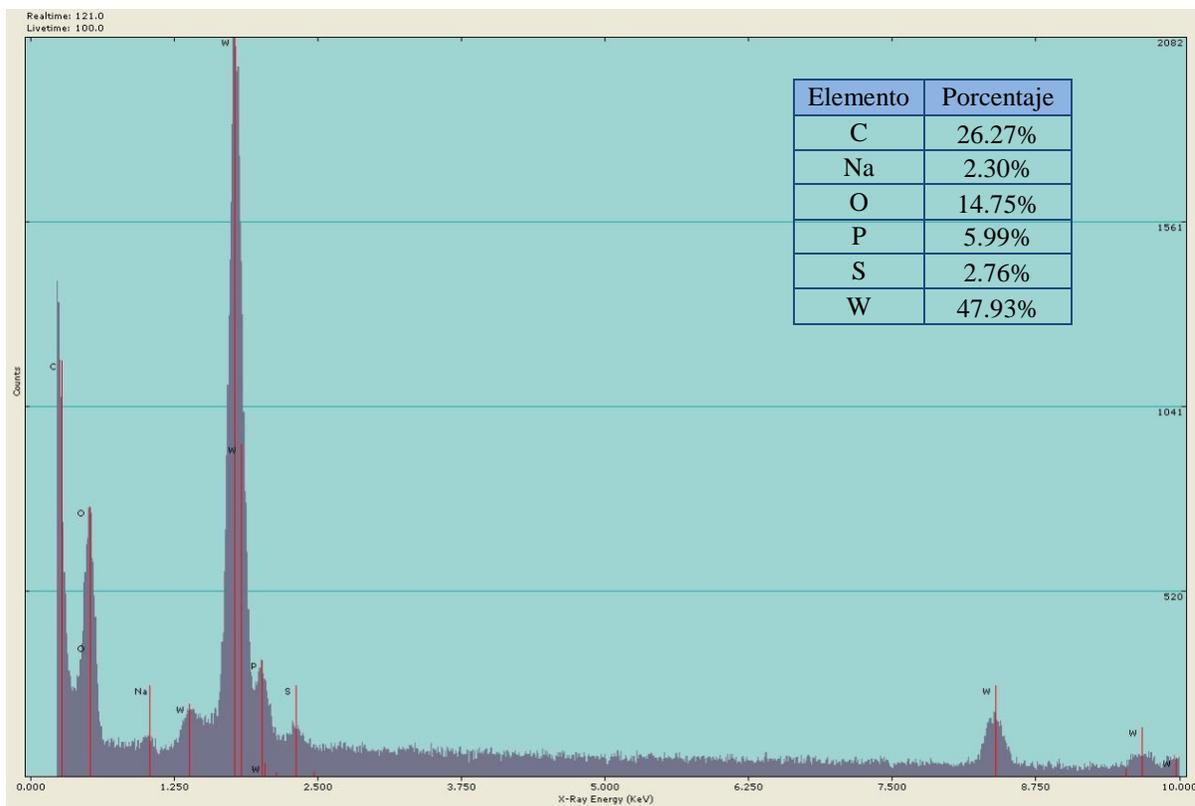


Figura 19. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 10 mg de WO<sub>3</sub>.

El gráfico anterior nos muestra que se tiene un porcentaje alto de tungsteno, como se esperaba, y un porcentaje considerable de materia orgánica, validando así que las micrografías tomadas del SEM exhiben parte de la mezcla bacteriana con  $WO_3$

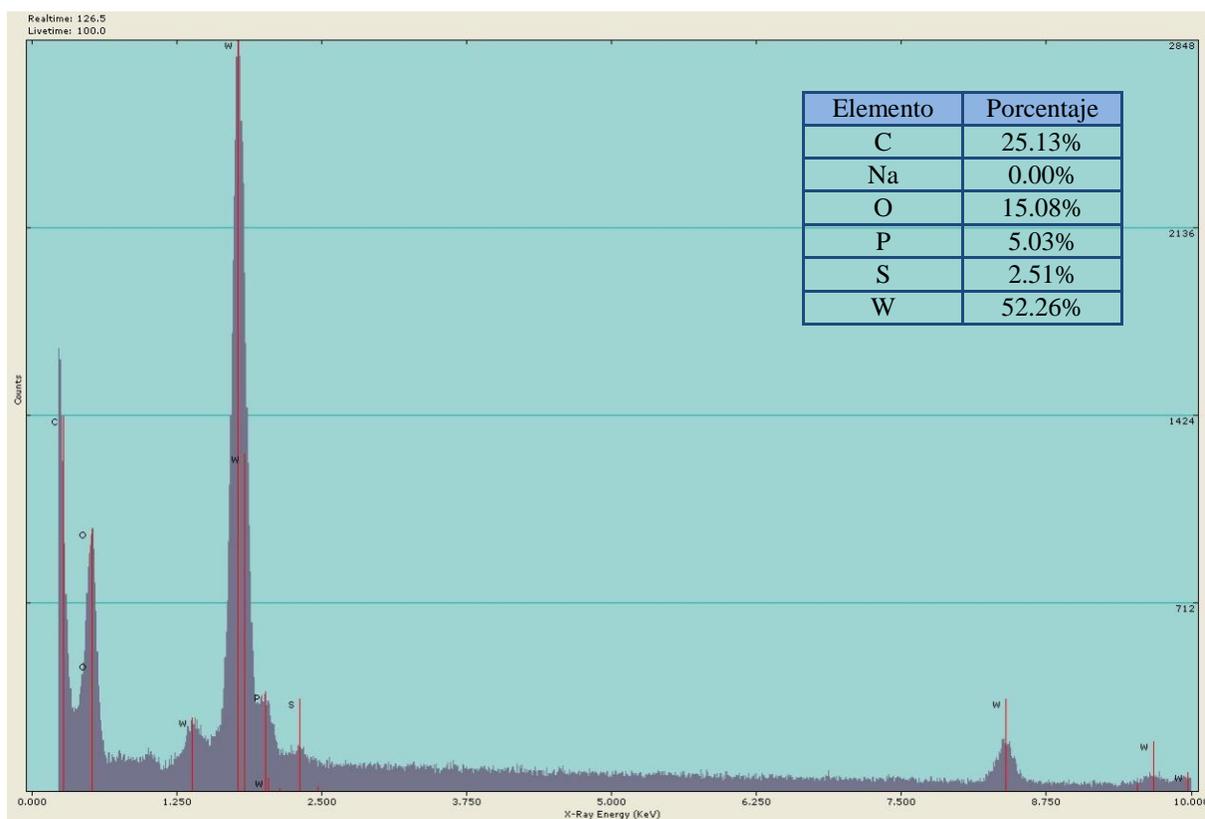


Figura 20. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 25 mg de  $WO_3$ .

Del mismo modo, el espectro de EDS de la figura 20, demuestra una ligera disminución del carbón y pérdida de sensibilidad en el censo del sodio debido al incremento del 40% de la cantidad de  $WO_3$  adicional en base al espectro de la figura 19.

En cambio, para el caso del espectro de EDS de la muestra bacteriana con 50 mg de  $WO_3$ , ya no se llega a distinguir claramente los elementos orgánicos dados por el bacilo, debido a que la masa bacteriana es sobrepasada por la cantidad de  $WO_3$  contenida en el espécimen analizado (véase figura 22).

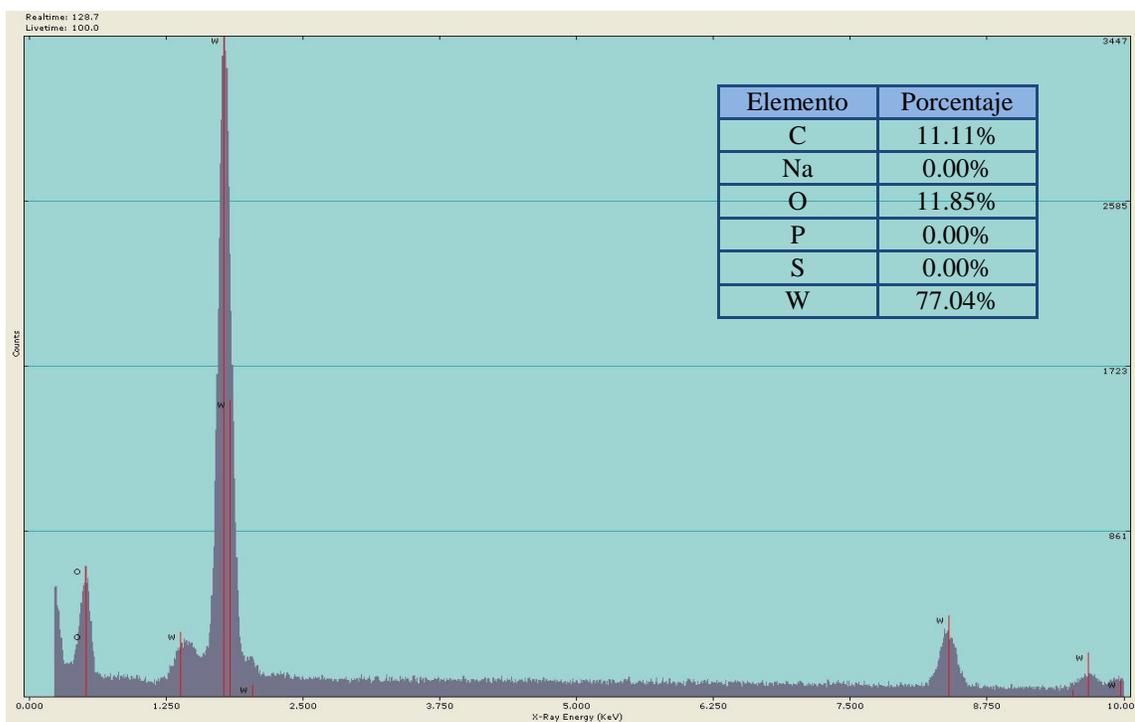


Figura 21. Espectro de EDS de la muestra bacteriana con 50 mg de  $WO_3$ .

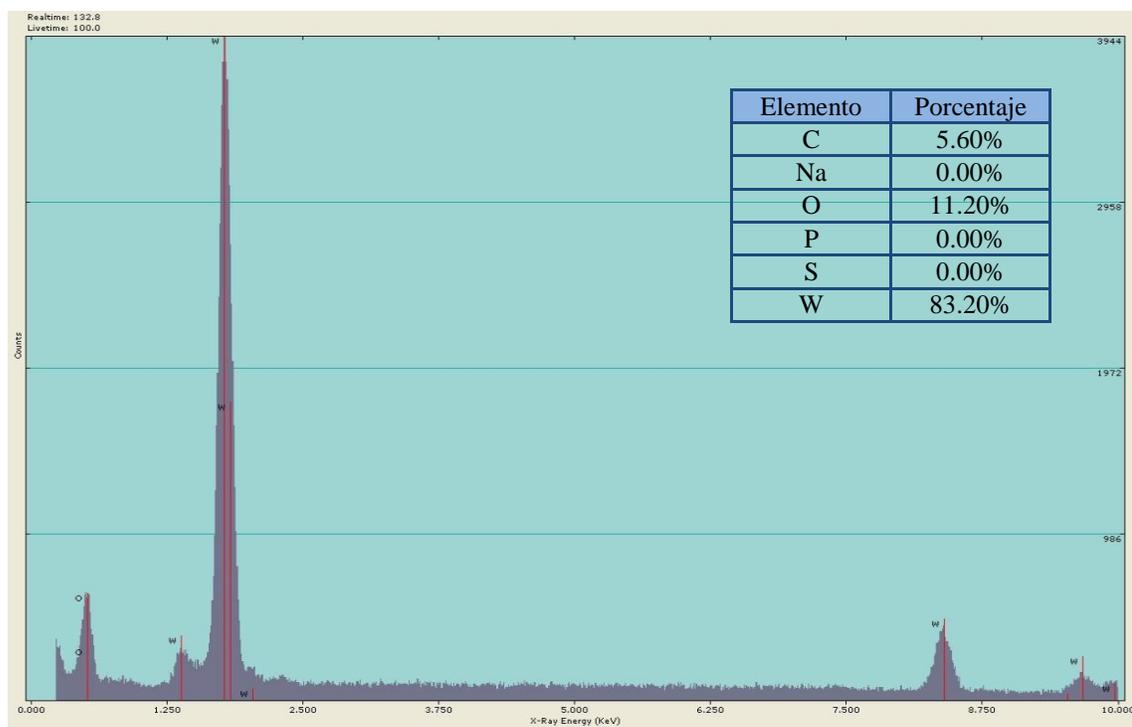


Figura 22. Espectro de EDS de las partículas de  $WO_3$ .

Para el caso  $WO_3$  puro, se le efectuó un espectro de EDS para demostrarse que no contiene ningún otro elemento aparte de W y O que forman al compuesto. Y efectivamente, así lo corroboró la figura 22.

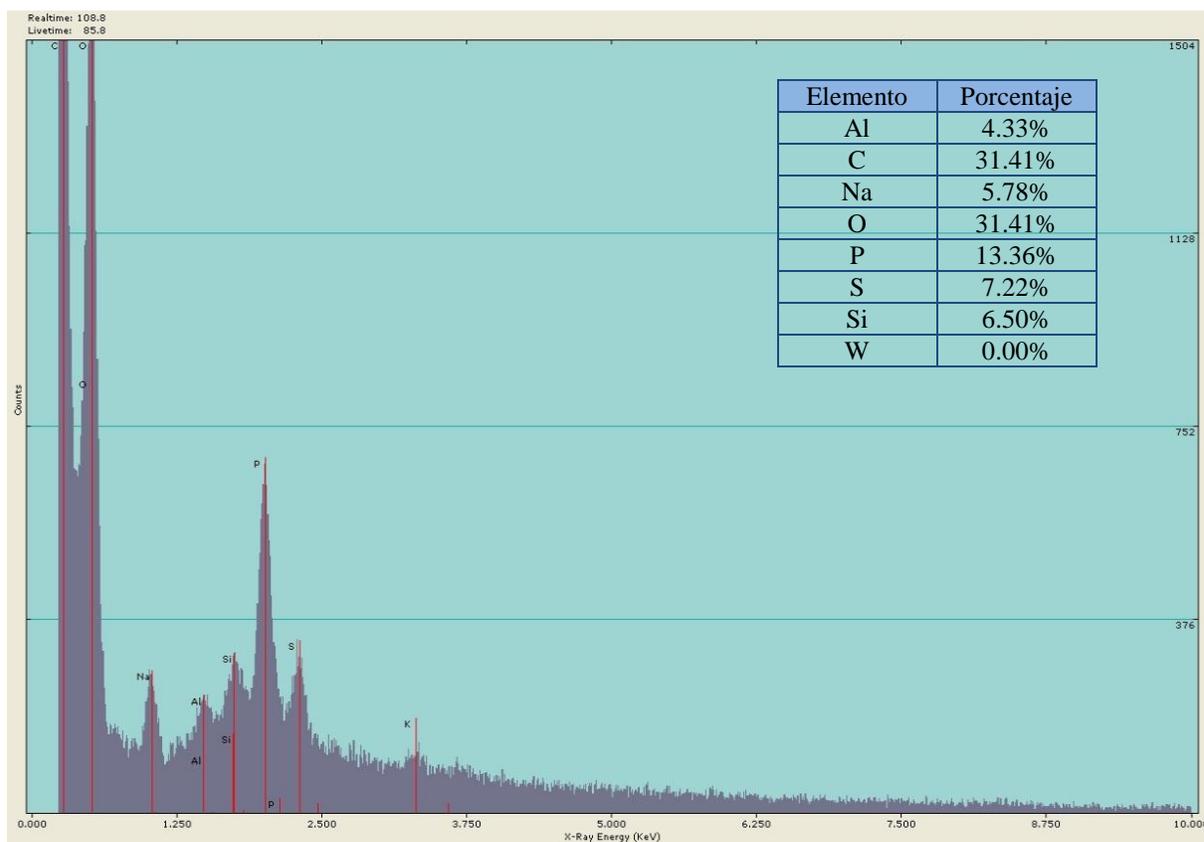


Figura 23. Espectro de EDS de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis*.

En contra parte, se realizó un espectro blanco con el bacilo *Tetrasphaedra duodecadis* para definir los elementos orgánicos participan en la constitución de mencionado microorganismo, habiendo mayor porcentaje el C y O, seguido del P y S, ambos pares de elementos comprendidos en las muestras con 10 y 25 mg de  $WO_3$  visiblemente, más sin embargo, para el caso de 50 mg de  $WO_3$  no se logra estimar de manera práctica estos porcentajes.

Se logró observar que todas las muestras bacterianas contenían elementos orgánicos en su espectro, presenta concentraciones variables de acuerdo a los miligramos de óxido contenido en las muestras analizadas. Los resultados mostraron que en las muestras solo se tienen los

elementos deseados, como bien se corroboró como base a los EDS puros de  $WO_3$  y de la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis*. Sin embargo se sabe que la principal desventaja de esta técnica de análisis es el área que analiza (menor de una micra), por lo tanto los resultados no son del todo representativos, ya que como se puede apreciar la concentración de elementos orgánicos disminuye con el aumento de la concentración de  $WO_3$  en las muestras.

### 3.4 Discusión del sensor bacteriano.

En este apartado se detallan los resultados experimentales del prototipo diseñado para detectar el oxígeno en una solución Tris- HCl por medio de la oxidación de la  $V_{B12}$  y como elemento de reconocimiento biológico a la bacteria *E. coli*. En cada gráfico presentado hubo aditamentos de vitamina B12 de  $50 \mu\text{l}$  a  $0.005 \text{ nM}$

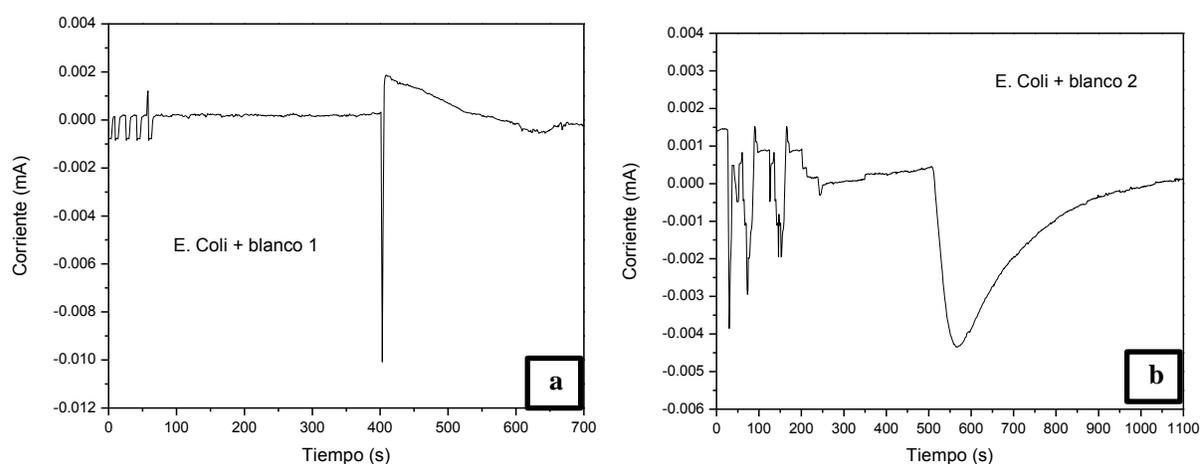


Figura 24. Respuestas de la *E. coli* a la adición de  $V_{B12}$  sin  $WO_3$ .  
a) primera respuesta, b) segunda respuesta

Observando las gráficas de la figura 24, en las cuales, el biosensor no incluye las partículas de  $WO_3$  para ser utilizado como patrón de comparación entre sin y con el óxido, es observable que los tiempos de estabilización iniciales de equipo para la adición de la vitamina B12 van de los 300 a 400 segundos aproximadamente, y para la reestabilización una vez añadida la primera dosis requiere aparentemente de 400 segundos haciendo el proceso un poco lento para su empleo.

Posteriormente, se llevaron a cabo otras dos mediciones, pero ahora incluyendo las partículas de  $\text{WO}_3$ , lográndose los siguientes resultados:

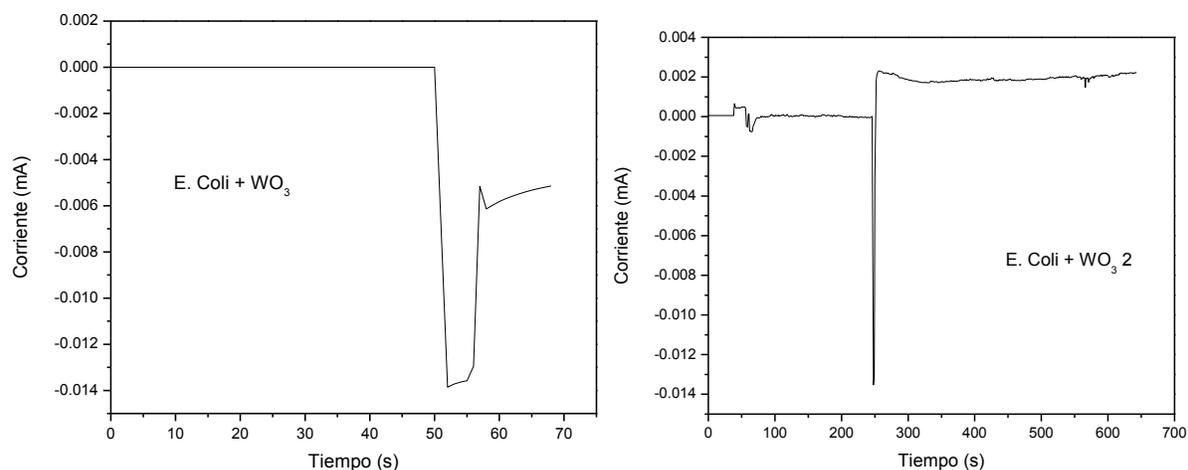


Figura 25. Respuestas de la *E. coli* a la adición de  $\text{V}_{\text{B12}}$  con  $\text{WO}_3$ .  
a) primera respuesta, b) segunda respuesta

Analizando las gráficas obtenidas de la figura 25, donde se incorpora al biosensor las partículas de  $\text{WO}_3$ , se percibe primeramente, que los tiempos de estabilización tanto del equipo como de la reestabilización por adición de la vitamina B12 se reducen un 75% en comparación a las lecturas del biosensor conseguidas sin el  $\text{WO}_3$ ; además de que las señales adquiridas no presentan tanta perturbación como las de la figura 24, lo que nos permite proponer que las partículas están manifestando un amortiguamiento de la señal y una disminución al tiempo de estabilización. En cuanto al decaimiento la señal, esta constituye una demanda de  $\text{O}_2$  por parte de la bacteria al oxidar la vitamina y un incremento en el escalón es una inhibición de la bacteria.

Comparando ambos pares de gráficos, se permite finalizar indicando que el  $\text{WO}_3$  presenta una mejora en el tiempo de respuesta facilitando mayor rapidez de sensado; una mayor sensibilidad, debido a la altura presente en los escalones, concediendo un rango mayor a la lectura de concentración del  $\text{O}_2$ .

## CAPÍTULO IV. Conclusiones

En resumen, el trabajo presentado permite extraer las siguientes conclusiones.

- ◆ Se caracterizó el crecimiento bacteriano y morfología de la *Tetrasphaedra duodecadis* no encontrado en la literatura.
- ◆ La morfología esférica hueca encontrada en las partículas  $WO_3$  propone su posible empleo en la constitución de partículas tipo “core-shell”.
- ◆ La respuesta observada en los bioensayos con *Tetrasphaedra duodecadis* en presencia del trióxido de tungsteno es que no se presenta efecto alguno en la proliferación bacteriana, en ninguna de las concentraciones evaluadas, manteniéndose en los dos métodos valorados el desarrollo bacteriano similar a los medios sin tungsteno.
- ◆ Las partículas de  $WO_3$  plantean un papel amortiguante en las señales del biosensor, además de una mejora en el tiempo de respuesta facilitando mayor rapidez del análisis y, finalmente una mayor sensibilidad, concediendo un rango mayor a la lectura de concentración del  $O_2$ .
- ◆ Se obtuvo un prototipo de biosensor con un elemento de reconocimiento biológico a base de la *Tetrasphaedra duodecadis* y partículas de  $WO_3$ .

Queda propuesto como trabajo futuro de investigación lo siguiente:

- Utilizar la bacteria *Tetrasphaedra duodecadis* en el biosensor.
- Obtener los resultados descritos con nanopartículas de  $WO_3$  preparadas por el método solvotermico en lugar de micropartículas comerciales que fueron las utilizadas en este trabajo.
- Definir los contrastes por el manejo de nano y micropartículas de  $WO_3$  en el biosensor.

## LITERATURA CITADA

- [1] Guozhong Cao, "Nanostructures and Nanomaterials: synthesis, properties and applications.," *Imperial College Press*, 2004.
- [2] J-P Borel, *Surf. Sci.*, vol. 106, 1, 1981.
- [3] A. S. Nepijko and E. Pippel. J. Woltersdorf, *Surf. Sci.*, vol. 106, 64, 1981.
- [4] Y.X. Li, W. Wlodarski, K. Kalantar-zadesh. K. Kalatsis, *Sens. Actuators B*, vol. 77, 478, 2001.
- [5] R. Roy and S. Komarneni. D.W. Hoffman, *Ceram. Bull.*, vol. 62, 375, 1983.
- [6] R. Mathur, S.R. Lee and J.Y. Yoo. B.M. Gallois, *Mater. Res. Soc.*, vol. 132, 49, 1989.
- [7] G.T. Chandrappa and J. Livage. B. Nagappa, *Pramana Journal of physics*, vol. 65, 917, no. 5, 2005.
- [8] S.J. Silvers, M.S. El-Shall. S. Li, *J. Phys. Chem.* , vol. 101, 1794, 1997.
- [9] B.S. Naidu, O.M. Hussain, M. Eddrief, C. Julien. K.V. Madhuri, *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 86, 165, 2001.
- [10] B. C. Joshi, D. P. Runthala, and R. P. Gupta G. Eranna, "Oxide Materials for development of integrated gas sensors - a comprehensive review. ," *Critical reviews in Solid State and Materials Sciences*, vol. 29, pp. 111-188, 2004.
- [11] A.M. Bende, A.B. Bodade, S.S. Patil, V.S. Sapkal. G.N. Chaudhari, *Sens. Actuators B*, vol. 115, pp. 297–302, 2006.
- [12] W. Olthuis, A. Berg. B. Timmer, *Sens. Actuators B*, vol. 107, pp. 666–677, 2005.
- [13] I. Blinov, M. Ivanov, J.R. Stetter. G. Korotcenkov, *Sens. Actuators B*, vol. 120, pp. 679–686, 2007.
- [14] Anupam Tripathi, Karunesh Tiwar. N. K. Pandey, "Humidity Sensing Studies of WO<sub>3</sub>-ZnO Nanocomposite. ," *Sensors & Transducers Journal*, vol. 104, Issue 5, pp. 109-118, May 2009.
- [15] Jun Liu, Yong Wang and Yuehe Lin. Yuyan Shao, "Novel catalyst support materials for PEM fuel cells: current status and future prospects.," *J. Mater. Chem*, vol. 19, pp. 46–59, 2009.
- [16] A. Gurlo, N. Barsan, U. Weimar, M. Antonietti, M. Niederberger, *Angew. J. Polleux, Chem. Int. Ed*, vol. 45, pp. 261–265, 2006.
- [17] G. Sakai, K. Shimano, N. Yamazoe. Y.G. Choi, *Sens. Actuators B*, vol. 101, pp. 107–111, 2004.
- [18] M.H. Kim, W.S. Um, H.S. Lee, J.K.S. Song, Ch. Choi, K.M. Yi, M.J. Lee, K.W. Chung. Y.K. Chung, *Sens. Actuators B*, vol. 60, pp. 49–55, 1999.
- [19] T. Yamazaki, Z.F. Liu, D. Meng, T. Kikuta, N. Nakatani. Y.B. Shen, *Thin Solid Films*, vol. 517, pp. 2069–2072, 2009.
- [20] Irina E. Gracheva, Vladimir V. Kuznezov. Vyacheslav A. Moshnikov, "Hierarchical nanostructured semiconductor porous materials for gas sensors," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 356, pp. 2020–2025, 2010.
- [21] P.A. Cox., "Transition Metal Oxides," *Clarendon Press, Oxford*, 1995.

- S. Radhakrishnanb, M. Parthibavarmana, R. Dhilipkumarb, C. Sekarb. V. Hariharana,  
[22] "Synthesis of polyethylene glycol (PEG) assisted tungsten oxide (WO<sub>3</sub>) nanoparticles for l-dopa bio-sensing applications.," *Talanta*, vol. 85, pp. 2166– 2174, 2011.
- Carlos Grellet B, Rossana E. Madrid A y Carmelo J. Felice A. Carmen C. Mayorga  
[23] Martínez A, "Biosensor Impedancimétrico de Glucosa Basado en GOx/Fe(CN)<sub>3</sub>/IrOx."
- D. Brown. C.O.H. Robert, "Vitamin B12 deficiency," *J. Am. Geriatr. Soc.*, vol. 67, pp.  
[24] 979–986, 2003.
- D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S. Thévenot, "Electrochemical Biosensors:  
[25] Recommended Definitions and Classification (Technical Report)," *Pure Appl. Chem*,  
vol. 71, 12, pp. 2333-2348, 1999.
- Y. Wang, E. Tamiya, M. Kawarai. I. Karube, "Microbial electrode sensor for vitamin  
[26] B12.," *Anal. Chim.*, vol. Acta 199, pp. 93–97, 1987.
- A. G. Lochhead, "Two new species of arthrobacter requiring respectively vitamin B12  
[27] and the terregens factor.," *ARCHIVES OF MICROBIOLOGY*, vol. 31, no. 1, pp. 163-  
170, 1958.
- Takashi Ishikawa & Akira Yokota, "Reclassification of *Arthrobacter duodecadis*  
[28] Lochhead 1958 as *Tetrasphaera duodecadis* comb. nov. and emended description of the  
genus *Tetrasphaera*," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1369-1373, June  
2006.
- Akira Yamasaki, Takeshi Iizuka, and Eiji Osawa., *Fullerenes, Nanotubes and Carbon*,  
[29] vol. 3, 5, pp. 529 - 543, 1995.
- K. Sanderson, "Sharpest cut from nanotube sword," *Nature* , vol. 444: 286, 2006.
- Vivek Sharma, Kyoungweon Park, and Mohan. Srinivasarao, "Colloidal dispersion of  
[31] gold nanorods: Historical background, optical properties, seedmediated synthesis, shape  
separation and self-assembly," *Material Science and Engineering Reports*, vol. 65, pp.  
1-38, 2009.
- Radushkevich L. V. and Lukyanovich V. M., *Zhur. Fiz. Khim.*, vol. 26, 88, 1952.
- A. M. Endo, and T. Koyama, Oberlin, "Filamentous growth of carbon through benzene  
[33] decomposition.," *J. Cryst. Growth*, vol. 32, pp. 335 – 349, March 1976.
- Izvestiya Akademii Nauk SSSR., *Metals.*, no. 3, pp. 12–17, 1982.
- C. J. Brabec, J. Bernholc. M. P. Campbell, 2. *Comput. Mater. Sci.*, vol. 8, 341.
- D. Peng, K. Sumiyama. T. Hihara, *Mater. Trans.*, vol. 42, 1480, 2001.
- P.C. Searson and T.P. Moffat., *Crit. Rev. Surf. Chem.* , vol. 3, 171, 1994.
- P. Melinon, V. Dupuis, B. Prevel, L. Bardotti, J. Tuailleon-Combes, B.Masenelli, M.  
[38] Treilleux, M. Pellarin, J. Lerme, E. Cottacin, M. Broyer, M.Negrier, F. Tournus, M.  
Gaudry A. Perez, *Mater. Trans.*, vol. 42, 1460, 2001.
- J.S. Lee, K.H. Ahn. J.H. Yu, *Src. Mater*, vol. 44, 2213, 2001.
- C. G. Granqvist and R.A. Buhrman., *J. Appl. Phys.*, vol. 47, 2200, 1976.
- V.M. Fuenzalida and G. Solórzano. D.E. Díaz-Droguett, *J. Nanosci. Nanotechno.* , vol.  
[41] 8, 5977, 2008.
- V.M. Fuenzalida, M. S. Díaz-Espinoza and G. Solórzano. D.E. Díaz-Droguett, *J. Mater.*  
[42] *Sci.* , vol. 43, 541, 2008.

- [43] K.K. Karukstis and G.R. Van Hecke, "Chemistry Connections: The Chemical Basis of Everyday Phenomena.," *San Diego: Academic Press*, p. 110, 2000.
- [44] Patnaik P., *Handbook of inorganic chemicals.*: McGraw Hill, 2003, pp. 948 – 953.
- [45] (2012, Agosto) Wikipedia. [Online]. <http://es.wikipedia.org/wiki/Wolframio>
- [46] N. P. L'vov, A. N. Nosikov, and A. N. Antipov, "Tungsten-Containing Enzymes.," *Biochemistry (Moscow)*, vol. 67(2), 196, 2002.
- [47] G.B. Seiffert et al., "Structure of the non-redox-active tungsten/[4Fe:4S] enzyme acetylene hydratase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS*, vol. 104, pp. 3073-3077, 2007.
- [48] A Sigel and H. Sigel, "Metals Ions in Biological System: Their Roles in Biological Processes: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes.," *CRC Press. USA*, vol. 39, p. 187, 2002.
- [49] D. Astruc, "The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments.," *New J. Chem.*, vol. 29, 42, 2005.
- [50] Greenwood N. N. and E. Earnshaw, *Chemistry of the Elements. (2nd edition)*, p. 1002, 1997.
- [51] Scott Han, Robert Raja Gabor A. Somorjai. Bing Zhou, "Nanostructure Science & Technology," *Nanotechnology in Catalysis*, vol. 3, Springer 2007.
- [52] Patnaik P., *Handbook of inorganic chemicals.*: McGraw Hill, 2003, pp. 953 – 954.
- [53] DANIEL GUILLERMO GALVEZ ARANCIBIA, "SINTESIS Y CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS DE OXIDO DE TUNGSTENO MEDIANTE CONDENSACION EN GAS INERTE (IGC)," *Tesis*, p. 11, enero 2011.
- [54] L. Dufour J. Nowotny, "Surface and near surfaces chemistry of oxides materials," *Elsevier, Amsterdam*, 1988.
- [55] L. Lozzi, M. Passacantando, and S. Santucci L. Ottaviano, "On the spatially resolved electronic structure of polycrystalline WO<sub>3</sub> films investigated with scanning tunneling spectroscopy," *Surface Science*, vol. 475, pp. 73-82, 2001.
- [56] C. G. Granqvist, "Electrochromic tungsten oxide films: review of progress 1993-1998," *Solar Energy Materials & Solar Cells.*, vol. 60, pp. 201-262, 1999.
- [57] L. Palmisano, A. M. Venezia, and V. Augugliano. A. Di Paola, "Coupled semiconductor systems for photocatalysis. Preparation and characterization of polycrystalline mixed WO<sub>3</sub>/WS<sub>2</sub> powders," *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, pp. 8236-8244, 1999.
- [58] A. Frennet, G. Leclercq, L. Leclercq, and J. M. Giraudon A. Löfbeg, "Mechanism of WO<sub>3</sub> reduction and carburization in CH<sub>4</sub>/H<sub>2</sub> mixtures leading to bulk tungsten carbide powder catalysts ," *Journal of Catalysis*, vol. 189, pp. 170-183, 2000.
- [59] P. J. Shaver., "Activated tungsten oxide gas detector," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 11, pp. 255-256.
- [60] G. Sakai, and K. Shimanoe N. Yamazoe, "Oxide semiconductor gas sensors," *Catalysis*, vol. 7, 2003.
- [61] J. F. Halsall, K. F. E. Pratt, J. O'Sullivan, R. L. Jones, R. A. Cox, S. R. Utembe, G. M. Hansford, and D. E. Williams. S. R. Aliwell, "Ozone sensors based on WO<sub>3</sub>: a model sensor drift and a measurement correction method," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 12, pp.

684-690, 2001.

- Elisabetta Comini, Giorgio Sberveglieri, Jun Zhou, Shao Zhi Deng, and Ning Sheng Xu,  
 [62] Yong Ding and Zhong Lin Wang. Andrea Ponzoni, *Applied Physics*, vol. 88, 203101, 2006.
- [63] B. O'Regan and M. Gratzel., *Nature London*, vol. 353, 737, 1991.
- [64] Gunnar A. Niklasson. Lars Berggren, *Solid State Ionics*, vol. 165, pp. 51-58, 2003.
- [65] Chia-Ching Liao., *Online edition of Solar Energy Materials & Solar Cells*, May 5 2006.
- [66] G. F. Zheng, O. Hayden, M. Lakadamyali, X. W. Zhuang, and C. M. Lieber F. Patolsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* , vol. 101,14017, , 2004.
- [67] F. Patolsky, Y. Cui, W. U. Wang, and C. M. Lieber. G. F. Zheng, *Nat.Biotechnol.* , vol. 23, 1294, 2005.
- Carlos Eduardo Sandoval Benetti, César Luis Sánchez Jorge Gustavo Romero Valdez,  
 [68] ""ANEMIA MEGALOBLASTICA: Revisión bibliográfica,"" *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina.*, no. 177, pp. 17-21, enero 2008.
- [69] Vives JL., "Macrocitosis y anemia macrocítica.," in *Hematología clínica 2a ed.* Barcelona: Doyma, 1988, pp. 194-212.
- [70] C. Lyons. L.C. Clark, *Ann. NY Acad. Sci.*, vol. 102, 29., 1962.
- [71] David Regatos Gómez, Biosensores ópticos de alta sensibilidad basados en técnicas de modulación plasmónica, febrero de 2012, Tesis.
- [72] R.F. Marcel Dekker Taylor., "Protein immobilization: Fundamentals and applications," *New York*, 1991.
- Nuria Peña García, Biosensores amperométricos compósitos basados en peroxidasa.  
 [73] Aplicación a la determinación de analitos de interés en alimentos mediante electrodos bienzimáticos y multienzimáticos, Madrid, 2003, Tesis.
- [74] M., Sanchez S., Ichinose I., Tang J. Pumera, "Electrochemical nanobiosensors.," *Sensors and Actuators B 123*, pp. 1195–1205, 2007.
- [75] H. B. Halsall, W. R. Heineman N. J. Ronkainen, "Electrochemical biosensors," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, 1747, 2010.
- [76] G. & Thextorn, H. Lochhead, "Vitamin B12 as growth factor for soil bacteria.," *Nature, Lond*, vol. 167, 1034., 1951.
- [77] Migula, , 1895.
- [78] C. C. BOOTH AND JANET HEATH, "The effect of E. coli on the absorption of vitamin B2," *Gut*, pp. 3, 70, 1962.
- Nagarajan Padmavathy and Rajagopalan Vijayaraghavan, "Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study.," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 9, p. 7, September 2008.
- [80] SHAILY MAHENDRA, KATHERINE ZODROW, DONG LI, YU-CHANG TSAI. CHANG WOO LEE, "DEVELOPMENTAL PHYTOTOXICITY OF METAL OXIDE NANOPARTICLES TO ARABIDOPSIS THALIANA," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 29, no. 3, pp. 669–675, 2010.
- [81] Francisco C. Téran, Roberto A. Oliveira, Edson A. A. Nour, Martha Juliana C. Araujo,

"Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge.," *Journal of Electron Microscopy*, vol. 52(4), pp. 429–433, 2003.

- [82] R. DE ZANGER & E. WISSE F. BRAET, "Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells," *Journal of Microscopy*, vol. 186, pp. 84–87, abril 1997.
- [83] *Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina.*, no. 177, p. 17, Enero 2008.
- [84] D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S., Thévenot, "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)," *Pure Appl. Chem*, vol. 71, 12, pp. 2333-2348, 1999.
- [85] Y. Wang, E. Tamiya, M. Kawarai, I. Karube, "Microbial electrode sensor for vitamin B12," *Anal. Chim. Acta 199*, pp. 93–97, 1987.

## ANEXOS

## A.1 Revivir el cultivo liofilizado

1. Abrir el vial como se muestra más abajo.
2. Agregar asépticamente el material liofilizado 0.3 a 0.4 ml (no más) de medio líquido con una pipeta Pasteur y mezclar bien.
3. Transferir la mezcla total a un tubo de ensayo del medio de caldo recomendado (5 a 6 ml). Las últimas gotas de esta suspensión también puede ser transferida a un agar inclinado.
4. Incubar los cultivos bajo las condiciones apropiadas. Teniendo en cuenta el tratamiento adecuado y las condiciones, la mayoría de los cultivos liofilizados crecerá en unos pocos días. Sin embargo, algunos pueden presentar un período de latencia prolongado y debe administrarse dos veces el tiempo de incubación normal antes de desechar como no viable.

