

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento
de quitosano para la determinación de bioacumulación en moscas

Drosophila melanogaster

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Químicas con
mención en Química Analítica

Elena Sofía Cárdenas Alcóser

Quito, 2015

CERTIFICACIÓN

CERTIFICACIÓN DE LA TERMINACIÓN DE LA DISERTACIÓN POR PARTE DEL DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, del candidato Elena Sofía Cárdenas Alcóser ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Fecha: 9 de marzo del 2015

Mtr. María Fernanda Pilaquina

A mis padres, que cada día me hacen una persona más maravillosa,

A mi hermano por hacerme más fuerte y recordarme cada vez quien soy,

A Steve, la persona que me hace soñar con ser cada día mejor

AGRADECIMIENTO

Existen tantas personas a las cuales debo agradecer por su apoyo y constante empuje hacia delante. En primer lugar, debo dar el más grande de los agradecimientos a mis padres que han estado conmigo en cada paso, a mi padre Jorge porque con su incesante cámara ha capturado los momentos más grandiosos de mi vida, mi madre Silvana, que me ha heredado su fuerza y me sostiene cuando siento que todo se desmorona a mi alrededor. A mi hermano que es el único de mi familia que en verdad me entiende cuando le hablo de química y me recuerda la persona que soy en realidad. A Steve, mi amor, mi amigo, mi compañero que ha transformado esas noches interminables de escritura en momentos de risas sin fin.

Le debo un enorme agradecimiento a mi directora del trabajo de titulación Máster María Fernanda Pilaquina, creyó en mí desde el inicio y me apoyo a seguir creciendo en esta vida. A Eliza Jara por abrirme los ojos a las maravillas de la química y ayudarme con todos los problemas que fueron surgiendo durante este largo año.

Debo un gigante abrazo y agradecimiento infinito a mi mejor amigo y colega Pedro Dávila por darme ánimos cuando iba rindiéndome en el camino y por pasar horas interminables conmigo en el AA. A Carlos Bautista (Charlie) por ayudarme con todo lo que necesitaba y más.

Al proyecto “Determinación de toxicidad de nanopartículas de hierro en moscas *Drosophila melanogaster*” código K12073 de la PUCE por la financiación de esta investigación.

Un agradecimiento muy grande a la Doctora Doris Vela por introducirme en el mundo de las *Drosophilas* y enseñarme que trabajar con individuos vivos, es muy diferente a trabajar con cosas inertes. A Lucia Rodríguez por enseñarme lo básico que un químico debe saber sobre los cuidados de moscas.

Agradezco a la Doctora Lorena Meneses por su ayuda y orientación, al Doctor Gallegos por su ayuda con el equipo AA, y a la Escuela de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en general por el préstamo de equipos y reactivos cuando fueron necesarios. Mi más noble gracias al Ing. Ernesto de la Torre de la Escuela Politécnica Nacional por su ayuda con el préstamo del SEM y al Doctor Alexis Debut de la Escuela Superior Politécnica del Ejército por su ayuda con el TEM.

Finalmente, mis agradecimientos a todas aquellas personas que directa o indirectamente me dieron su apoyo y creyeron en mí durante este largo viaje.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA	i
CERTIFICACIÓN.....	ii
AGRADECIMIENTO	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xvi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	5
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. NANOTECNOLOGÍA.....	5
1.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	9
1.2.1. NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA.....	14
1.3. QUITOSANO.....	19
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	23
CAPÍTULO II	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27

2.1.	SÍNTESIS DE QUITOSANO	27
2.2.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	28
2.3.	SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO	29
2.4.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO.....	31
2.5.	RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	32
2.6.	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	32
2.6.1.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	33
2.6.1.1.	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO	34
2.6.1.2.	MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA	36
2.6.2.	ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS	38
2.7.	MANIPULACIÓN Y CUIDADO DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i>	41
2.7.1.	MEDIOS DE CULTIVO	41
2.7.1.1.	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	42
2.7.1.2.	MEDIO DE CULTIVO CON NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBIERTA DE QUITOSANO	43
2.7.1.3.	CRUZAMIENTO DE LAS MOSCAS.....	45
2.8.	ESPECTROFOTOMETRÍA POR ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA	46

2.8.1. DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ESPECTROFOTOMETRÍA POR ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN MOSCAS <i>Drosophila melnaogaster</i>	46
2.8.1.1. BLANCOS	47
2.8.1.2. MUESTRAS EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO	48
2.9. SELECCIÓN DE MOSCAS EXPUESTAS A LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO	48
CAPÍTULO III	49
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1. EXTRACCIÓN DE QUITOSANO	49
3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO	57
3.2.1. FACTORES QUE AFECTAN EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA	58
3.2.1.1. TEMPERATURA	58
3.2.1.2. REDUCTOR	58
3.2.1.3. pH	59
3.2.1.4. AGITACIÓN	60
3.2.1.5. ATMÓSFERA	61
3.2.1.6. ULTRASONIDO	61

3.2.2.	RENDIMIENTO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO.....	62
3.3.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO.....	63
3.4.	CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	67
3.4.1.	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBIERTA.....	69
3.4.2.	CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA FUNCIONALIZADAS CON QUITOSANO	70
3.5.	DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	73
3.5.1.	BLANCOS	73
3.5.2.	DETERMINACIÓN DE HIERRO EN MEDIOS DE CULTIVO CON NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO	76
3.5.3.	DETERMINACIÓN DE HIERRO EN PRIMERA GENERACIÓN DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i> EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO.....	79
3.6.	CONTEO DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i> EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO.....	82
3.7.	MORFOLOGÍA DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i> MINÚSCULAS EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	86

CAPÍTULO IV	91
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
4.1. CONCLUSIONES.....	91
4.2. RECOMENDACIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXOS	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Porcentaje de quitina en estructuras de organismos vivos	20
Tabla 1.2. Ciclo de vida de la mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Tabla 3.1. Eficiencia de extracción de quitosano	52
Tabla 3.2. Análisis Espectro Infrarrojo de quitosano extraído	54
Tabla 3.3. Rendimiento de síntesis por coprecipitación de nanopartículas de magnetita .	63
Tabla 3.4. Rendimiento de síntesis por coprecipitación de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con quitosano	66
Tabla 3.5. Concentración de hierro en blancos	74
Tabla 3.6. Concentración de hierro en moscas blancos <i>Drosophila melanogaster</i>	75
Tabla 3.7. Concentración de hierro en medios de cultivo de moscas.....	77
Tabla 3.8. Concentración de hierro en moscas expuestas a Nanopartículas de Magnetita	80
Tabla 3.9. Número promedio de moscas por concentración de nanopartículas de magnetita.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Tipos de nanopartículas: a) Solución de nanoestructura de oro tamaño 5 nm b) Nanopartícula de plata tamaño 5 nm c) Nanopartícula de hierro bajo la influencia de un imán externo	6
Figura 1.2. Escala de tamaño de diferentes organismos y compuestos comparados con una nanopartícula	8
Figura 1.3. Resonancia magnética nuclear de acumulación de nanopartículas de magnetita en tejidos dañados.....	10
Figura 1.4. Tipos de materiales magnéticos: a) Paramagnetismo, b) Ferromagnetismo	12
Figura 1.5. Nanopartículas de magnetita	15
Figura 1.6. Esquema de las posibles funcionalizaciones de una nanopartícula	16
Figura 1.7. Nanopartícula funcionalizada con poli-4-vinilpiridina, polioxietilen-alil-éter y diferentes fármacos.....	18
Figura 1.8. Fórmula de la quitina	19
Figura 1.9. Molécula de quitosano, (m) grupo quitina, (n) grupo quitosano.....	21
Figura 1.10. Nanopartículas de magnetita recubierta con quitosano.....	22
Figura 1.11. Moscas <i>Drosophila melanogaster</i> : a) Macho, b) Hembra	23
Figura 1.12. Ciclo de vida de mosca <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Figura 2.1. Medio de reacción sometido a atmósfera inerte de helio	29
Figura 2.2. Nanopartículas de magnetita activadas en etanol, separadas con un imán de neodimio, hierro y boro Supermagnete®	30
Figura 2.3. Nanopartículas de magnetita recubiertas de quitosano sin lavar	31
Figura 2.4. Muestras de nanopartículas de magnetita en caja Petri.....	35
Figura 2.5. Microscopio de Barrido marca TESCAN	36

Figura 2.6. Microscopio FEI Tecnai G2 Spirit Twin	37
Figura 2.7. Vibraciones de tensión y flexión al incidir radiación en el infrarrojo.....	39
Figura 2.8. Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformadas de Fourier marca Perkin Elmer	40
Figura 2.9. Medios de cultivo de moscas <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Figura 2.10. Bomba peristáltica dosificadora.....	43
Figura 2.11. Medios de cultivo nanopartículas de magnetita: a) Blanco con moscas <i>Drosophila melanogaster</i> (1), b) 100 mg/L, c) 500 mg/L. Medios con nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano d) 100 mg/L, con pupas de moscas (2), e) 250 mg/L, f) 500 mg/L, g) 1000 mg/L.	44
Figura 3.1. Desacetilación de la quitina	50
Figura 3.2. Estructura híbrida de quitina-quitosano	51
Figura 3.3. Quitosano obtenido a partir de cáscaras de camarón	51
Figura 3.4. Espectro infrarrojo de quitosano extraído	53
Figura 3.5. Espectro infrarrojo utilizado como estándar para la identificación del quitosano	56
Figura 3.6. Funcionalización de las nanopartículas de magnetita con quitosano.....	64
Figura 3.7. Nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano expuestas a un campo magnético externo	65
Figura 3.8. Espectro de energía dispersiva de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento	67
Figura 3.9. Espectro de energía dispersiva de nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano	68
Figura 3.10. Nanopartículas de magnetita vistas con el Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) Escala: 20 nm	69

Figura 3.11. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento.....	70
Figura 3.12. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita recubierta con quitosano	71
Figura 3.13. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano. Síntesis con concentración de quitosano (a) 0.125%, (b) 0.25 %, (c) 0.5 % (d) estructura del quitosano puro	72
Figura 3.14. Concentración teórica versus concentración práctica de nanopartículas de hierro solas en medio de cultivo.....	78
Figura 3.15. Concentración teórica versus concentración práctica de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con quitosano en medio de cultivo	79
Figura 3.16. Concentración de hierro en moscas expuestas a nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano por dispersión.....	81
Figura 3.17. Concentración de hierro en moscas expuestas a nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano por análisis de barras.....	82
Figura 3.18. Número de individuos moscas totales por concentración utilizada	84
Figura 3.19. Número de moscas <i>Drosophila melanogaster</i> obtenidas por concentración de hierro a la cual fueron expuestas	85
Figura 3.20. Moscas <i>Drosophila</i> analizadas: a) Larva de <i>Drosophila melanogaster</i> b) Mosca adulta <i>Drosophila melanogaster</i> . Ninguna de los individuos de las imágenes fue expuesta a nanopartículas de magnetita o a exceso de hierro. .	86
Figura 3.21. Mosca <i>Drosophila melanogaster</i> expuesta a 100 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento	87
Figura 3.22. Moscas <i>Drosophila melanogaster</i> expuestas 500 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento: a) vista lateral, b) vista ventral	87
Figura 3.23. Moscas <i>Drosophila</i> analizadas: a) Larva de mosca <i>Drosophila melanogaster</i> F3 usadas como blanco, b) Larva de mosca <i>Drosophila melanogaster</i> nacida	

en medio de cultivo con concentración de 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita 88

Figura 3.24. Mosca *Drosophila melanogaster* nacida en medio de cultivo con 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita 89

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: CÁLCULO DE CONCENTRACIONES DE HIERRO EN MUESTRAS	103
1.1. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE HIERRO EN BLANCOS DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i>	104
1.2. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN MUESTRAS DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i> EXPUESTA A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA	105
ANEXO 2: ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO.....	106
2.1. CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	107
2.2. REGRESIÓN LINEAL DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN, LINEALIDAD Y LÍMITES DE CONFIANZA	108
2.3. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	116
2.4. FORTIFICACIONES DE MUESTRAS	119
ANEXO 3: TABLA GENERAL DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL ESTUDIO.....	122
ANEXO 4: CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN BLANCOS DE MOSCAS <i>Drosophila melanogaster</i>	134

ANEXO 5: CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO..... 136

5.1. CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO.....137

5.2. CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO.....138

ANEXO 6: CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO..... 139

6.1. CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO.....140

6.2. CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO141

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo cuantificar el contenido de hierro presente en nanopartículas de óxido ferroso-férrico o de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano en moscas *Drosophila melanogaster*. El quitosano utilizado se obtuvo a partir de cáscaras de camarón, extrayendo el compuesto de la quitina por desacetilización química. Para la obtención de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento se realizó una síntesis por coprecipitación, empleando como agente reductor hidróxido de sodio e hidróxido de amonio respectivamente. El tamaño de las nanopartículas sin recubrimiento, se determinó a través de la técnica de Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) y el análisis elemental de ambos tipos de nanopartículas de magnetita utilizadas, se empleó un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El recubrimiento con quitosano de las nanopartículas, se comprobó por espectroscopía de infrarrojos con transformadas de Fourier y atenuancia total reflejada (FTIR-ATR). El análisis de hierro se realizó en el medio de cultivo y en las moscas *Drosophila melanogaster* antes y después de la exposición a las nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano, de acuerdo al método A.O.A.C. 999.11 por Espectrofotometría de Absorción Atómica. La bioacumulación de hierro se determinó por conteo de individuos de la primera generación (F1) de las moscas expuestas a las nanopartículas. Para determinar la acumulación de hierro en las moscas, se probaron cuatro concentraciones de nanopartículas de magnetita: 100, 250, 500 y 1000 mg/L. En cada concentración estudiada se utilizaron 50 cruzamientos de moscas por mes durante un periodo de tres meses. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas de tamaño promedio de 10 nm, rendimientos de reacción mayores al 90% y una correcta funcionalización con quitosano. La bioacumulación de hierro en moscas para la concentración de 100, 250 y

1000 mg/L fue de 6,6 mg/kg, 21.4 mg/kg y 39,5 mg/kg respectivamente. En la concentración de 500 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento, no se observó acumulación de hierro. En cuanto a la reproducción, la presencia de las nanoestructuras provocó una exuberante fertilidad en las moscas, ya que a 100 mg/L, 250 mg/L y 1000 mg/L nacieron 1193, 1551 y 1350 individuos respectivamente. A 500 mg/L de nanopartículas sin recubrimiento, la fertilidad fue la más cercana a lo normal con 714 moscas. Por otro lado, al exponer a las moscas a nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano la bioacumulación de hierro disminuyó, encontrándose en un rango de 8,8 mg/kg a 25,8 mg/kg, además que la cantidad de moscas fue de 819 individuos a 1147 individuos, demostrando que la alteración a nivel reproductivo fue menor. Para comprobar que las dosis de nanopartículas de magnetita empleadas en F1 no afectan morfológicamente a las moscas estudiadas, se comparó la apariencia física con individuos de posteriores cruzamientos expuestos a nanopartículas de magnetita sin recubrimiento, observándose la formación de tumores, provocados por un efecto aparentemente somático del exceso de hierro. Se concluye que al recubrir las nanopartículas de magnetita con quitosano se presenta una menor bioacumulación de hierro en las moscas *Drosophila melanogaster*.

Palabras Claves: Nanopartículas de magnetita, quitosano, hierro, *Drosophila melanogaster*, bioacumulación.

ABSTRACT

The purpose of this research was to quantify iron in *Drosophila melanogaster* flies after its exposition to ferrous-ferric oxide nanoparticles (magnetite nanoparticles) with and without chitosan coating. Chitosan was obtained from shrimp shells by deacetylation of extracted chitin. Magnetite nanoparticles with and without a coating were obtained by coprecipitation synthesis; as reducing agent, sodium hydroxide and ammonium hydroxide were employed. The size of magnetite nanoparticles without coating was determined by Transmission Electronic Microscopy (TEM) and elemental analysis of both types of magnetite nanoparticles were performed with a Scanning Electronic Microscope with X-Ray detector (SEM). FTIR-ATR analysis was carried out to assure the coating of magnetite nanoparticles with chitosan. Iron quantitation was done by A.O.A.C. 999.11 method which employs Atomic Absorption Spectrophotometry; culture media and *Drosophila melanogaster* flies (before and after the exposition to magnetite nanoparticles, with and without coating of chitosan) were analyzed. Iron's bioaccumulation was determined by counting individuals of first generation (F1) from the flies exposed to nanoparticles; such individuals were tested for iron content as well. Bioaccumulation essays were conducted at four concentrations of nanoparticles: 100, 250, 500 and 1000 mg/L. For each concentration studied, fifty crosses of flies were obtained monthly during 3 months.

Synthesized nanoparticles showed an average size of 10 nm; reaction yield was greater than 90%. FTIR-ATR spectra indicated a successful coating with chitosan. Bioaccumulation for each concentration of 100, 250 and 1000 mg/L showed the following iron values: 6,6 mg/kg, 21,4 mg/kg and 39,5 mg/kg, respectively. However, 500 mg/L concentration of magnetite nanoparticles without coating did not result on bioaccumulation. An exuberant fertility in flies was associated with the presence of

magnetite nanoparticles, because at 100, 250 and 1000 mg/L were born 1193, 1551 and 1350 individuals respectively. For 500 mg/L of magnetite nanoparticles without coating, fertility of flies was the closest to control values. When flies were exposed to magnetite nanoparticles coated with chitosan, bioaccumulation was lower, showing values between 8.8 and 25.8 mg/kg. In addition, the quantity of flies obtained was within a range of 819 to 1147 individuals, suggesting a lower toxicity. To demonstrate that doses of magnetite nanoparticles used in the first generation do not affect flies morphology, physical appearance of subsequent crosses exposed to magnetite nanoparticles without coating was used for comparison; formation of tumors was related to a somatic effect of iron excess. In conclusion, it was found that magnetite nanoparticles coated with chitosan showed lower bioaccumulation and lower decrease of fly fertility compared to non-coated nanoparticles.

Key words: Magnetite nanoparticle, chitosan, iron, *Drosophila melanogaster*, bioaccumulation.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. NANOTECNOLOGÍA

La nanociencia es un área emergente de las ciencias investigativas, se ocupa del estudio de los fundamentos y propiedades de los objetos que se encuentran a dimensiones menores de 100 nm. Es importante recalcar que la nanociencia estudia a las nanoestructuras, pero es la nanotecnología la encargada de su aplicación y estudio [1].

La investigación y creación de nuevas tecnologías son el motor que mueve al mundo moderno, siendo la nanotecnología la base de la próxima revolución tecnológica que sufrirá el planeta, como lo fueron las máquinas de vapor y el descubrimiento de la electricidad con sus innumerables usos. Es importante nombrar que la revolución informática abrió la puerta hacia el estudio de la tecnología cada vez más pequeña, con circuitos integrados en tamaños de centímetros, después en milímetros, micrómetros, finalmente llegando a nanómetros, siendo éste el nacimiento de la nanotecnología y la revolución del mundo nanométrico [2].

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica, es decir a dimensiones menores de 100 nm [3]. El motivo por el cual la escala nanométrica es tan prometedora, es debido a que al trabajar con dimensiones tan pequeñas, los elementos y

compuestos presentan propiedades físicas y químicas completamente diferentes a las de su estado macrométrico. El oro por ejemplo, en escala nanométrica puede ser de color rojo, azul o anaranjado, dependiendo del tamaño de partícula y de la forma de la nanoestructura [3]. El hierro como nanopartícula, adquiere la propiedad de ser superparamagnético, lo que le permite formar ferrofluidos [2]. Y la plata, que al presentar granulometría nanométrica, se convierte en un bactericida sumamente potente por lo cual puede ser utilizado en medicina como esterilizador por excelencia, todas estas estructuras se pueden observar en la Figura 1.1 [4].

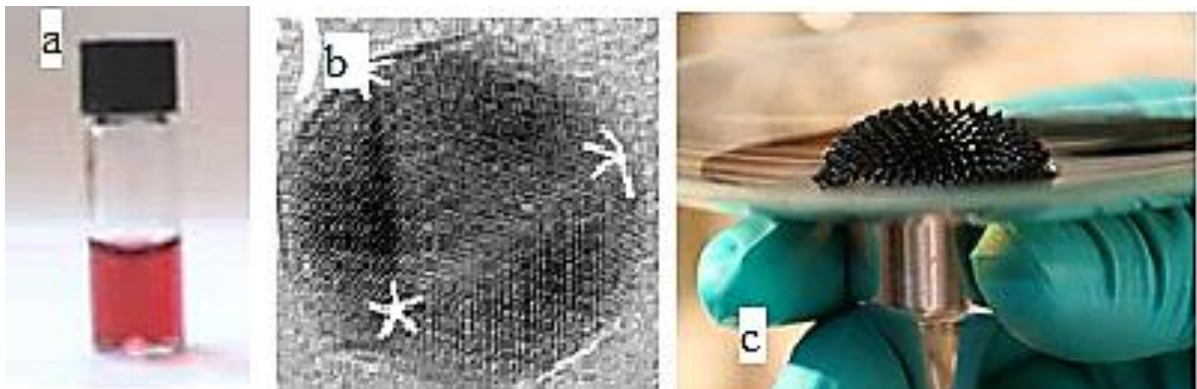


Figura 1.1. Tipos de nanopartículas: a) Solución de nanoestructura de oro tamaño 5 nm [4] b) Nanopartícula de plata tamaño 5 nm [5] c) Nanopartícula de hierro bajo la influencia de un imán externo [4]

No existe una definición única para el término de nanopartícula, aunque gran cantidad de autores convienen en que las nanopartículas, llamadas también por sus siglas NPs, son porciones de materia diferenciadas del medio donde se encuentran y su longitud debe estar comprendida entre 1 a 100 nm en cualquiera de sus dimensiones. El termino nanomaterial se refieren al estudio de sistemas de nanopartículas. Así, los nanomateriales y su estudio

abren una importante puerta para nuevos conocimientos y tecnologías, que pueden ser aplicados tanto para campos científicos como industriales [5].

La vanguardia de uso de nanomateriales se encuentra en la biomedicina, rama de la medicina encargada de estudiar el uso de nuevas tecnologías, como la implementación de nanotransportadores de fármacos o tratamiento localizado de enfermedades.

La biomedicina emplea nanoestructuras, debido a que presentan características no observables en las estructuras macrométricas como el superparamagnetismo del hierro, pero al mirar estas nanopartículas como moléculas son tan grandes que permiten el acceso al mundo cuántico que antes era imposible e impensable para los científicos [6]. Una forma sencilla de comprender esta característica única de las nanopartículas es comparándolas con materiales conocidos.

Como se puede observar en la Figura 1.2, las nanoestructura se presentan en una escala de medida comprendida entre una bacteria y el tamaño de una molécula de ADN, siendo lo suficientemente pequeña para no ser observada a simple vista, lo que potencia cada una de sus características, mientras que es tan grande a la vez que permite observar su comportamiento en un campo donde antes era imposible [7].

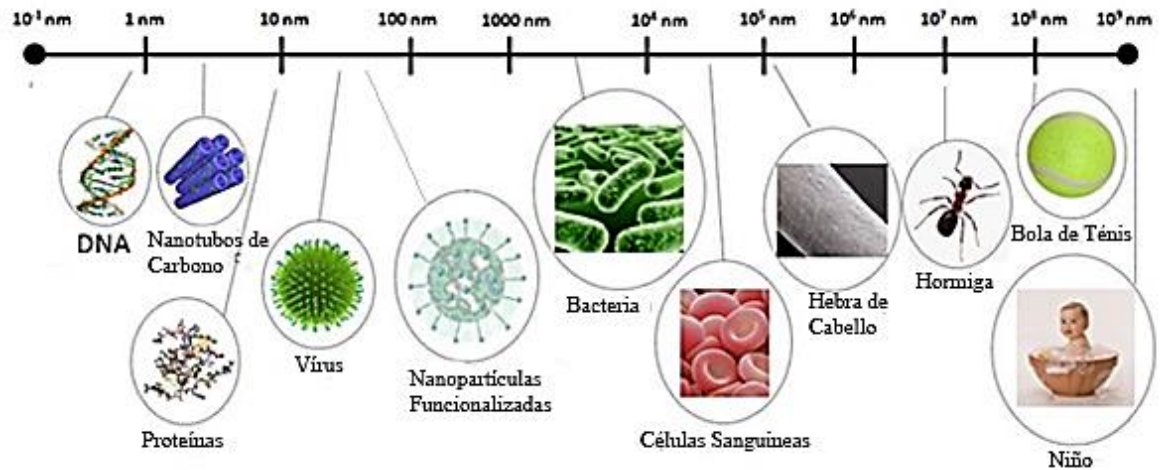


Figura 1.2. Escala de tamaño de diferentes organismos y compuestos comparados con una nanopartícula [8]

La biomedicina se encuentra dividida en 3 áreas básicas, las cuales depende del uso que se está dando a las nanoestructuras [9]. El área de nanodiagnóstico se encarga de diagnosticar enfermedades en forma de imágenes u obtener resultados de análisis inmediatos sin intervención invasiva [10]. La medicina regenerativa utiliza a las nanoestructuras como un medio para transportar células madres, regenerar tejidos y órganos o en casos extremos los reemplaza. Finalmente, la nanoterapia es la encargada de actuar contra inicios de enfermedades celulares, liberar y transportar compuestos activos [11].

Es fundamental mencionar que la nanoterapia, permite el tratamiento localizado de enfermedades evitando el daño de otras estructuras u órganos dentro del cuerpo humano, para lo cual utiliza nanotransportadores, los cuales son nanoestructuras que presentan la capacidad de moverse con facilidad dentro de un ambiente biológico y pueden ser dirigidas desde el exterior sin causar daño al cuerpo humano [12]. Se han investigado y probado

gran cantidad de posibles nanotransportadores concluyendo que las nanopartículas magnéticas son las más acertadas [13].

1.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

El estudio de las nanopartículas magnéticas inició en la década de 1940, cuando William Fuller Brown y Louis Néel iniciaron sus estudios sobre partículas con un solo dominio magnético y descubrieron las propiedades superparamagnéticas que adquieren los materiales magnéticos al estar en una escala nano [14].

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son un tipo de nanoestructura, que se encuentran formadas por un núcleo magnético, que puede ser recubierto por un polímero orgánico que le permite una mayor biocompatibilidad y le confiere la capacidad de transportar compuestos de interés en su capa exterior. Comúnmente, el núcleo metálico es un elemento magnético o sus respectivos óxidos, como por ejemplo hierro, magnetita, níquel, cobalto o ferrita de cobalto [15].

La biomedicina ha considerado a las NPMs como uno de los nanomateriales con mayor posibilidades de aplicación, debido al comportamiento magnético y el pequeño tamaño que presentan, permitiendo una interacción a niveles celulares, subcelulares e incluso moleculares, por ejemplo utilizar a las NPMs como medio de contraste de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) como se muestra en la Figura 1.3, o dar muerte celular por hipertermia [16]. Además, pueden ser controladas con un campo magnético

externo sin causar daño alguno a los tejidos o membranas, siendo capaces de llevar a un lugar exacto un medicamento específico.

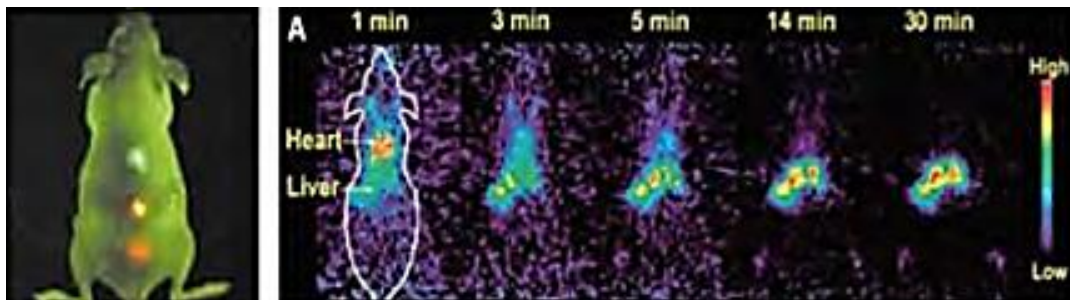


Figura 1.3. Resonancia magnética nuclear de acumulación de nanopartículas de magnetita en tejidos dañados [15]

La cualidad más importante de este tipo de nanopartículas es su reacción a la presencia de una fuerza magnética externa, debido a su carácter magnético extremadamente fuerte. Lo destacable de esta característica es que desaparece al suspender el campo magnético externo. Esta particularidad se conoce como superparamagnetismo y dependerá del tamaño y origen de las nanopartículas.

Respecto al comportamiento magnético, este dependerá de los orbitales libres presentes en su estructura, de los electrones desapareados y de la estructura del material. Los gases nobles son elementos que presentan todos sus electrones apareados y los niveles electrónicos llenos, por consiguiente, presentan un carácter diamagnético, es decir que repele a los elementos magnéticos debido a que, al tener todos sus electrones apareados, los espines no pueden moverse libremente para cambiar a favor la fuerza magnética,

repeliendo las líneas del campo magnético, muchas veces la repulsión es tan fuerte que los materiales diamagnéticos levitan sobre un material magnético fuerte [14].

Los materiales magnéticos deben su característica, no solo a las propiedades atómico-moleculares, sino también al efecto colectivo que requiere una estructura sólida, dando lugar a un tipo de magnetismo llamado ferromagnetismo, en el cual se necesitan elementos que presenten configuraciones electrónicas que favorezcan el movimiento de los electrones y los espines de los mismos en la misma dirección de las líneas de campo magnético externos, además la estructura sólida del material debe estar conformada por dominios magnéticos que reaccionen favorablemente a la presencia de una fuerza magnética [15].

El hierro presenta 26 electrones en total, distribuidos de tal manera que en el subnivel 3d se ubican únicamente 6 electrones de los 10 que esta posibilitado en contener, debido a que el subnivel se encuentra incompleto. El hierro tiene una estructura sólida formada por dominios muy marcados, exhibiendo un momento magnético sumamente fuerte [14]. Es importante recalcar que los materiales ferromagnéticos mantienen un magnetismo remanente aún después de estar un largo periodo de tiempo lejos de cualquier influencia magnética, debido a que los momentos de atracción hacia la fuerza externa no vuelven a su posición original, sino se quedan mayoritariamente orientados hacia el campo aplicado [16].

Existen otros materiales que presentan un comportamiento magnético débil conocido como paramagnetismo. Si un material paramagnético es expuesto a un campo magnético exterior elevado, los momentos magnéticos de los materiales paramagnéticos se tienden a ordenar

de forma paralela al mismo, cuando las temperaturas son lo suficientemente bajas o el campo exterior es muy grande. En otras palabras, los dipolos del material se orientan en la misma dirección y sentido que el campo magnético aplicado, dando como resultado un carácter magnético débil, casi imperceptible, pero presente. Una característica muy importante de los materiales paramagnéticos es que si se elimina el campo externo aplicado el efecto magnético desaparece, como se representa en la Figura 1.4 [17].

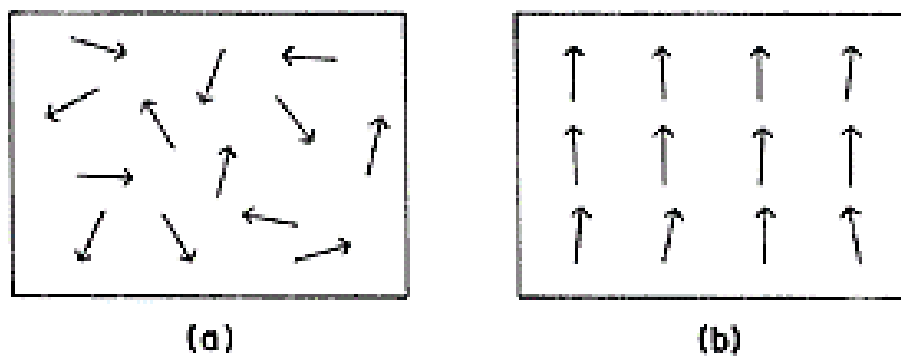


Figura 1.4. Tipos de materiales magnéticos: a) Paramagnetismo, b) Ferromagnetismo [18]

Se pensaría que el tipo de magnetismo que presentan las NPMs sería el ferromagnetismo, debido a que provienen de materiales magnéticos, pero al disminuir el tamaño de partícula a escala nanométrica, se forma una nanoestructura de un solo dominio magnético, la cual al estar en presencia de un campo magnético externo exhibe un carácter magnético sumamente fuerte. Sin embargo, al eliminar el campo magnético se pierde automáticamente toda la fuerza magnética, como le sucede a los materiales paramagnéticos, por esta razón las NPMs funcionan bajo un tipo de magnetización llamada superparamagnetismo [17].

Los materiales magnéticos que presentan superparamagnetismo a escala macrométrica, muestran una estructura cristalina donde se pueden observar multidominios que se encuentran delimitados entre sí por una barrera llamada pared del dominio. Cuando se produce una magnetización espontánea, cada dominio puede orientarse en diferentes direcciones del espacio, pero entre un dominio y otro, la magnetización debe cambiarse únicamente dentro de las paredes de cada dominio. Por consiguiente, por cada dominio creado, existe un gasto energético alto debido a la necesidad de la creación de las respectivas paredes [14].

Al reducir el tamaño del material, los costos de mantener la pared del dominio aumentan exponencialmente, llegando a un tamaño crítico en el cual la formación de una pared es demasiado alta y la partícula se ordena formando un único dominio magnético. El momento en el cual la partícula pasa a formar un solo dominio magnético, presenta un momento magnético muy grande, llamado comúnmente “supermomento” [14]. Al exponer a las NPMs a un campo magnético externo, el momento magnético total vendrá a ser la suma de los supermomentos de cada nanopartícula, dando como resultado un momento magnético gigante. De la misma forma, al anular la fuerza magnética externa, cada monodominio se mueve libremente, ya que no debe compensar la energía de un dominio vecino, y por ende la suma total del momento vendría a ser cero [15]. Debido a esta característica, recibe el seudónimo de “superparamagnetismo”, el cual utiliza el prefijo super para referirse al supermomento magnético que sufre y paramagnetismo al referirse a la característica de no mantenerse magnetizado al no encontrarse en contacto con un campo magnético externo [16].

Es importante recalcar que las NPMs sin recubrimiento tienen una tendencia sumamente alta a conglomerarse para reducir la energía asociada a su alta relación superficie/volumen, además de ser químicamente activas y oxidarse con suma facilidad, perdiendo su carácter magnético. Por esta razón, es importante desarrollar síntesis en las cuales se proteja a las nanopartículas magnéticas de los diferentes factores que afectan tanto su tamaño, como su utilidad y eviten su temprana degradación.

1.2.1. NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Las nanopartículas magnéticas más utilizadas y estudiadas actualmente son aquellas que contienen un núcleo de óxido ferroso-férrico o también llamadas magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$). Debido a su sencillo proceso de síntesis, sus propiedades magnéticas, la estabilidad en ambientes con alta presencia de oxígeno, la capacidad de biofuncionalización con un sin número de polímeros orgánicos y la alta degradación dentro del cuerpo humano, se han convertido en una de las mejores opciones como nanotransportador de medicamentos más importante [19].

Dentro del cuerpo humano, las nanopartículas funcionalizadas acarrean un medicamento específico que se encuentra adherido a la capa externa del polímero encapsulante, hacia un lugar exacto dentro del organismo, debido a la interacción con un campo magnético externo. Esta capacidad de transporte confiere a la nanopartículas funcionalizadas el nombre de “nanotransportadores”.

Por otro lado, las nanopartículas de magnetita tienen la capacidad de vibrar cuando se encuentran en presencia de un campo magnético externo alto, lo que permite que puedan ser guiadas directamente hacia un tumor localizado y destruir del tumor por hipertermia, en otras palabras, desintegrar las células cancerígenas debido al calor producido por las vibraciones de las nanopartículas [20].

Químicamente, las nanopartículas de magnetita están formadas por iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en una relación molar 1:2, que en presencia de un reductor alcalino [21], atmósfera inerte y temperatura determinada, dan como resultado un precipitado de color negro, como se puede observar en la Figura 1.5, que corresponde a estructuras nanométricas de hierro.



Figura 1.5. Nanopartículas de magnetita [22]

Las nanopartículas funcionalizadas con polímeros, forman un grupo de excelencia de las nanopartículas para las aplicaciones biomédicas, debido a que la mayoría de los polímeros utilizados son biocompatibles con el cuerpo humano y comparten esta característica al nanomaterial que se encuentran recubriendo. Además, al encerrar completamente a las nanopartículas, impiden que éstas reaccionen con el medio en el que se encuentran y permiten su movilización en ambientes con alta concentración de oxígeno, como es el medio biológico dentro del cuerpo humano.

Existen dos momentos en los cuales se puede realizar la funcionalización de las nanopartículas de magnetita, la primera opción es realizar el encapsulamiento durante la síntesis, conocida también como la técnica *in situ*, en donde se coloca el polímero funcionalizador con las soluciones de los iones al inicio del proceso, permitiendo que el polímero recubra a las nanopartículas en el momento de su obtención y evitando la formación de cúmulos o el aumento del tamaño de las mismas, siendo una gran ventaja en la síntesis por coprecipitación química, que tiene la característica de presentar como productos una heterogeneidad de tamaños de las nanoestructuras obtenidas [23].

La segunda opción de funcionalización es colocando el polímero después de haber sido realizada la síntesis, lavado las nanopartículas y dispersado, obteniendo la ventaja de evitar el encapsulamiento de las nanopartículas de magnetita con posibles contaminantes como iones de cloro o sodio. Una de las fallas más grandes de esta forma de recubrimiento es que si el nanomaterial no se encuentra lo suficientemente cargado en su capa externa después de los lavados, el polímero no se podrá adherir y se requieren pruebas con diferentes números de lavados hasta obtener una funcionalización exitosa [24].

El polímero encapsulante debe tener en su estructura grupos activos que le permitan adherirse a las cargas externas de las nanopartículas, rodearlas completamente y colocarse espacialmente de tal manera, que el resto de sus grupos activos se ubiquen en la capa exterior y puedan ser utilizados para adherir otro compuesto de interés, como medicamentos o proteínas específicas. Cuando se obtienen nanopartículas funcionalizadas correctamente, pueden ser utilizadas como transportadores (*carriers*) de sustancias que necesita el ser humano o de medicamentos destructivos que deben ser dirigidos a una ubicación específica del cuerpo para no dañar a las estructuras adyacentes [25]. En la Figura 1.7 se pueden observar nanopartículas magnéticas funcionalizadas recubiertas con un sin número de compuestos y medicamentos necesarios para ciertos organismos.

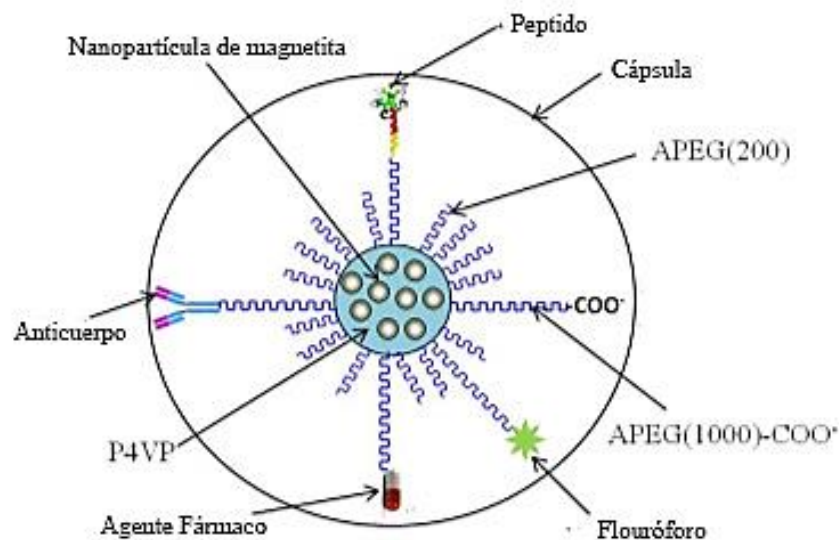


Figura 1.7. Nanopartícula funcionalizada con poli-4-vinilpiridina, polioxietilen-alil-éter y diferentes fármacos [26]

Por otro lado, para que un polímero pueda ser considerado un funcionalizador exitoso, debe presentar la característica de encapsular fácilmente a las nanopartículas sin disminuir en gran medida su sensibilidad magnética y su capacidad de movilidad [23].

En resumen, un polímero utilizado para recubrir las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ debe ser una capa protectora que presente grupos activos, sea biocompatible con el ambiente biológico dentro de los cuerpos de los seres vivos, y no interfiera en gran manera en las características físicas que presentan los nanomateriales.

1.3. QUITOSANO

La quitina es el segundo polímero de mayor abundancia en el planeta después de la celulosa, y muchas veces se la considera como un polisacárido derivado de la misma, debido a sus características, más no a sus similitudes moleculares. Posee una estructura lineal de alto peso molecular constituida por subunidades de *N*-acetil-*D*-glucosamina unidas por un enlace β -D (1,4), como se muestra en la Figura 1.8 [27].

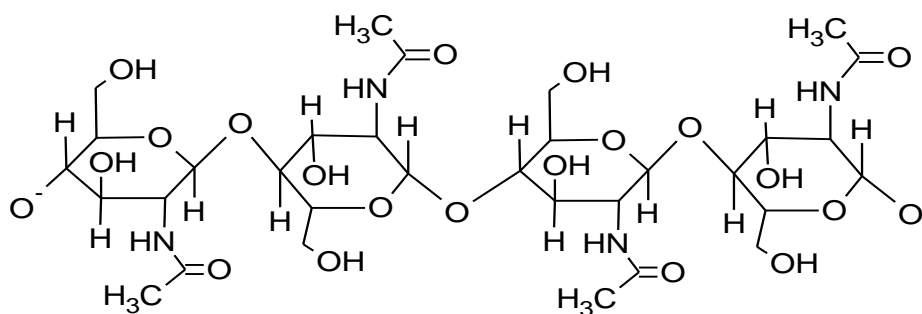


Figura 1.8. Fórmula de la quitina [27]]

La quitina es el principal componente del exoesqueleto de los crustáceos, insectos y algunos hongos, además que se encuentra íntimamente asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos [23]. En la Tabla 1.1 se presentan los valores de quitina presentes en los exoesqueletos de los diferentes organismos.

Tabla 1.1. Porcentaje de quitina en estructuras de organismos vivos [23]

<i>Familia</i>	<i>Nombre</i>	<i>% Quitina</i>	<i>Familia</i>	<i>Nombre</i>	<i>% Quitina</i>
Crustáceos	Cangrejo Cáncer	72.1	Insectos	Mariposa Pieris	64.0
	Camarón <i>Crangon</i> y <i>Pandalus</i>	17.0-40.0		Gusano de seda	44.2
	Camarón de Alaska	28.0	Moluscos	Almeja	6.1
Langosta <i>Neptho</i>	69.8	Ostras		3.6	
Cucaracha <i>Blatella</i>	18.4	Krill		40.2	
Insectos	Mariquita <i>Colcoptera</i>	27.0-35.0	Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	42.0

El quitosano que en adelante se abreviara como *Ch* es una β -1,4-*D*-glucosamina. El quitosano es un producto de la desacetilación parcial de la quitina, por lo cual presenta un mayor número de grupos activos que su materia prima, lo que le permite adherir diferentes compuestos a su estructura y retenerlos con éxito, además que al ser un material de origen

natural presenta una biocompatibilidad sumamente alta y una biodegradación excelente [28].

El quitosano no se encuentra originalmente en la naturaleza, por lo que se debe considerar como un producto sintético, que presenta una desacetilación de sus grupos activos entre el 66 y el 95%, como se puede observar en la Figura 1.9 [25]. Es soluble en medio acuoso ácido debido a la protonación del grupo amino, por lo cual la solubilidad de este polímero dependerá del grado de desacetilización, si el compuesto presenta más del 50% de los grupos acetilados se considera quitina y es insoluble en todos los medios.

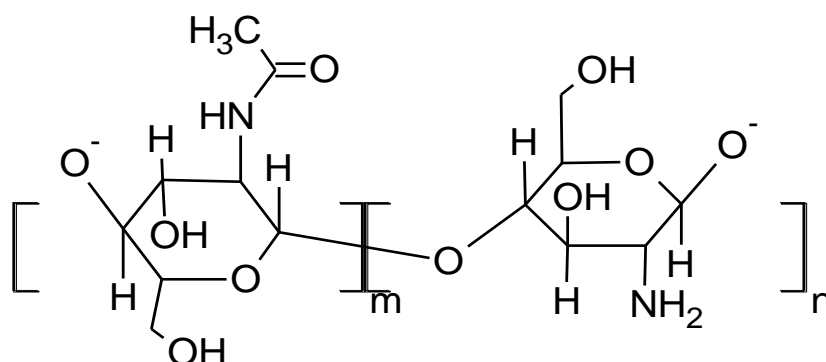


Figura 1.9. Molécula de quitosano, (m) grupo quitina, (n) grupo quitosano [29]

La estructura adecuada del quitosano para que pueda ser utilizado como funcionalizador de nanopartículas, es aquel que presente un grado de desacetilización mayor al 75%, debido a que los grupos amino son atraídos hacia la capa aniónica que recubre a las nanoestructuras de óxido de hierro, los hidrógenos del grupo amino del quitosano se reacomodan de tal manera que permiten la formación de puentes de hidrógeno con los oxígenos de la

magnetita [29]. En la Figura 1.10 se puede observar la formación de los puentes de hidrógeno que permiten a las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ser recubiertas por el quitosano.

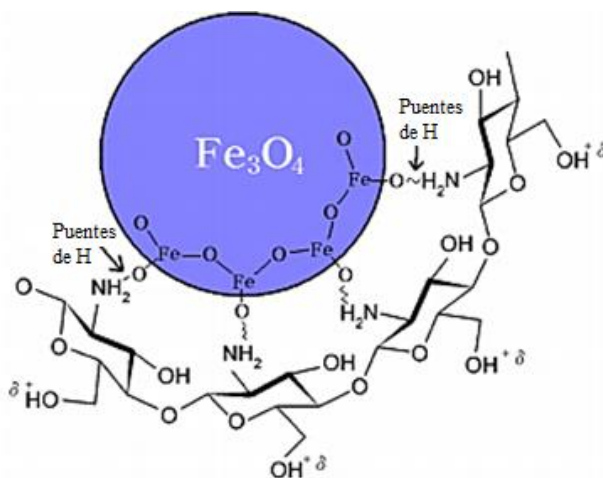


Figura 1.10. Nanopartícula de magnetita recubierta con quitosano [30]

La síntesis de nanopartículas recubiertas con quitosano se realizan *in situ*, debido a que permite controlar el tamaño de las nanoestructuras obtenidas, además al inicio de la síntesis por coprecipitación química de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, el pH es ligeramente ácido, lo que permite solubilizar el quitosano con facilidad [28]. En el momento en el cual se coloca el reductor, una ligera cantidad de quitosano precipita por el cambio de pH, pero la gran mayor parte del polímero colocado es capturado por las nanopartículas en formación.

Dentro del cuerpo humano, el quitosano no puede ser digerido, pero tampoco es tóxico, por lo cual atraviesa el cuerpo y es excretado sin alteraciones [29]. Al recubrir las nanopartículas, se espera que el quitosano proteja las nanopartículas y evite que éstas se incorporen a los tejidos.

1.4. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es conocida comúnmente como mosca de la fruta o del vinagre y es el modelo de estudio biológico por excelencia, debido a la información acumulada desde principios del siglo pasado. Es un insecto que pertenece al grupo de los dípteros, se caracteriza por presentar ojos rojos, cuerpo de color mostaza o amarillo y franjas de color negro que atraviesan el abdomen [31].

Presentan dimorfismo sexual, las hembras son mucho más grandes que los machos, mientras que los machos presentan el segmento final del abdomen melanizado, lo que permite identificar fácilmente a cada sexo, y peines sexuales en las patas delanteras para poder sostener a la hembra durante el apareamiento, como se muestra en la Figura 1.11 [31].



Figura 1.11. Moscas *Drosophila melanogaster*: a) Macho, b) Hembra [32]

Las moscas *Drosophila melanogaster* se usan como modelo de estudio, debido a que a nivel de laboratorio su mantenimiento es muy sencillo, presentan un tamaño tan pequeño que no se necesita espacio para su crianza y uso investigativo. Por otro lado, tiene un periodo de vida corto, alrededor de 21 a 30 días, y reproducción de 100 huevos por día aproximadamente, lo que permite observar variabilidad entre individuos y generaciones en muy poco tiempo [31].

Presentan solamente cuatro cromosomas, de los cuales tres son autosomas y uno es sexual. El genoma fue secuenciado completamente en 1998, lo que permite a los investigadores encontrar las razones específicas de cada alteración. Un 50% de las proteínas presentes en las moscas tienen análogos en los mamíferos y, hasta el momento, se ha descubierto que aproximadamente un 61% de las enfermedades genéticas humanas presentan una alteración con un parecido en el genoma de la mosca de fruta [33].

Presentan tres estadios larvarios que comprenden un tiempo de 3 días, en donde el apetito de la larva es feroz debido al crecimiento acelerado de sus órganos. El estado larvario termina con la formación de una pupa de color blanquecino, durante este tiempo la larva sufre una rápida metamorfosis de 4 a 5 días. Exteriormente la pupa cambia de color a amarilla y después ligeramente café. Aproximadamente a la mitad del quinto día de su concepción, el individuo inicia con la formación de la cabeza, alas y patas que tendrá en su estado adulto. Al noveno día, emerge un adulto o imago con las alas plegadas y con un cuerpo alargado, delgado y poco pigmentado [31]. Una hora después de la eclosión, los adultos son capaces de extender las alas y luego de 2 a 3 horas los machos, son maduros sexualmente. En el caso de las hembras, la madurez sexual se presenta a las 6 horas

después de la eclosión [33]. En la Figura 1.12 se presenta el ciclo de vida de las moscas *Drosophila melanogaster*.

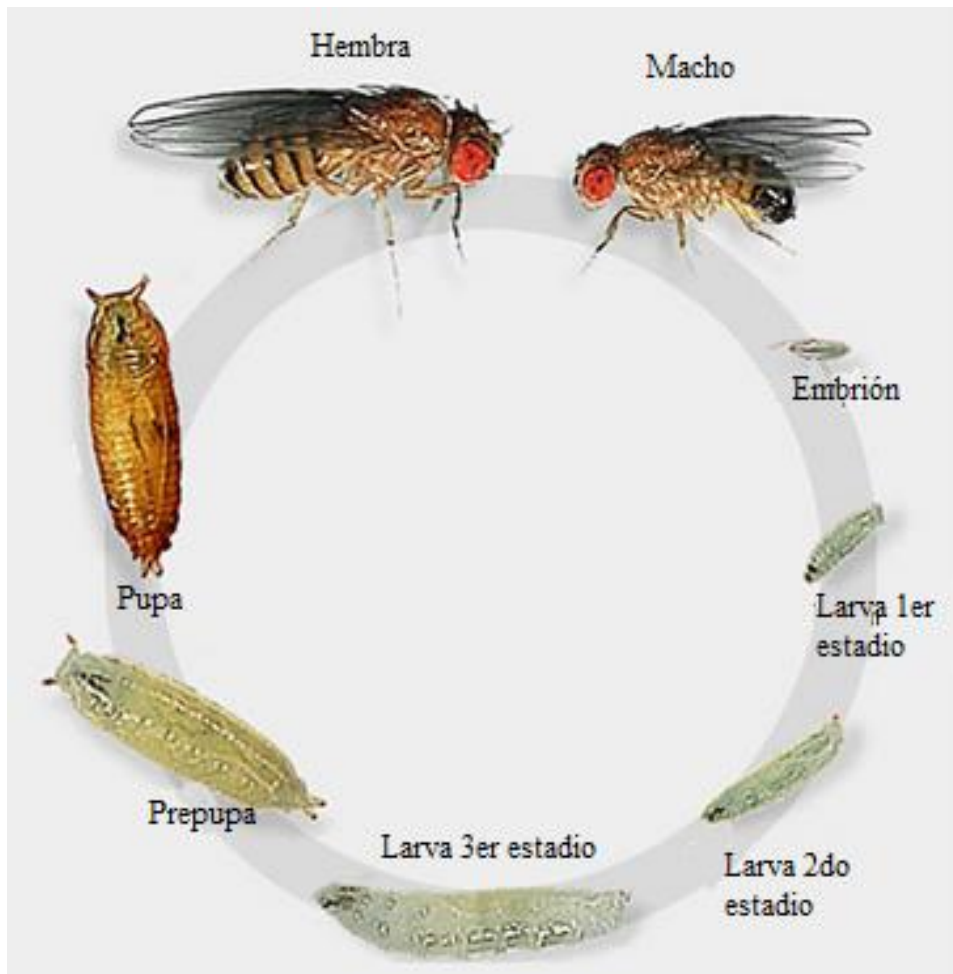


Figura 1.12. Ciclo de vida de mosca *Drosophila melanogaster* [34]

En la Tabla 1.2 se presenta de manera resumida el ciclo de vida de las moscas de fruta desde el momento de su concepción hasta llegar al individuo adulto.

Tabla 1.2. Ciclo de vida de la mosca *Drosophila melanogaster* [31]

<i>Día</i>	<i>Hora</i>	<i>Estadio y/o suceso de desarrollo</i>	<i>Día</i>	<i>Hora</i>	<i>Estadio y/o suceso de desarrollo</i>
0	0	Huevo	5	122	Pupa pigmentada
1	22	Primer estadio larvario	5,5	130	Formación de cabeza, alas y patas
2	47	Segundo estadio larvario	7	167	Pigmentación de ojos
3	70	Tercer estadio larvario	9	214	Emergencia del adulto con alas plegadas
5	118	Formación de pupa blanca	9	215	Adulto con alas desplegadas
5	119	Pupa amarilla			

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de trabajo experimental consistió en las siguientes etapas:

- Síntesis de quitosano
- Síntesis de nanopartículas de magnetita y funcionalización
- Caracterización de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano por Microscopia de Barrido, Microscopia de Transmisión electrónica y Espectroscopía de Infrarrojos.
- Manipulación y cuidado de moscas *Drosophila melanogaster*
- Análisis por Espectrofotometría de Absorción Atómica

2.1. SÍNTESIS DE QUITOSANO

Las cáscaras de camarón utilizadas para la extracción del quitosano fueron recolectadas en el Mercado Municipal de Atacames. Se recolectaron 4 kg de exoesqueletos húmedos, los que fueron refrigerados durante dos días, lavados con abundante agua y secados en una estufa marca Memmert durante 3 días en a una temperatura de 80°C. Una vez secas, fueron trituradas en un molino de marca Victoria, hasta obtener un polvo de cascaras de camarón. Se pesaron 484.84 g de cáscaras de camarón, secas y trituradas. La muestra se trató la muestra con 250 mL de xileno y agitación magnética en una placa de calentamiento marca VELP Scientifica durante 24 horas, para eliminar los pigmentos presentes, se secó a 50°C en la estufa durante 24 horas.

Al producto obtenido, se añadieron 250 mL hidróxido de sodio 6 N a 65°C, con agitación constante durante 24 horas y se filtró hasta eliminar, por lavado con agua desionizada, toda la sosa colocada. El filtrado se descalcificó con 250 mL de HCl 6 N durante 24 horas con agitación constante. Se lavó, filtró y neutralizó.

Finalmente, se trató al precipitado obtenido con 250 mL de NaOH al 70% durante 24 horas a 65°C y agitación constante. Se filtró, neutralizó y secó, obteniendo como resultado quitosano [35]. Este compuesto fue analizado a través de la comparación del espectro IR del quitosano obtenido con su estándar.

2.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas de magnetita. Las síntesis por coprecipitación química y descomposición térmica han sido las técnicas más acogidas por los proyectos de investigación debido al bajo costo, la facilidad del procesos y la obtención de los productos deseados con las características específicas necesarias para su uso in vitro.

La síntesis por coprecipitación química consiste en la obtención de Fe₃O₄NPs a través de un proceso de formación de cristales mixtos, en el caso de la magnetita conformados por iones de hierro 2+ y 3+, que precipitan gracias a la acción de un reductor [36]. La tarea del reductor es liberar a los iones respectivos, capturar a los iones contaminantes y permitir la formación de una estructura cristalina mixta. Este proceso debe ser estrictamente controlado, pues los cambios en la temperatura, el tiempo en que se va añadiendo el

reductor, la agitación y el tipo de atmósfera al que se encuentra expuesto el producto final, afectan enormemente el tamaño de las nanopartículas obtenidas [37].

2.3. SINTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO

Se realizó un proceso de coprecipitación. En un balón de base plana de 250 mL, se colocó 50 mL de una mezcla de 0,30 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con 0,14 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a $60\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 10 minutos [38]. Se adicionaron 50 mL de NaOH 2,5 M, a una velocidad de 1 gota cada 2 segundos, obteniendo una solución de tonalidad oscura. El medio de reacción fue sometido a atmósfera inerte de helio durante 30 minutos, utilizando el equipo que se muestra en la Figura 2.1.



Figura 2.1. Medio de reacción sometido a atmósfera inerte de helio

Para finalizar se separó el producto con la ayuda de un imán de neodimio, hierro y boro (NdFeB) Supermagnete® (Figura 2.2), lavando las nanopartículas con dos porciones de 10 mL de agua desionizada y dos porciones de 10 mL de acetona. Las Fe₃O₄NPs lavadas se llevaron a baño de ultrasonido marca Branson 3510 durante 10 minutos. Para la activación, se lavó las nanopartículas de magnetita con tres porciones de 10 mL de etanol absoluto cada una por 10 minutos en ultrasonido, con una frecuencia de 40 kHz.

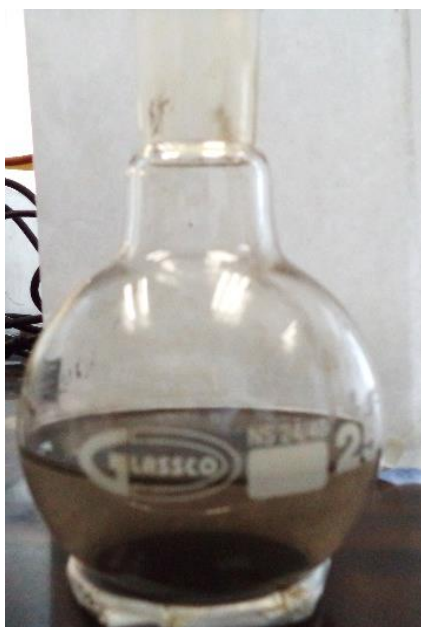


Figura 2.2. Nanopartículas de magnetita activadas en etanol, separadas con un imán de neodimio, hierro y boro Supermagnete®

El producto obtenido fue secado con la ayuda de un secador de cabello marca Revlon hasta eliminar todo el etanol y se guardaron las nanopartículas en estado sólido para facilitar las suspensiones acuosas.

2.4. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO

La funcionalización de las nanopartículas de magnetita con quitosano se realizó colocando 50 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,32 M con 50 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M y 50 mL de una solución de quitosano al 0.25 % en un balón de base plana de 250 mL [39]. Con agitación constante, se calentó la solución a 50°C durante 10 minutos y se adicionaron 20 mL de NH_4OH al 20%, con una dosificación de una gota cada 2 segundos.

Inmediatamente después de colocado el reductor se cambia la atmósfera de reacción de oxidativa a inerte con helio durante 20 minutos.

El producto obtenido, se separó con la ayuda de un imán de NdFeB Supermagnete® (Figura 2.3). Las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ recubiertas se lavaron con dos porciones de 10 mL de agua desionizada, cada lavado expuesto a 10 minutos de ultrasonido. Para su activación se las lavó con tres porciones de 10 mL de etanol absoluto por 10 minutos en ultrasonido.

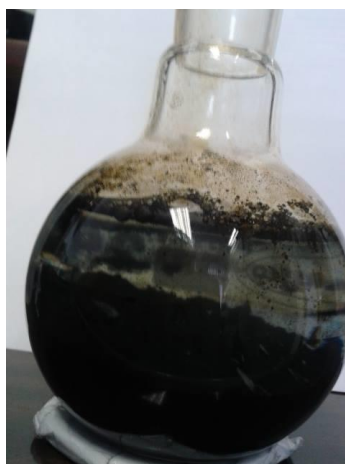


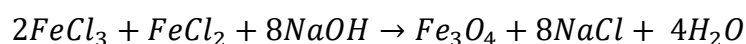
Figura 2.3. Nanopartículas de magnetita recubiertas de quitosano sin lavar

Las Fe₃O₄NPs-Ch recubiertas fueron secadas con secadora de cabello hasta eliminar todo el etanol presente y se guardaron en estado sólido para facilitar su uso.

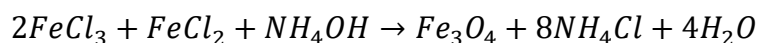
2.5. RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

El rendimiento de la reacción de síntesis se realizó por quintuplicado. Por gravimetría, se pesó en una balanza analítica marca Mettler Toledo antes y después del proceso. Y por reacción estequiométrica entre los reactivos y producto, se calculó el rendimiento de la reacción, siguiendo las reacciones que se detallan a continuación.

Usando NaOH:



Usando NH₄OH:



2.6. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Para la caracterización de las Fe₃O₄NPs se debe considerar las características que se desea controlar, es decir, a la composición elemental y el tamaño aproximado. El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en ingles), se emplea para obtener un tamaño

aproximado de las nanoestructuras y gracias al detector de rayos X permite analizar la composición elemental, mientras que para la granulometría específica se debe utilizar la información proporcionada por un Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM, por sus siglas en inglés) para observar estructuras de tamaño nanométrico promedio. Por otro lado, la funcionalización con quitosano se puede controlar a través del análisis de Espectrofotometría de Infrarrojos (FT-IR, por sus siglas en inglés), verificando las modificaciones de los compuestos orgánicos empleados

2.6.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Un microscopio electrónico estándar consta de una fuente de emisión de electrones y un tubo que contiene normalmente tres lentes que básicamente son bobinas electromagnéticas conocidas como el condensador, el objetivo y la lente proyectora [40]. Acoplado a este tubo se presenta un sistema que genera alto vacío permitiendo que no existan interferencias en el haz de electrones generado. La fuente emisora de electrones generalmente es un filamento de tungsteno al que se le aplica un alto voltaje (40 a 100 kV) para generar una fuente de electrones altamente acelerados, los cuales son atraídos por el ánodo [41]. La microscopia electrónica es una técnica que permite observar estructuras a nivel de átomos, debido a la interacción del haz de electrones con la superficie de la muestra. Cuando el haz de electrones entra en contacto con la superficie de una muestra, se produce una serie de interacciones que son responsables de las imágenes observadas y originan distintas reacciones secundarias que pueden ser utilizadas para obtener datos complementarios [40].

2.6.1.1. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido, más conocido por sus siglas en inglés SEM (Scanning Electron Microscopy) permite obtener imágenes a través de la focalización de un fino haz de electrones que barre la superficie de la muestra en una serie de líneas y redes construyendo una imagen tridimensional [42].

El SEM forma las imágenes a partir de los electrones secundarios, los cuales son atraídos hacia el portamuestras mediante un potencial positivo de 50 V. Al atravesar el portamuestras se genera una luz, que con la ayuda de fotomultiplicadores, se convierte en una señal de voltaje y esta a su vez en una imagen. Es importante recalcar que el SEM interacciona con las superficies de las muestras, por esta razón no es importante el grosor de la misma como es el caso del microscopio de transmisión electrónica. Sin embargo, no se pueden analizar muestras líquidas. Por otro lado, la muestra debe ser conductora, caso contrario se debe considerar un recubrimiento de un material conductor como oro o cromo para que se pueda observar [43].

Normalmente, los SEM presentan acoplados dos tipos de detectores, el uno ocupa los electrones secundarios para crear una imagen de la muestra, el segundo es un detector de rayos X y permite obtener un análisis semicuantitativo de la presencia elemental en la muestra [42].

- ANÁLISIS ELEMENTAL DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA Y RECUBIERTAS CON QUITOSANO

Para el análisis elemental se prepararon suspensiones de 500 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ con y sin recubiertas de quitosano en etanol absoluto calidad analítica. Se tomó una pequeña muestra de cada solución con una pipeta Pasteur y se colocó una fina capa en forma de zigzag en una caja Petri, como se muestra en la Figura 2.4.

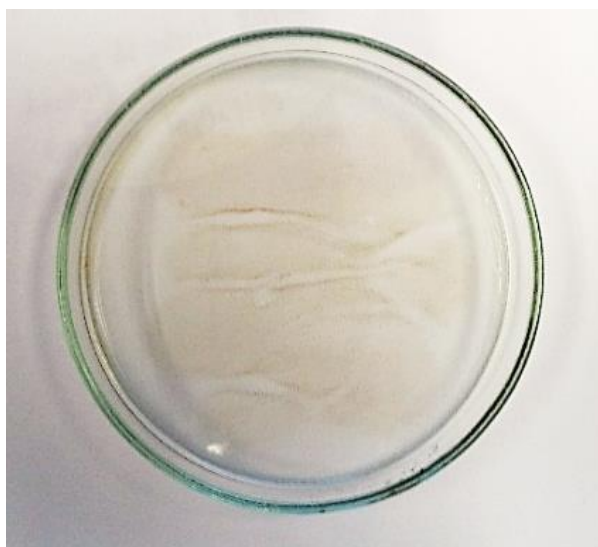


Figura 2.4. Muestras de nanopartículas de magnetita en caja Petri

El etanol se evaporó a temperatura ambiente y se tomó una muestra de cada tipo de nanopartícula de magnetita en la cinta de carbono, lugar donde se coloca la muestra en el SEM. Cada muestra se sometió a un análisis elemental y granulométrico con el Microscopio de Barrido de marca TESCAN, modelo VEGA/LMU con velocidad de aceleración 15 kV del Departamento de Metalurgia Extractiva (DEMEX) de la Escuela Politécnica Nacional, que se puede observar en la Figura 2.5.



Figura 2.5. Microscopio de Barrido marca TESCAN

2.6.1.2. MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA

El microscopio de transmisión electrónica o por sus siglas en inglés TEM (Transmission Electronic Microscopy) basa su funcionamiento en la difracción de los electrones del haz que incide en la muestra, se obtiene un difractograma que puede ser transformado a imágenes gracias a la intervención de lentes magnéticas. Para obtener imágenes satisfactorias, las muestras deben presentar un ancho no mayor a 50 nm, debido a que en espesores mayores no se permite la difracción de los electrones y se obtienen rayos X [44]. Todo el sistema trabaja a alto vacío para evitar el choque del haz de electrones con átomos de gas [45].

- ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO POR TEM DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO

Para el análisis granulométrico de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sin recubrimiento se utilizó un TEM (Microscopio de Transmisión electrónica) marca FEI Tecnai G2 Spirit Twin, ubicado en el Laboratorio de Microscopia de la Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE) como se observa en la Figura 2.6. Se prepararon 50 mL de una suspensión de 500 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ en etanol, se tomó una alícuota de la mitad de la suspensión en una rejilla de cobre y se realizó el análisis.



Figura 2.6. Microscopio FEI Tecnai G2 Spirit Twin

2.6.2. ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJOS

La espectrofotometría de infrarrojos permite identificar un componente orgánico presente en una muestra, analizando la frecuencia de las vibraciones moleculares que son las responsables del proceso de absorción propiamente dicho [46].

La radiación en el infrarrojo no presenta la energía necesaria para producir las transiciones que pueden observar el ultravioleta o con rayos X, por esta razón, la absorción en el infrarrojo se limita a las especies moleculares en las cuales se puede obtener una pequeña diferencia de energía al producirse una rotación o vibración. Para que se pueda registrar una molécula en el espectro IR, ésta debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento rotacional o vibracional [46]. Para identificar el movimiento de una molécula se debe considerar el desplazamiento de toda la molécula en el espacio, la rotación de la molécula alrededor de su centro de gravedad y de cada uno de los átomos, con respecto a la posición de los otros átomos. En la Figura 2.12 se puede observar las distintas vibraciones que puede presentar los átomos de una muestra, en donde vibraciones de tensión se refieren a las vibraciones correspondientes a los estiramientos de los enlaces en forma de elásticos, mientras que las vibraciones por flexión son aquellas en las que los enlaces se mueven en los diferentes planos.

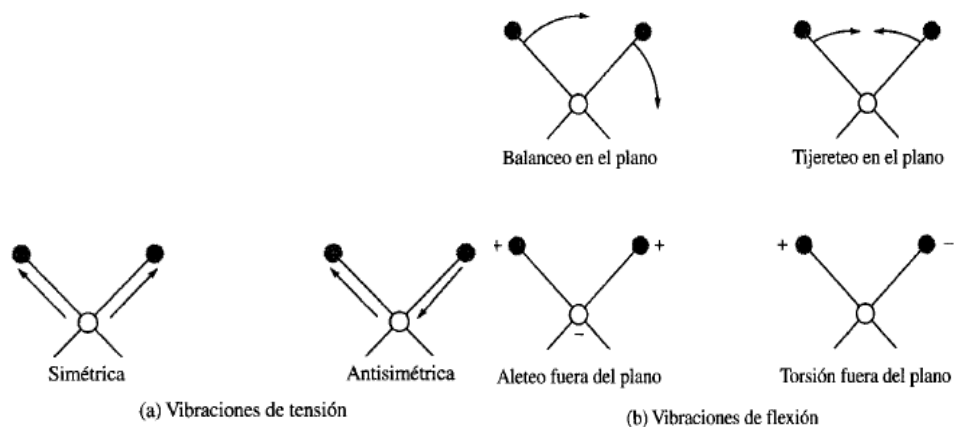


Figura 2.7. Vibraciones de tensión y flexión al incidir radiación en el infrarrojo [46]

Debido a que los movimiento de cada enlace representan a un grupo funcional y el conjunto de las vibraciones de los grupos funcionales son propias de cada compuesto, el espectro IR permite obtener la identidad de una muestra y la pureza de los materiales analizados.

El espectro IR es la imagen obtenida de un espectrofotómetro IR, en donde se miden las vibraciones moleculares en base a la radiación absorbida y se muestra una gráfica en donde la abscisa corresponde a la longitud de onda que llega al detector y se presenta en unidades de cm^{-1} y la ordenada se puede presentar tanto en porcentaje de transmitancia como en porcentaje de absorbancia [47].

▪ ANÁLISIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO

Para asegurar la funcionalización de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se obtuvieron espectros IR del quitosano extraído de las cascarras de camarón, de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sin recubrimiento y finalmente se analizaron las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$. Para las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ con y sin recubrimiento se tomó una pequeña porción de ferrofluido, se secó durante 10 minutos con secadora marca Revlon y el polvo se colocó en la celda del espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum BX FT IR (Figura 2.8), colocando como condiciones:

- Número de Scans: 10
- Longitud de onda: 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}
- Unidad: % transmitancia
- Intervalos: 2 cm^{-1}
- Resolución: 4 cm^{-1}
- Celda de acople: ATR



Figura 2.8. Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformadas de Fourier Perkin Elmer Spectrum BX FT IR

2.7. MANIPULACIÓN Y CUIDADO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster*

La manipulación y el cuidado de las moscas *Drosophila melanogaster* se lo llevo a cabo en el laboratorio de Genética Evolutiva de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se colaboró en las etapas de elaboración del medio de cultivo, cuidado y conteo de moscas para su posterior análisis por Absorción Atómica.

2.7.1. MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo se refiere al lugar en el cual se encuentra el alimento de las moscas utilizadas. En el caso de las moscas *Drosophila melanogaster* los medios de cultivo deben tener en su composición fruta debido a que es su alimento natural. Un medio de cultivo adecuado debe contener cantidad suficiente de azúcares, que permitan la proliferación de levaduras, las cuales son el principal alimento para las larvas, ya que aportan enormes cantidades de proteínas. Además, el medio debe contener agua e inhibir el crecimiento bacteriano, evitando de esta manera que las moscas estén expuestas a posibles alteraciones. Es importante recalcar que los medios de cultivo deben ser lo suficientemente duros en su superficie para que las moscas adultas no se hundan [48], además deben ser suaves para que las larvas puedan alimentarse, y debe presentar zona seca donde puedan asentarse como pupas sin el riesgo de ahogarse tal como se muestra en la Figura 2.9.



Figura 2.9. Medios de cultivo de moscas *Drosophila melanogaster* [50]

Existen diferentes formas de realizar medios de cultivos para moscas de frutas, utilizando como base plátano, maicena, naranja o cualquier fruta capaz de madurar y formar vinagre. Los medios llamados GBL están conformados por gelatina, banano y limón, siendo considerados los mejores medios para el cultivo de cepas sanas. Dependiendo del método, las proporciones del medio GBL cambian o se pueden adicionar diferentes componentes para mejorar las características de este medio.

2.7.1.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se preparó el medio de cultivo para aproximadamente 80 tubos de ensayo cada vez. Se pesó y cortó 1,00 kg de plátano maduro, 4,80 g de levadura, 74,0 g de gelatina y 4,00 g de nipagina. Se tomaron 20,0 mL de zumo de limón y se colocaron en 956 mL de agua. Se adicionó 10,0 mL de agua tibia con levadura su activación. El plátano se licuó con 478 mL de agua hasta obtener un puré, que se llevó a ebullición por un minuto aproximadamente.

Se adicionó la nipagina y gelatina para endurecer el medio de cultivo. Finalmente, se enfrió a temperatura ambiente por 3 minutos y se colocó la levadura y el zumo de limón, mezclando uniformemente. Con una bomba peristáltica dosificadora marca MILLIPORE (Figura 2.10) se colocaron aproximadamente 5,00 cm de medio de cultivo en cada tubo de ensayo.



Figura 2.10. Bomba peristáltica dosificadora

2.7.1.2. MEDIO DE CULTIVO CON NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBIERTA DE QUITOSANO

Para el medio de cultivo con $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se sigue el mismo procedimiento descrito en el punto 2.7.1.1, adicionando las suspensiones de nanopartículas antes de la dosificación. Las suspensiones de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ utilizadas fueron de 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L y 1000 mg/L de nanopartículas por cada litro de medio de cultivo.

Para los medios con nanopartículas recubiertas con quitosano se realizó el mismo procedimiento en las concentraciones señaladas. En la Figura 2.11 se presenta los medios de cultivo con las nanopartículas con y sin recubrimiento de quitosano.

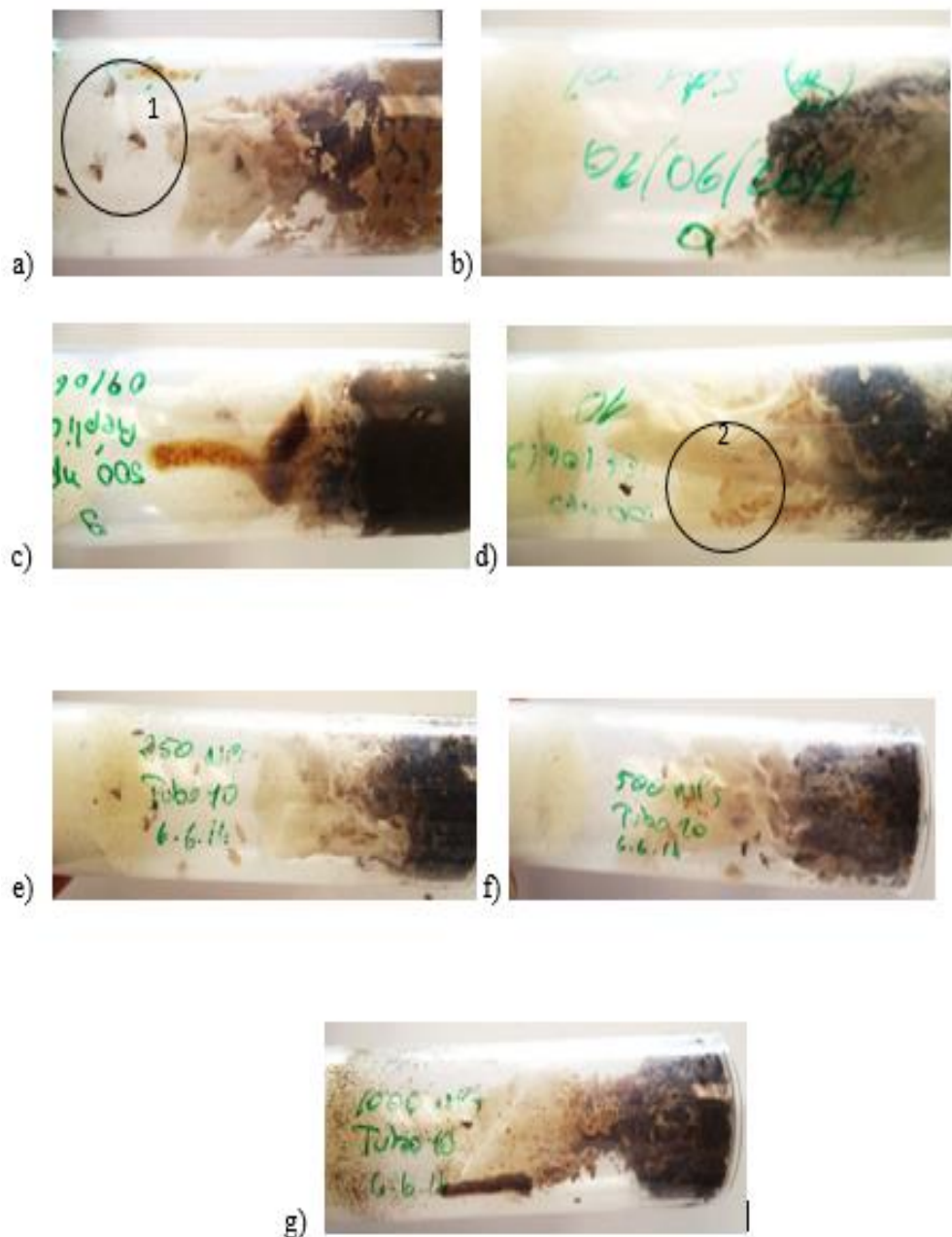


Figura 2.11. Medios de cultivo nanopartículas de magnetita: a) Blanco con moscas *Drosophila melanogaster* (1), b) 100 mg/L, c) 500 mg/L. Medios con nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano d) 100 mg/L, con pupas de moscas (2), e) 250 mg/L, f) 500 mg/L, g) 1000 mg/L.

2.7.1.3. CRUZAMIENTO DE LAS MOSCAS

El ciclo de vida de *Drosophila* dura aproximadamente 10 días a una temperatura de 25°C en el laboratorio, con una humedad relativa del 60%, pero este tiempo puede variar dependiendo de las condiciones a la cuales están expuestas las moscas [31]. Las moscas adultas tienen la capacidad de aparearse en pocas horas después de la pupa, estado de transformación de gusano a mosca, por esta razón es de suma importancia separar hembras y machos al momento en el que emergen, ya que para estudios bioacumulativos y genotóxicos, es necesario iniciar con hembras vírgenes y asegurar que los individuos han sido procreados y nacidos en las condiciones de estudio. Inmediatamente después del apareamiento, la hembra comienza a poner huevos fecundados y pasado un día de desarrollo embrionario, eclosiona una pequeña larva [32].

Para los ensayos, se separaron las hembras vírgenes de los machos, al momento de la eclosión de las pupas utilizando un microscopio óptico. Se realizaron 10 repeticiones por concentración (0 mg/L de Fe₃O₄NPs, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L y 1000 mg/L), colocando en cada una 5 hembras vírgenes con 5 machos. Se dejaron los tubos en una incubadora. Para cada una de las concentraciones de nanopartículas de magnetita en los medios de cultivo, se realizó el conteo de la primera descendencia de las moscas expuestas (F1). Para esto, se aisló a los parentales de los medios de cultivo 6 días después de haberlos colocados y se inició el conteo el día 14, momento en el cual, las moscas fueron emergiendo de los capullos.

El mismo procedimiento se realizó para las nanopartículas recubiertas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$.

2.8. ESPECTROFOTOMETRÍA POR ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA

La espectrofotometría de Absorción Atómica (AA) a la Llama tiene como fundamento la absorción de la radiación de una longitud de onda determinada para cada elemento. La radiación incidente es absorbida selectivamente por átomos que presenten niveles energéticos cuya diferencia de energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, se encuentra determinado por la ley de Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda que contiene al analito analizado, de tal manera que permite calcular la concentración de la especie sabiendo la absorbancia de la muestra al ser atomizado en la llama [46].

Uno de los componentes más importante es el atomizador, ya que es el único que limita la precisión del equipo, aquí las soluciones que contengan el analito buscado van a ser transformadas en un conjunto de minúsculas gotas de solución, las cuales deben ser lo suficientemente pequeñas para que al entrar en contacto con la llama del mechero puedan absorber los fotones incidentes. Por otro lado, la llama debe presentar la suficiente temperatura de combustión para lograr que la muestra sea refractaria. Si se utiliza al acetileno como combustible y al oxígeno como oxidante se alcanzan temperaturas entre 2600 y 2800°C lo que permite realizar la cuantificación exitosa del hierro [46].

2.8.1. DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA EN MOSCAS *Drosophila melanogaster*

No existe un método validado para análisis de metales en insectos, por lo que para la cuantificación de hierro en las moscas expuestas a nanopartículas de magnetita, se siguió el método del AOAC 999.11 para la determinación de plomo, cadmio, cobre y hierro [49] en alimentos por Espectrofotometría de acondicionado para Absorción Atómica modelo AAAnalyst 400, como se observa en el Anexo 2.

Se analizó el hierro presente en los reactivos del medio de cultivo, el medio de cultivo con y sin nanopartículas, las moscas usadas como control y las expuestas a Fe₃O₄NPs y a Fe₃O₄NPs-Ch. Se varió la cantidad de muestra analizada a un rango de 0.3 a 0.45 g de moscas por análisis, debido a la limitación en la cantidad de muestra.

2.8.1.1. BLANCOS

Se consideran como blancos a cada uno de los componentes que forman parte del medio de cultivo de las moscas *Drosophila melanogaster*, además del medio de cultivo en general y las moscas que no han sido expuestas a nanopartículas. Para la medición de los blancos, se pesaron entre 0,3 y 0,4 g de cada uno de los componentes del medio de cultivo, el medio de cultivo en conjunto y cruzamientos de moscas *Drosophila melanogaster* sin ser expuestas a Fe₃O₄NPs. Se sometieron a calcinación en crisoles de porcelana durante 8 horas a 450 °C en una mufla marca Comecta S.A. Las muestras calcinadas fueron tratadas con 10 mL de HNO₃ 0,1 N durante 1 hora. Se filtró y aforó a un volumen de 25 mL con el

mismo ácido en balones de aforo clase A, para ser leídas por el Espectrofotómetro Absorción Atómica.

2.8.1.2. MUESTRAS EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO

Se sigue el mismo procedimiento expuesto para los blancos en el punto 2.8.1.1, considerando que esta vez analizó el medio de cultivo con Fe₃O₄NPs y la F1 de las moscas expuestas a nanopartículas de magnetita. Es importante recalcar que las muestras analizadas fueron congeladas hasta su análisis.

2.9. SELECCIÓN DE MOSCAS EXPUESTA A LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO

Se tomaron muestras de moscas F2 y F3 expuestas a Fe₃O₄NPs sin recubrimiento para determinar si existieron daños morfológicos o presencia de estructuras extrañas. Para esto se tomaron individuos sin nanopartículas y se compararon con las moscas tomadas de la segunda y tercera generación expuestas a las mismas.

Para la diferenciación se tomó en cuenta la morfología propia de las moscas *Drosophila melanogaster*, en especial se observaron la forma del abdomen y las alas. Para obtener las imágenes de las moscas expuestas a Fe₃O₄NPs se utilizó un Microscopio Discovery V8 Carl Zeiss acoplado a una cámara AxioCam MRc de alta resolución.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EXTRACCIÓN DE QUITOSANO

Se empleó xileno para la despigmentación de las cáscaras de camarón, evitando que la astaxantina intervenga en la extracción del quitosano, ya que al ser un terpeno es posible que reaccione con el hidróxido de sodio o el ácido clorhídrico durante el tratamiento y ocasione el encapsulamiento del quitosano y que resulte imposible separarlos. La desproteinización y descalcificación, se realizaron utilizando medios básicos y ácidos fuertes para extraer todos los compuestos solubles en ambos rangos de pH, de tal manera que se obtenga la porción insoluble presente en el exoesqueleto del crustáceo, en este caso la quitina.

La quitina fue sometida a un proceso de desacetilación en presencia de NaOH concentrado, para eliminar los grupos acetilantes y dejar los nitrógenos libres, para que puedan unirse al fármaco correspondiente o acercarse a las cargas que rodean a las nanopartículas. Esta reacción se muestra a continuación en la Figura 3.1.

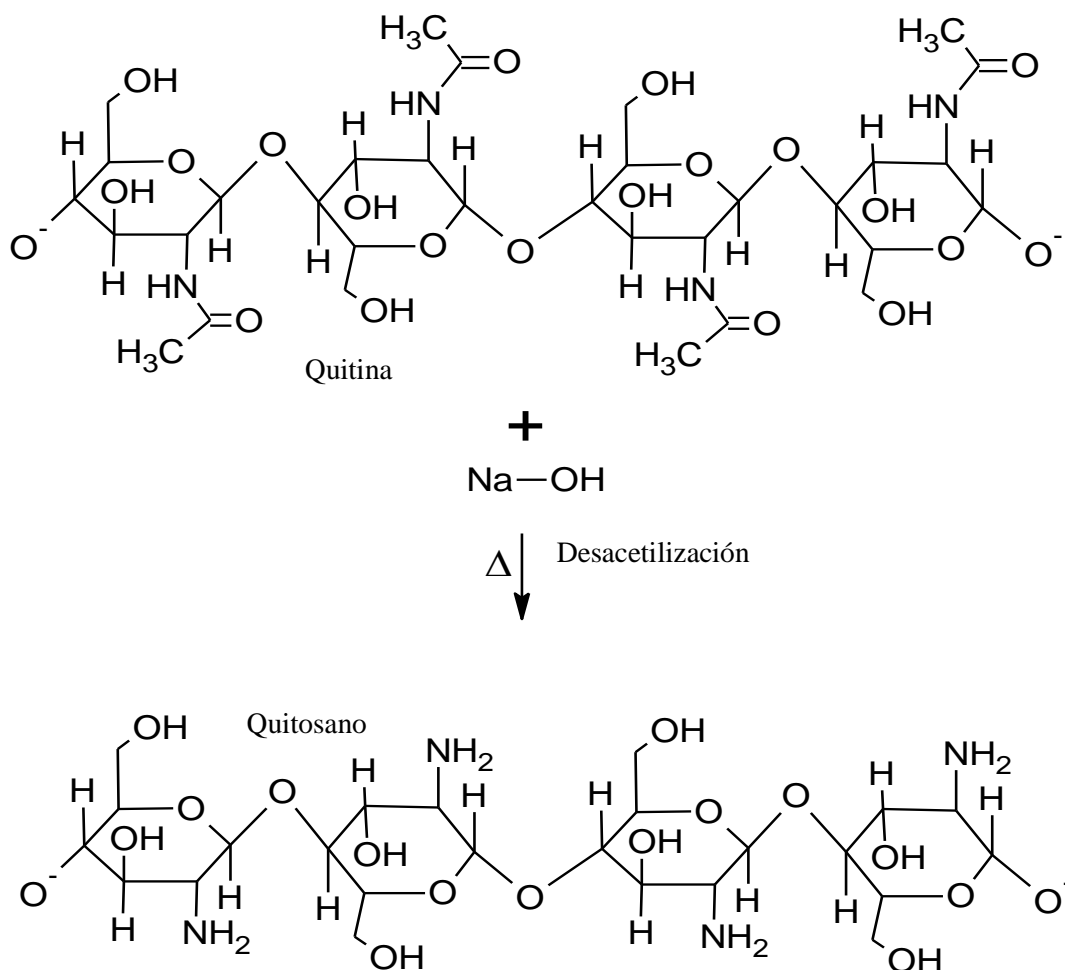


Figura 3.1. Desacetilación de la quitina [27]

El rendimiento de la desacetilación de la quitina no es del 100%, y existen muchas veces en las cuales el mayor porcentaje que se logra obtener es al 80% como máximo, obteniendo finalmente un compuesto doble de quitina y quitosano, el cual comúnmente es utilizado como quitosano, ya que la mayoría de las propiedades de esta molécula pertenecen a los grupos aminos de la estructura. En la Figura 3.2 se muestra la estructura híbrida de quitina-quitosano.

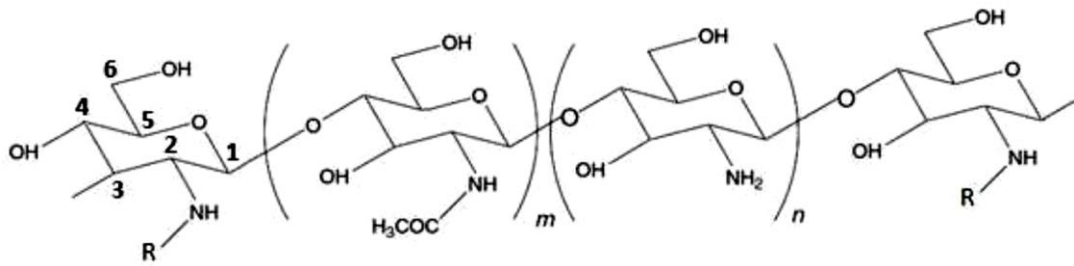


Figura 3.2. Estructura híbrida de quitina-quitosano [30]

Como producto de la extracción se obtuvieron unas estructuras sólidas en forma láminas de color amarillento, delgadas e insolubles en agua, como se muestra en la Figura 3.3. El producto obtenido fue soluble a pH ácido por lo que se puede demostrar que se tiene una desacetilización mayor al 60% y se puede nombrar a la estructura como quitosano.



Figura 3.3. Quitosano obtenido a partir de cáscaras de camarón

El rendimiento de la reacción de extracción de quitosano se presenta en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Eficiencia de extracción de quitosano

<i>Cáscaras de camarón secas (g)</i>	<i>Porcentaje teórico de quitina en el camarón (%)</i> <i>[23]</i>	<i>Quitosano extraído (g)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
484.84	17	49.6435	60.24

Se puede observar que el rendimiento de la reacción es relativamente aceptable (60.24 %), pero se debe considerar que no se cuenta con un porcentaje de quitosano en el exoesqueleto del camarón, sino únicamente de quitina y al eliminar los grupos acetilantes disminuye el peso de la molécula. Además, durante la extracción se produjeron pérdidas al momento de realizar cambio de papeles filtros y lavados.

Para asegurar que el producto obtenido sea efectivamente quitosano se realizó el análisis de una muestra del producto extraído a través de una Espectroscopía de Infrarrojos (FT-IR). No se caracterizó la quitina debido a que durante la extracción se encontraba en gelatinoso y fue necesario realizar la desacetilización inmediatamente para evitar que la quitina se secase y presentara sus características físicas propias, como es la dureza relativamente fuerte y la dificultad de volver a estado gel, además, serían datos no comparables teóricamente cuando se ensamblan con nanomateriales.

En la Figura 3.4 se puede observar el espectro IR del quitosano. A los 3700 a 3000 cm^{-1} se presentan las vibraciones de estiramiento correspondientes al grupo OH, este pico solapa a la vibración del enlace N-H del grupo amino. Se presentan picos en las regiones de los 2900 y 2800 cm^{-1} que corresponden a los enlaces C-H₂ y C-H₃ respectivamente, por lo cual se puede decir que el quitosano extraído presenta algunos grupos acetilados por partir de la quitina.

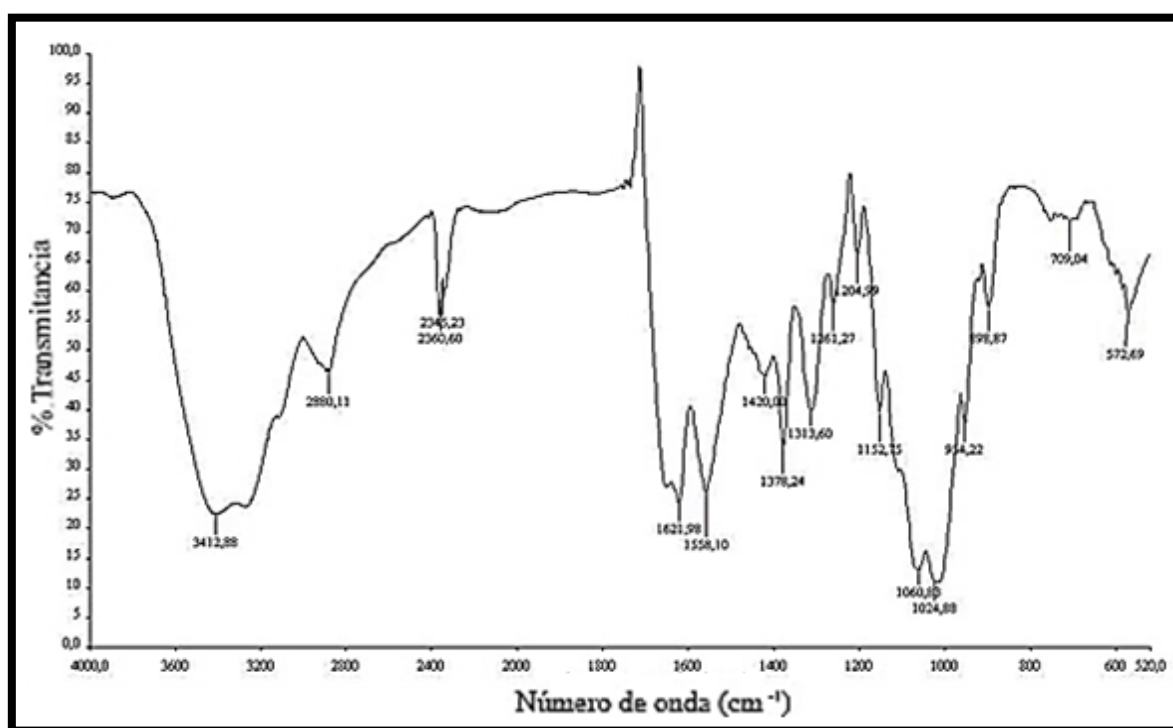


Figura 3.4. Espectro infrarrojo de quitosano extraído

Los picos ubicados en la zona de 1700 a 1500 cm^{-1} son los relacionados con las vibraciones del enlace carbonilo ($-\text{C}=\text{O}$) del grupo amida. La zona correspondida entre los 1450 a 1200 cm^{-1} corresponde a las vibraciones propias de los enlaces simples entre carbono-carbono y carbono-hidrógeno. La banda ubicado en la frecuencia 1261 cm^{-1} es la vibración de estiramiento en el plano del grupo $-\text{N}-\text{H}$ libre resultado de la desacetilación de

la quitina. En la zona entre 1160 a 1000 cm^{-1} se encuentran las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de los enlaces C-O-C del anillo sacárido que conforma el quitosano.

El pico que se encuentra a 898 cm^{-1} corresponde a la vibración del anillo sacárido, además que pico ubicado en la zona de 1060 cm^{-1} , muestra los puentes de hidrógenos formados por los grupos activos del quitosano. En la frecuencia 1261 y 1060 cm^{-1} , se pueden ver los picos más importantes para la identificación del quitosano ya que representan a los grupos activos sueltos resultantes de la desacetilación de la quitina [46] y la factibilidad de que estos grupos activos puedan encapsular a las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sintetizadas.

En la siguiente tabla se resumen los picos de mayor importancia para el quitosano.

Tabla 3.2. Análisis Espectro Infrarrojo de quitosano extraído

<i>Muestra</i>	<i>Banda IR (cm^{-1})</i>	<i>Descripción de banda</i>
Quitosano	3412	Vibración de estiramiento O-H pico solapado vibración N-H
	2880	Vibración de estiramiento C-H ₂ y C-H ₃
	2360 y 2345	Vibración de molécula de CO ₂

	1622	Vibración de estiramiento de amida secundaria
	1558	Vibración de estiramiento de amina protonada
	1420, 1378	Vibración secundarias de enlaces C-C y C-H
Quitosano	1313	Vibración simétrica de estiramiento de amida ternaria
	1261	Vibración de estiramiento de -N-H
	1152, 1024	Vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas respectivamente del grupo C-O-C
	1060	Vibración de estiramiento del puente de hidrógeno C-O-H
	890	Vibración por meneo del anillo sacárido del quitosano

Si se compara el espectro FT-IR obtenido del quitosano extraído con el del quitosano estudiado por Kumirska, J., *et al.* (Figura 3.5), se puede asegurar que efectivamente el quitosano obtenido es un producto parcialmente puro, los mismo presenta los picos correspondientes para su identificación.

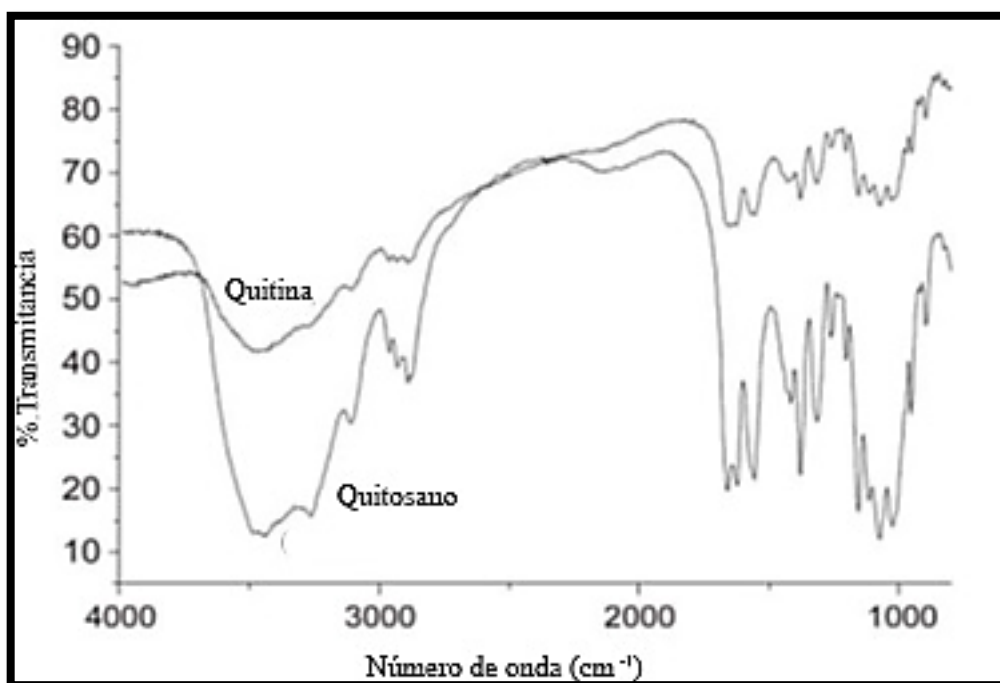


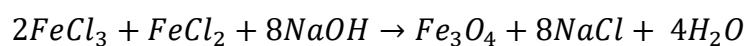
Figura 3.5. Espectro infrarrojo utilizado como estándar para la identificación del quitosano [30]

Al comparar específicamente la zona de la huella digital que inicia a los 1000-1200 cm^{-1} , tanto de la Figura 3.4 como de la Figura 3.5, se podrá observar que son muy similares, con ligeras alteraciones en los anchos de las bandas. Esto se debe a que el compuesto obtenido de la extracción presenta grupos de quitina y quitosano formando el polisacárido, además que el ambiente en el que se trabajó en la cual se obtuvo el espectro IR no presentaba

deshumificador, por eso la presencia del pico a la longitud de onda de 2300 cm^{-1} en la Figura 3.4 correspondiente al CO_2

3.2. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO

La síntesis de nanopartículas de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) se realizó por coprecipitación química, siguiendo la siguiente reacción:



El producto obtenido fue un precipitado de color negro, el cual en presencia de un campo magnético es atraído inmediatamente, y en ausencia del mismo forma suspensiones. Además, las nanopartículas suspendidas en poca cantidad de solvente forma un ferrofluido, en donde el solvente no se separa de las nanopartículas y al estar en presencia de un imán se mueve como un todo.

Las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ obtenidas deben ser lavadas, al menos tres veces con agua desionizada, para eliminar el NaCl , el cual puede alterar los resultados obtenidos para el estudio de exposición en moscas *Drosophila melanogaster*. Por otro lado, se almacenaron en estado sólido para poder mezclar con facilidad en el medio de cultivo de las moscas.

3.2.1. FACTORES QUE AFECTAN EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA

3.2.1.1. TEMPERATURA

El control de la temperatura durante la síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ debe ser estrictamente meticuloso, debido a que dependiendo del rango de temperatura en la cual se está trabajando se obtendrán diferentes productos, partiendo de las mismas sales de hierro. Por ejemplo, si se trabaja en un rango menor a 60°C se promueve la formación de oxihidróxido hidratado amorfo de hierro (goetita), la cual se convierte fácilmente en maghemita. La temperatura óptima en la cual se debe trabajar para obtener la mayor cantidad de magnetita debe ser entre 60 y 80°C , de tal manera que se formen hidróxidos de hierro y estos a su vez pasen a magnetita [50]. Si la síntesis se realiza a temperatura ambiente, las sales de hierro no se ionizarán exitosamente, provocando que no se obtengan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$.

Por otro lado, si la temperatura aplicada no se controla se obtendrá un porcentaje muy bajo de magnetita en comparación con la maghemita, o en otros casos no se formaran óxidos de hierro. Por estas razones, durante la síntesis se utilizó un control muy estricto de la temperatura llegando a los 60°C , evitando que el medio de reacción de evapore.

3.2.1.2. REDUCTOR

El tipo de reductor a utilizarse dependerá de las características deseadas para las nanopartículas. Por ejemplo, para obtener únicamente núcleos magnéticos sin

recubrimiento de un tamaño menor a 100 nm, se utiliza una solución de una base fuerte como el hidróxido de sodio. Si se requiere una funcionalización exitosa de un núcleo nanométrico se deberá utilizar una base débil como reductor para que los iones que conforman la base no compitan con el polímero encapsulante [36].

El amoníaco se utiliza como reductor del hierro debido a que cede un electrón para reducir a los iones de hierro de 3+ a 2+, y a su vez, para regresar a su estado como hidróxido, oxida a los iones de 2+ a 3+ provocando un movimiento de cargas que promueve la formación de óxidos de hierro divalentes [51].

Es importante recalcar que el tiempo en el cual se va añadiendo el reductor afecta al tamaño de nanopartícula obtenido, por esta razón, al colocar el reductor gota a gota, y con la agitación magnética adecuada, se permite que las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ formadas se separen y se distribuyan por todo el medio de reacción, evitando que formen conglomerados para disminuir la relación superficie/volumen. Si se colocara completamente el reductor sin pausa, se provocaría un foco local en la solución, en otras palabras, la formación de núcleos de magnetita en un solo punto, provocando que las partículas formadas se vayan uniendo hasta llegar a un tamaño macrométrico y compacto, muy difícil de dispersar [36].

3.2.1.3. pH

El pH depende activamente de la fuerza iónica de la disolución y por ende existe una estrecha relación entre ambos. Para obtener tamaños uniformes de nanopartículas, la

síntesis se debe realizar en un medio básico (pH entre 10 y 11), debido a que a este pH la superficie de las nanopartículas se encuentra completamente cargada, evitando el envejecimiento de las mismas y la formación de conglomerados. Además, al existir un pH demasiado bajo, la reacción tiende a formar maghemita (Fe_2O_3), la que presenta un color parduzco y un poder magnético inferior comparada con la magnetita [28].

3.2.1.4. AGITACIÓN

La velocidad de agitación de la solución durante la síntesis permite controlar el tamaño de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ que se obtendrán, de tal manera que si la agitación es débil, el tamaño aumentará, y en contraposición de tener una agitación vigorosa, el tamaño de nanopartícula ira disminuyendo [50].

Al realizar una síntesis por coprecipitación química se debe utilizar una agitación magnética, de tal manera que durante todo el proceso la síntesis se encuentre en movimiento constante. Han existido diferentes dudas sobre las posibles alteraciones que la agitación magnética podría influenciar sobre las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ obtenidas, pero se ha demostrado que, al tener materiales superparamagneticos, la magnetización del agitador no afecta al carácter de las nanopartículas, tanto así que al retirar el campo magnético del agitador, toda la fuerza magnética desaparece de los productos [20].

3.2.1.5. ATMÓSFERA

Es muy importante considerar que al trabajar a una escala nanométrica, las propiedades físicas y químicas de los compuestos cambian en gran proporción. En estado macrométrico la magnetita tiende a oxidarse lentamente al estar en presencia de una atmósfera oxidativa, pero al encontrarse como nanopartícula, se vuelve sensible a una atmósfera saturada de oxígeno y se oxida con suma facilidad, por esta razón es importante que la síntesis se realice en una atmósfera inerte que garantice la estabilidad de las Fe₃O₄NPs [37], por esto se utilizó una atmósfera de helio.

Una característica muy simple de identificar cuando se está trabajando con una atmósfera oxidativa, es que el medio de síntesis cambia de color negro a rojo ladrillo correspondiente a la maghemita.

3.2.1.6. ULTRASONIDO

El ultrasonido permite disgregar los cúmulos de nanopartículas y dispersarlos uniformemente en el solvente utilizado, lo que produce que se disminuya la heterogeneidad de tamaños y aumente la fuerza magnética de las nanopartículas [36].

Existen tres momentos de suma importancia donde se debe utilizar la ultrasonidificación. La primera, se debe utilizar después del término de la síntesis para asegurar que una capa cargada conformada por hidroxilos recubra a las nanopartículas. El segundo momento es

en el lavado, en donde el objetivo es eliminar los iones contaminantes, como son el sodio o el cloro, de las superficies de las Fe₃O₄NPs. Finalmente, se debe utilizar como mínimo 10 minutos de ultrasonido para dispersar a las nanopartículas en etanol y homogenizar los tamaños de partícula [36]. Se debe asegurar que cada una de las Fe₃O₄NPs se encuentre rodeada de solvente para evitar los posibles contactos con el aire atmosférico.

3.2.2. RENDIMIENTO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO

Para poder obtener los rendimientos de reacción de la síntesis Fe₃O₄NPs con y sin recubrimiento de quitosano, se controló estrictamente la temperatura de reacción con un rango de variación de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La agitación fue la misma durante todo el proceso. Por otro lado, la velocidad de adición del reductor se controló cuidadosamente de una gota cada 2 segundos. Además, entre cada lavado permitió la decantación con ayuda del superimán por el lapso de 1 hora, a excepción del primer lavado donde se dejó decantar durante 24 horas.

Los resultados obtenidos de las síntesis de Fe₃O₄NPs son presentados en la Tabla 3.3. El rendimiento promedio de la síntesis utilizada es de 91,36 %, por consiguiente las condiciones en las cuales se realizó la reacción son las adecuadas para favorecer la síntesis.

Tabla 3.3. Rendimiento de síntesis por coprecipitación de nanopartículas de magnetita

<i>Síntesis</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Peso FeCl₃ (g)	0,3051	0,3059	0,3008	0,3010	0,3009
Peso FeCl₂ (g)	0,1418	0,1437	0,1402	0,1399	0,1403
Peso Fe₃O₄NPs (g)	0,1960	0,2015	0,1935	0,1981	0,1971
Peso Fe₃O₄NPs Estq.* (g)	0,2176	0,2181	0,2145	0,2146	0,2146
Rendimiento (%)	90,08	92,37	90,21	92,29	91,85

* Peso Fe₃O₄NPs Estq. Peso de nanopartículas que se deberían obtener según cálculos estequiométricos

3.3. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO

Se realizó la síntesis de las nanopartículas magnéticas de hierro recubiertas de quitosano (Fe₃O₄NPs-Ch) igual que en el apartado 3.2, variando el reductor a amoníaco al 20%, ya que al ser una base débil provee los hidroxilos para que recubran a las Fe₃O₄NPs y no compite con el quitosano para adherirse a la capa negativa y por consiguiente funcionalizarse. En la Figura 3.6 se puede observar la encapsulación de una Fe₃O₄NPs con quitosano.

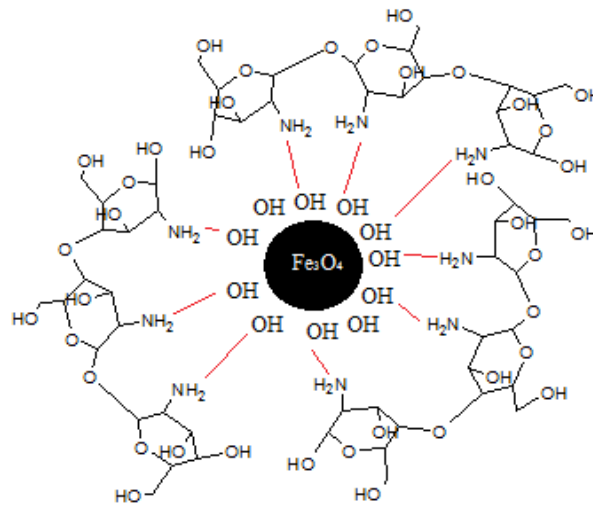
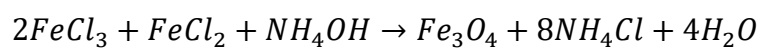


Figura 3.6. Funcionalización de las nanopartículas de magnetita con quitosano [52]

Si el reductor utilizado fuera hidróxido de sodio, el sodio competiría con el quitosano por unirse con el ion hidroxilo que recubre a las nanopartículas magnéticas y por consiguiente no se conseguiría una funcionalización exitosa.

La reacción a través de la cual se obtuvieron las Fe_3O_4 NPs-Ch fue la siguiente.



El quitosano se coloca al inicio de la reacción para realizar un recubrimiento *in-situ* para controlar el tamaño de nanopartículas que se va a obtener. Se debe considerar que el quitosano no forma parte de la reacción de obtención, pero sí del medio, el cual es ligeramente ácido al iniciar la síntesis, por lo que permite al quitosano protonar sus grupos amino y disgregarse por el medio.

El producto obtenido de la reacción es un precipitado de color negro, el cual se presenta en cúmulos visibles, pero que es atraído con suma intensidad a la presencia de un campo magnético exterior, como se puede ver en la Figura 3.7.



Figura 3.7. Nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano expuestas a un campo magnético externo

Una vez encapsulada la nanopartícula y después de los lavados respectivos del producto, el quitosano debido a su carácter ligeramente ácido en solución acuosa se transforma en un bioadhesivo el cual va a unirse a las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ cargadas negativamente y cubrirles.

- **RENDIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA RECUBIERTAS CON QUITOSANO**

El rendimiento de la síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ recubiertas fue obtenido siguiendo los mismos parámetros expuestos en el punto 3.2.2.

Para la síntesis de Fe₃O₄NPs-Ch se debe tener en cuenta que las moléculas de quitosano no entra dentro de los cálculos estequiométricos, considerando el aumento en el peso del producto final, por lo cual el rendimiento real tiende a ser un poco menor del presentado. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Rendimiento de síntesis por coprecipitación de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con quitosano

<i>Síntesis</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Peso FeCl₃ (g)	4,3239	4,3231	4,3240	4,3229	4,3228
Peso FeCl₂ (g)	1,9900	1,9888	1,9856	1,9884	1,9795
Peso Fe₃O₄NPs (g)	1,6689	1,6829	1,7054	1,6899	1,6934
Peso Fe₃O₄NPs Estq. * (g)	1,8527	1,8524	1,8527	1,8523	1,8522
Rendimiento (%)	90,08	90,85	92,05	91,23	91,42

* P Fe₃O₄NPs Estq. Peso de nanopartículas que se deberían obtener según cálculos estequiométricos

El rendimiento promedio de la síntesis de obtención de nanopartículas funcionalizadas fue del 91.12 %, demostrando que la síntesis permite obtener cantidades aceptables de nanoestructuras, comparando con la cantidad teórica esperada.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Para la caracterización de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se utilizaron diferentes técnicas dependiendo si se encontraban funcionalizadas o no, pero para los dos tipos de nanopartículas sintetizadas se realizó un análisis elemental en un Microscopio de Barrido. En la Figura 3.8 se muestra el análisis elemental de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sin recubrimiento.

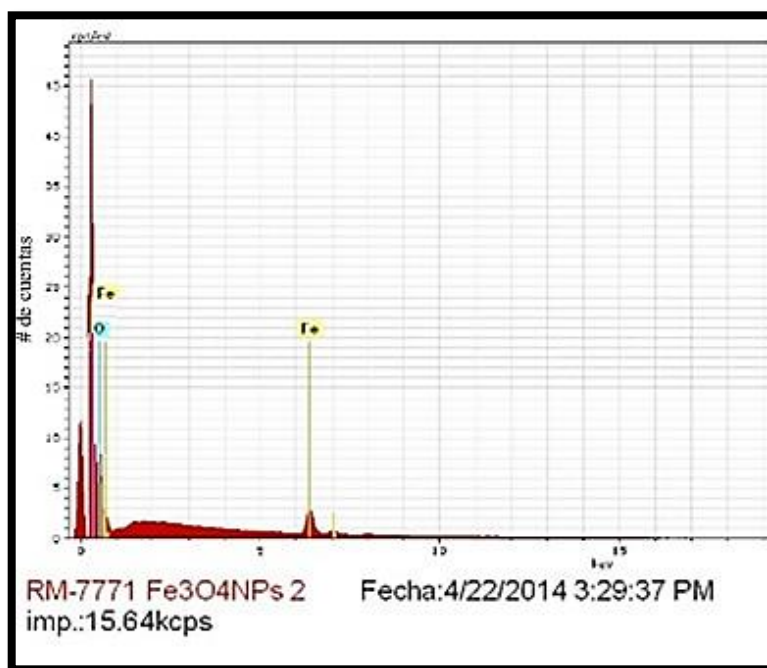


Figura 3.8. Espectro de energía dispersiva de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento

Como se muestra en la Figura 3.8, las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ presentan en su análisis elemental solamente hierro y oxígeno, lo que demuestra que las nanoestructuras trabajadas pasaron un proceso de lavado satisfactorio y es factible utilizar este producto en organismos vivos. Debido a la altura y el ancho del pico del hierro, presente entre 0 y 5 kv de energía dispersiva, se puede considerar que la estructura analizada presenta un alto porcentaje de hierro, por lo cual se podría afirmar que efectivamente se está observando magnetita.

Como portamuestras del microscopio de barrido (SEM) se utilizó un adherente de carbono, por lo cual resulta imposible la identificación del carbono perteneciente al quitosano, por lo cual el análisis elemental que se obtendrá de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ es similar a las de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ solas, como se observa en la Figura 3.9.

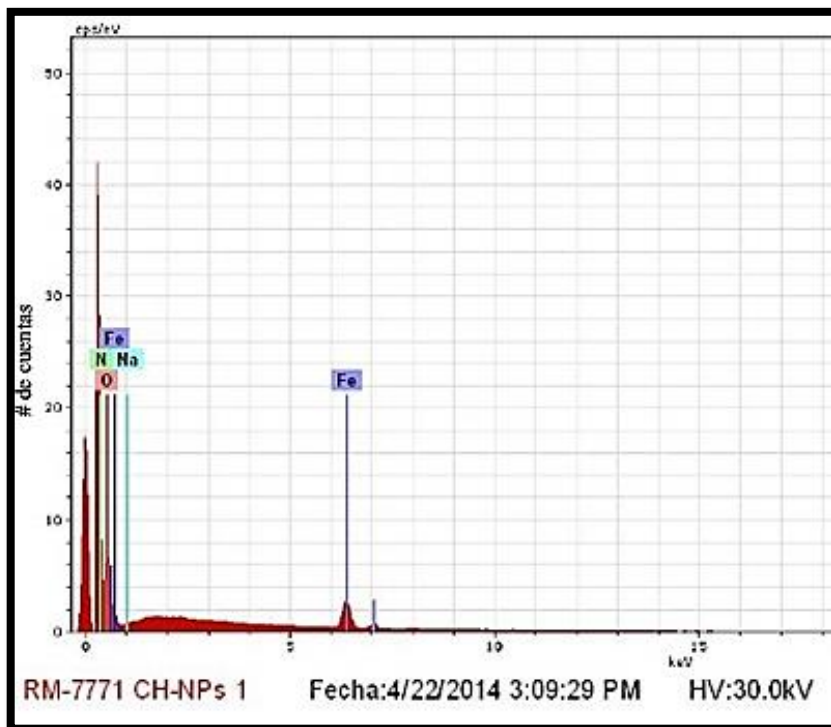


Figura 3.9. Espectro de energía dispersiva de nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano

En la Figura 3.9 se muestran se puede observar que existe ligera presencia de nitrógeno debido a la estructura propia del quitosano y sodio proveniente de las paredes de vidrio de borosilicato de sodio de la caja petri, pero el límite de detección del equipo para elementos es del 1%, y al presentar una concentración menor a este límite no se asegura la presencia de sodio en las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ recubiertas.

3.4.1. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBIERTA

El tamaño de partícula de nanopartículas de magnetita obtenida de la síntesis por coprecipitación descrita en el apartado 2.2 se comprobó con el uso del Microscopio de Transmisión Electrónica TEM, el cual permite observar estructuras nanométricas. La imagen de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sintetizadas se muestra en la Figura 3.10.

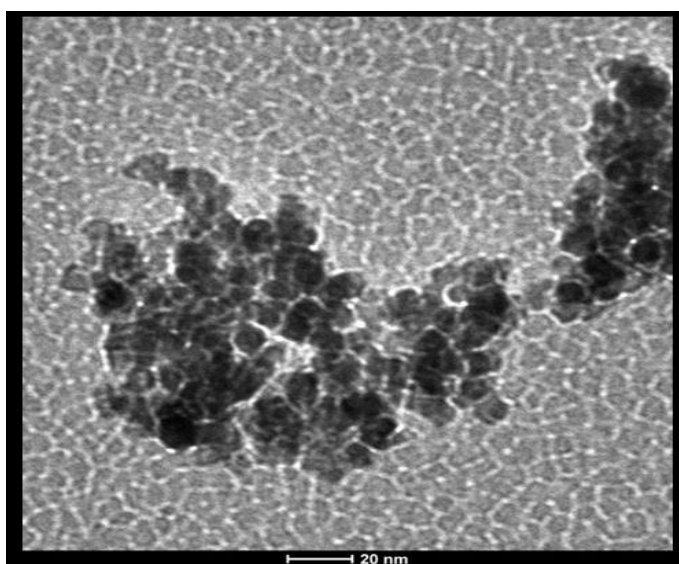


Figura 3.10. Nanopartículas de magnetita vistas con el Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) Escala: 20 nm

La escala de la Figura 3.10 es de 20 nm, lo que nos permite concluir que se están obteniendo $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ de un tamaño menor a 10 nm, lo que le da una característica favorable para el uso biomédico debido a que no son propensas a precipitar dentro del organismo humano, además presentan el tamaño adecuado para adentrarse a través de la barrera celular sin causar daños.

3.4.2. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA FUNCIONALIZADAS CON QUITOSANO

Se compararon los espectros IR de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ solas, del quitosano y de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$. En la Figura 3.11 se observa el espectro IR de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ no funcionalizadas donde el pico propio de las nanopartículas se encuentra en la zona de los 520 cm^{-1} , el cual pertenece a la vibración de estiramiento del enlace nanométrico del hierro con el oxígeno [37].

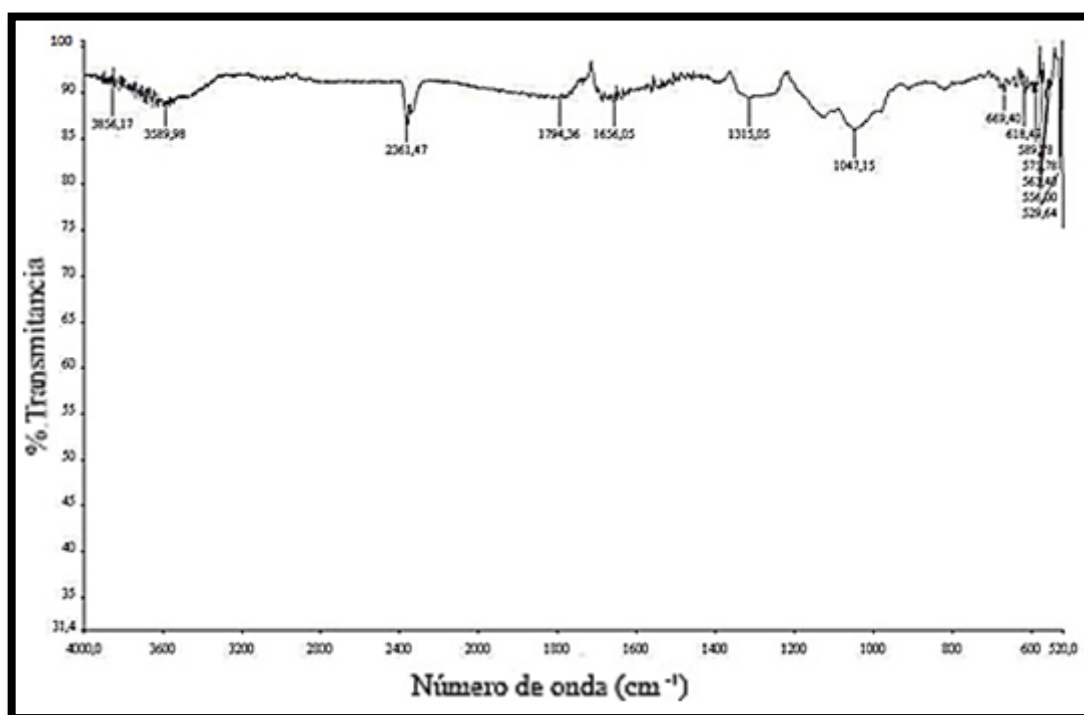


Figura 3.11. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento

A continuación se presenta en la Figura 3.12 el espectro obtenido de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con quitosano.

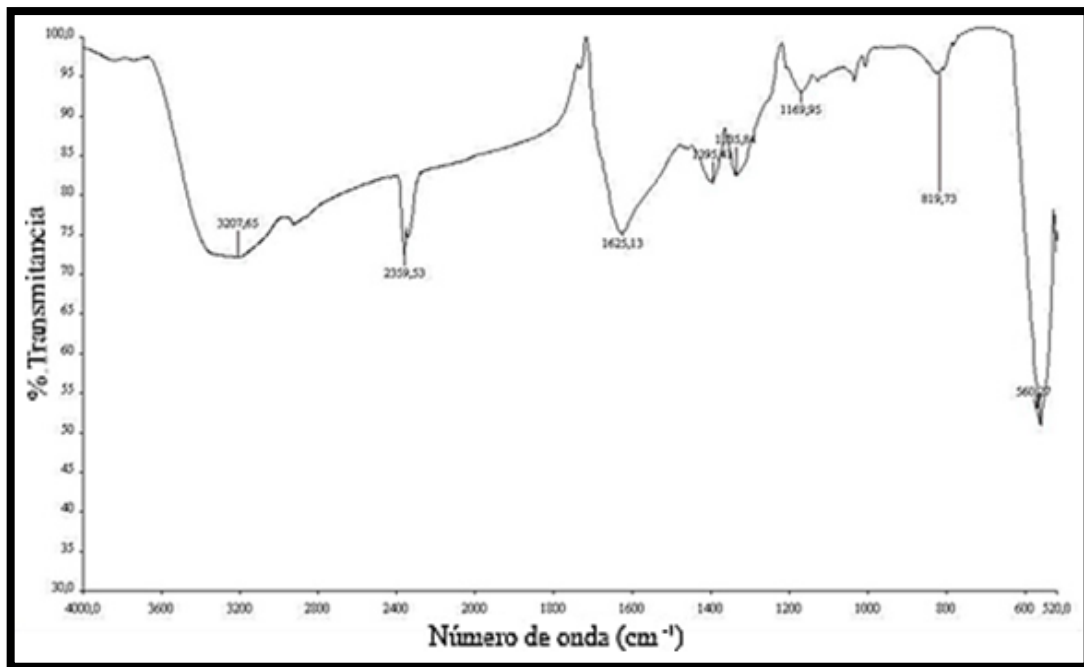


Figura 3.12. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita recubierta con quitosano

Al comparar la Figura 3.11 con la 3.12, se puede observar que efectivamente se tienen nanopartículas en la muestra analizada debido al pico pronunciado ubicado en la sección de 520 cm^{-1} , el cual se repite en ambos espectros [53]. El alargamiento del pico ubicado entre los $3750\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ demuestra la presencia de las vibraciones de los enlaces de O-H y N-H propios del quitosano.

La zona de la huella digital del espectro de la Figura 3.10 comparada con la Figura 3.11 son completamente diferentes, demostrando el recubrimiento.

Si se realiza una comparación del espectro del quitosano puro (Figura 3.4) con el de nanopartículas recubiertas (Figura 3.12), se puede observar que presentan picos en común.

La banda presente a 820 cm^{-1} corresponde a la vibración por flexión del anillo sacárido del quitosano, mientras que el pico ubicado a los 1170 cm^{-1} corresponde a los puentes de hidrógeno formados entre el nitrógeno del quitosano y el hidrogeno de la capa hidroxila de las nanopartículas de magnetita. También se encuentra presente el pico a los 1625 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace -N-H .

Un cambio similar en los espectros entre quitosano puro y las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ se observó en el estudio realizado por Gregorio-Jauregui *et.al* [39], en donde experimentaron con tres concentraciones diferentes de quitosano para realizar el recubrimiento, obteniendo los espectros mostrados en la Figura 3.13.

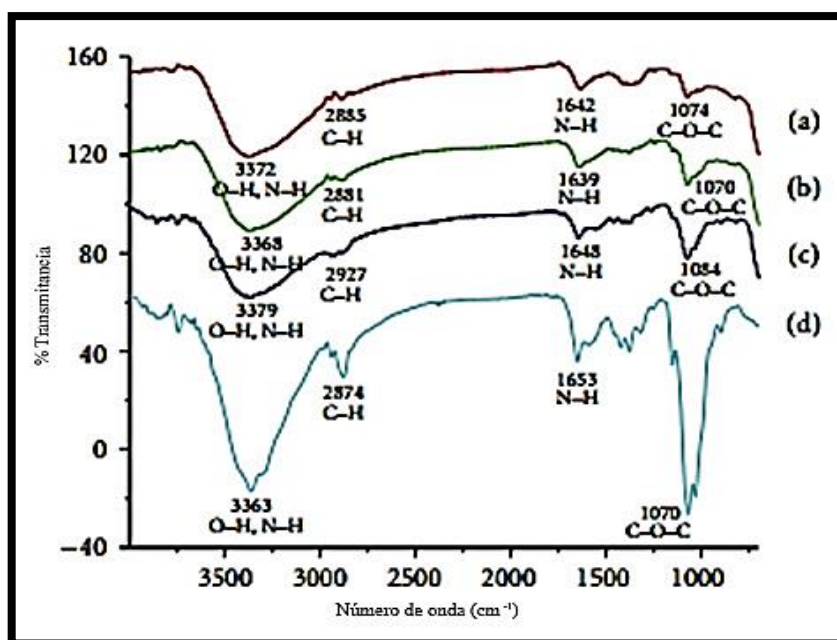


Figura 3.13. Espectro infrarrojo de nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano. Síntesis con concentración de quitosano (a) 0.125%, (b) 0.25 %, (c) 0.5 % (d) estructura del quitosano puro [39]

Si se compara las Figura 3.12 y el apartado b de la Figura 3.13 se puede observar los mismos picos en las frecuencias entre 2000 y 1000 cm^{-1} , demostrando que efectivamente hubo recubrimiento de nanopartículas.

3.5. DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Al no existir un método validado de análisis de hierro valido para el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica modelo AAnalyst 400, se realizó un acondicionamiento del método AOAC 999:11, el cual se presenta en el Anexo 2.

Todos los datos obtenidos durante este estudio se encuentran reportados en la Tabla 1 del Anexo 3 y los cálculos realizados para la concentración de hierro en unidades de miligramos de hierro por kilogramo de moscas se encuentra en el Anexo 1.

3.5.1. BLANCOS

El único de los componentes del medio de cultivo que presenta hierro es la gelatina, pero como se coloca en una proporción muy baja en la mezcla no supera el límite en la composición del medio de cultivo en conjunto, como se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Concentración de hierro en blancos

	<i>Análisis</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Concentración (mg/kg)</i>
<i>Plátano</i>	1	3,1044	<LC
	2	3,1308	<LC
<i>Limón</i>	1	3,0630	<LC
	2	3,0760	<LC
<i>Gelatina</i>	1	0,3013	17,4245
	2	0,3003	17,8988
<i>Levadura</i>	1	0,3005	<LC
	2	0,3016	<LC
<i>Nipagina</i>	1	1,7929	<LC
<i>Medio de cultivo</i>	1	0,3698	<LC
	2	0,4219	<LC

El análisis de los medios de cultivo de las moscas *Drosophila melanogaster* utilizados como base para la suspensión de nanopartículas no presenta una cantidad de hierro cuantificable por el equipo, por lo que se puede considerar que no se tiene hierro en el medio de cultivo matriz.

La concentración de hierro en moscas *Drosophila melanogaster* usadas como blanco permiten calcular la bioacumulación de hierro en los organismos por comparación. En la Tabla 3.6 se pueden observar los valores de hierro obtenidos en las moscas blanco.

Tabla 3.6. Concentración de hierro en moscas blancos *Drosophila melanogaster*

<i>Muestra</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Conc. Fe (mg/kg)</i>
1	0,2565	48,0
2	0,3179	51,0
3	0,2598	46,2
4	0,3090	49,8
5	0,1996	52,2
6	0,1974	55,5
7	0,2719	46,2
8	0,2006	50,7
9	0,2478	46,5
	\bar{X}	49.6

El valor promedio con el cual se va a trabajar de la concentración de hierro en las moscas, fue 49.5 mg/L, debido a los datos presentados la Tabla 3.6. La manera en la cual se realizaron los cálculos para este valor promedio se encuentra reportado en el Anexo 4.

Se puede observar en que la concentración de hierro en las moscas *Drosophila melanogaster* no es completamente constante, se deberá tener en cuenta que estas variaciones estarán presentes en todo el estudio y podrían dar como resultado valores negativos, al realizar la resta de la cantidad de hierro en los blancos.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN MEDIOS DE CULTIVO CON NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO

Las concentraciones de Fe₃O₄NPs con y sin recubrimiento de quitosano con las cuales se trabajaron fueron de 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L y 1000 mg/L. El medio de cultivo de las moscas presenta una consistencia semisólida y es muy difícil realizar la homogenización de las nanopartículas, por lo que se realizó el análisis de los medios de cultivo de cada concentración para asegurar el contenido real de hierro en el mismo, obteniendo los valores reportados en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Concentración de hierro en medios de cultivo de moscas

<i>Tipo</i>	<i>Conc. Teórica Fe₃O₄NPs Muestras (mg/L)</i>	<i>Conc. Fe Muestra (mg/L)</i>
Medios de cultivo con Fe₃O₄NPs	0	4.8
	100	93.7
	250	225.5
	500	495.5
	1000	901.1
Medios de cultivo con CH-Fe₃O₄NPs	0	1.4
	100	118.4
	250	219.7
	500	420.6
	1000	965.0

La concentración real de hierro en los medios de cultivo se encuentran tabulados en la Tabla 3.7, muestra que las concentraciones son cercanas a las teóricas. La diferencia se debe a la medición inexacta de la cantidad de medio de cultivo en el cual se homogenizaba las nanopartículas, ya que el volumen del medio se midió únicamente en un vaso de precipitación, por su consistencia. Además, se realizaron suspensiones de ferrofluidos de magnetita, más no de hierro, razón por la cual la concentración leída por Espectrofotometría de Absorción Atómica debe ser menor.

Aun tomando en cuenta todas las dificultades de la homogenización, se lograron obtener rectas con un r_f de 0.99, al enfrentar las concentraciones teóricas con las prácticas, como se muestra a continuación en las Figuras 3.14 y 3.15.

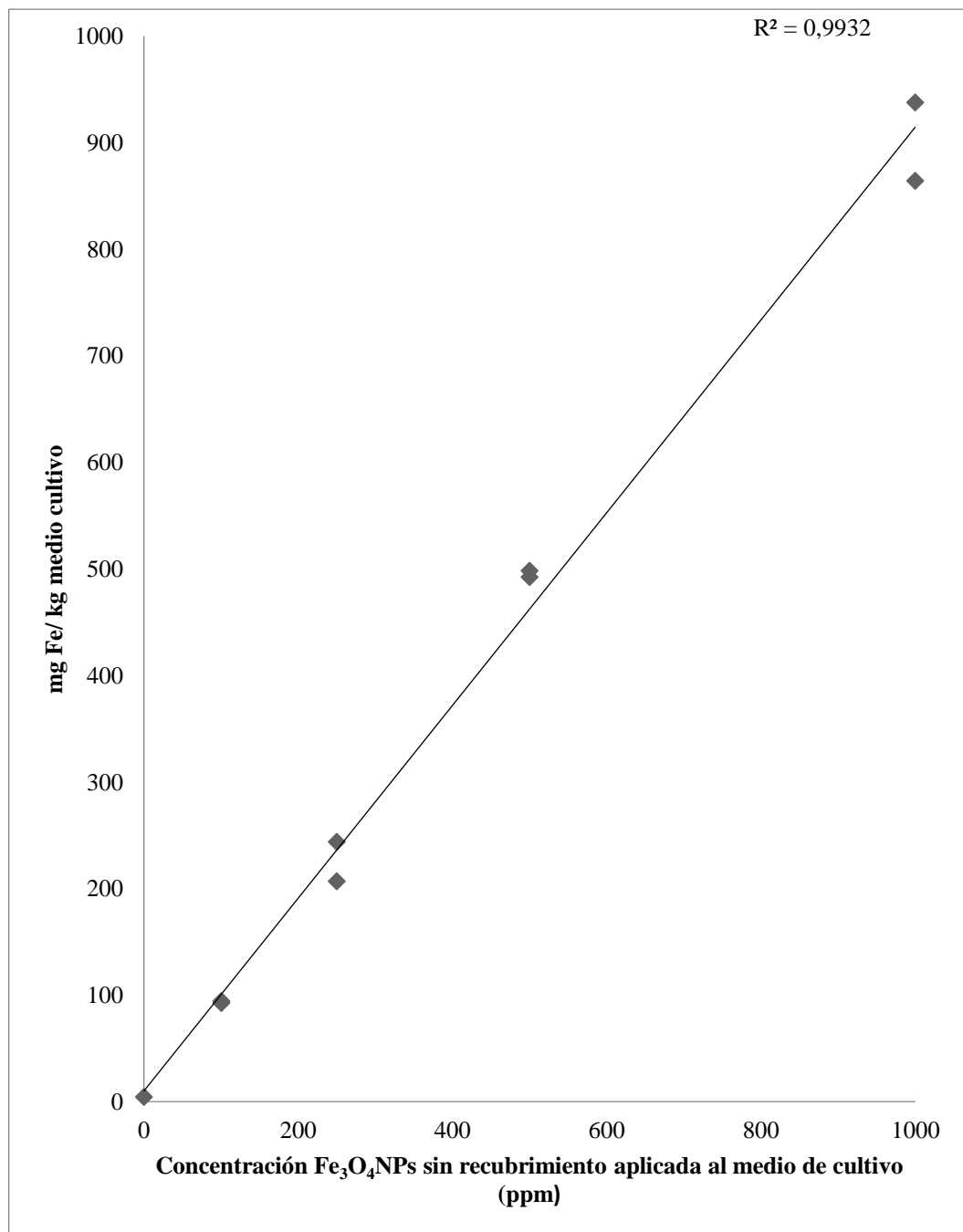


Figura 3.14. Concentración teórica versus concentración práctica de nanopartículas de hierro sin recubrimiento en medio de cultivo

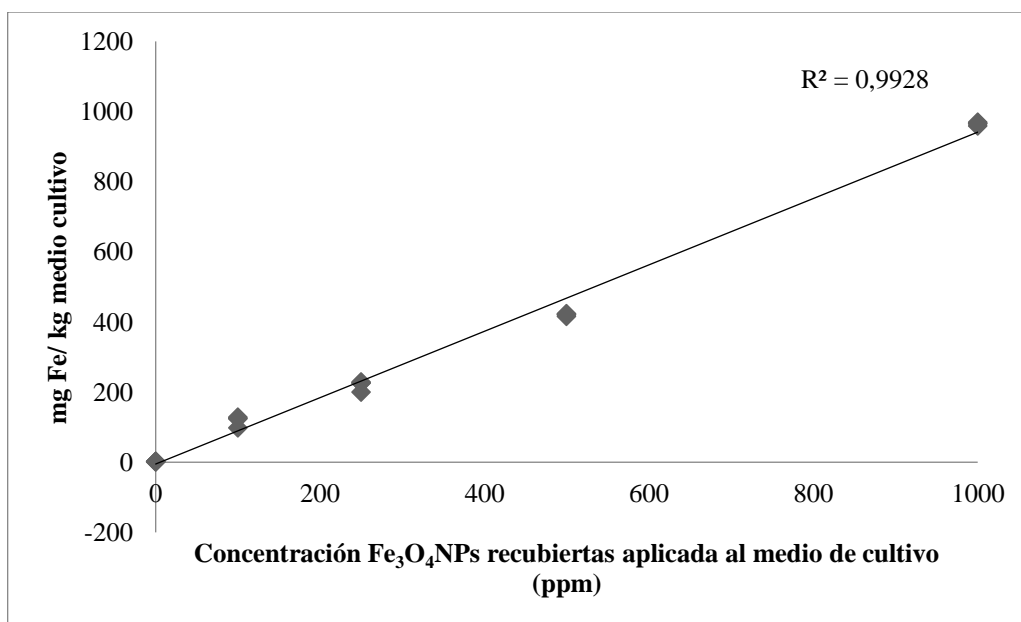


Figura 3.15. Concentración teórica versus concentración práctica de nanopartículas de magnetita funcionalizadas con quitosano en medio de cultivo

Ambas gráficas de concentraciones de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano en los medios de cultivo presentan una correlación cercana a 1 por lo cual se puede decir que las concentraciones son equivalentes.

3.5.3. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN PRIMERA GENERACIÓN (F1) DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO

Todos los datos reportados de la concentración de bioacumulación de hierro se encuentran corregidos con las concentraciones de los blancos. La Tabla 3.8 recopila los datos

obtenidos de 50 cruzamientos de moscas por concentración de nanopartículas en el medio de cultivo.

Tabla 3.8. Concentración de hierro en moscas expuestas a Nanopartículas de Magnetita

<i>Tipo</i>	<i>Concentración de Fe₃O₄NPs Muestras (ppm)</i>	<i>Conc. Fe Muestra (mg/kg)</i>	\bar{X}	σ
Moscas expuestas a Fe₃O₄NPs	100	4,4	6,6	3,0
		8,8		
	250	20,7	21,4	1,0
		22,1		
	500	< LB	<LB	-
		<LB		
	1000	41,5	39,5	2,7
		37,6		
Moscas expuestas a Fe₃O₄NPs-Ch	100	14,2	11,5	3,9
		8,8		
	250	8,9	10,1	1,7
		11,3		
	500	9,9	8,7	1,7
		7,5		
	1000	17,9	21,9	5,6
		25,8		

Como se puede observar, la concentración de hierro en las moscas va aumentando en forma proporcional a la concentración de hierro, pero a la 500 mg/L de nanopartículas se produce un pico descendente en la bioacumulación, mientras que a la concentración de 1000 mg/L aumenta nuevamente, demostrando que a 500 mg/L se encuentra la

concentración óptima de nanopartículas de magnetita que las moscas pueden consumir, este fenómeno se observa claramente en las Figuras 3.16 y 3.17.

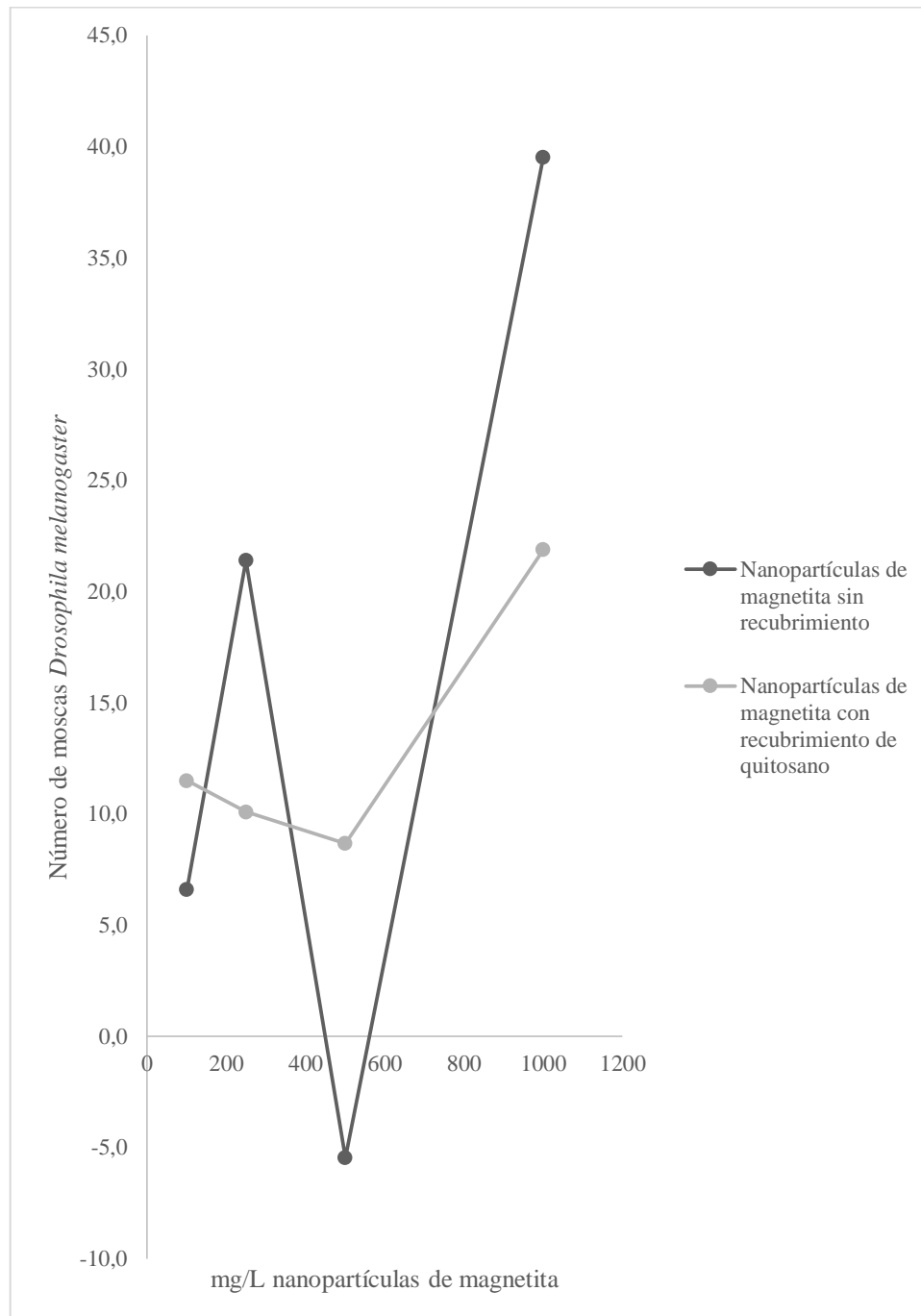


Figura 3.16. Concentración de hierro en moscas expuestas a nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano por dispersión

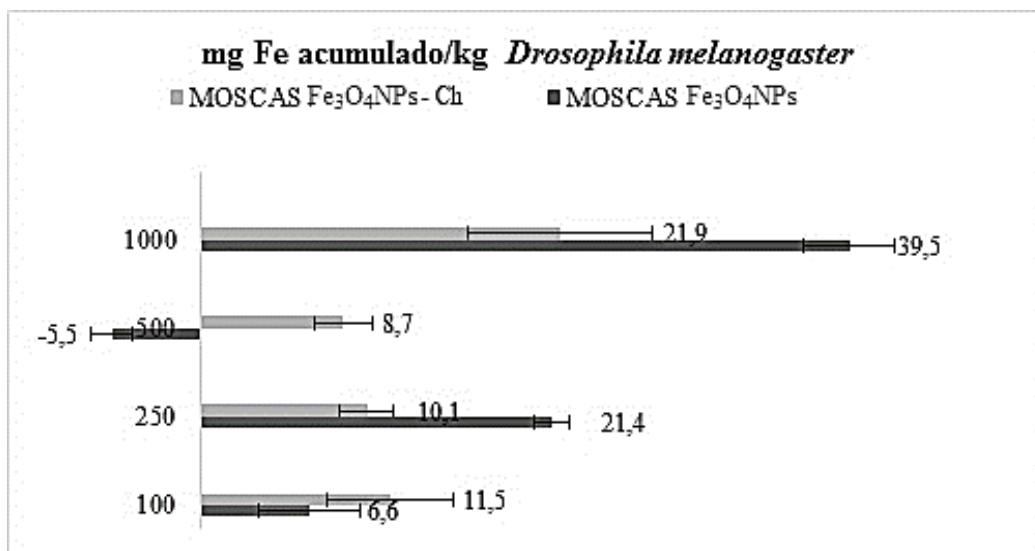


Figura 3.17. Concentración de hierro en moscas expuestas a nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano por análisis de barras

A la concentración de 500 mg/L de nanopartículas se observa una anomalía en la tendencia de la bioacumulación de hierro, tanto en las Fe_3O_4 NPs con y sin recubrimiento, por lo cual se puede pensar que en este punto el organismo de las moscas no puede absorber hierro, por lo cual todo es excretado. Debido a que los valores de hierro en las moscas es variable, los valores negativos de hierro pueden demostrar que no hubo una bioacumulación de hierro y que las moscas mantuvieron la concentración de hierro normal.

3.6. CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO

El conteo se realizó durante 1 semana (ver cronograma en los Anexos 5), tiempo promedio en el cual todos los huevos colocados se transformarían en moscas, obteniendo los

resultados reportados en la Tabla 3.9. Las moscas que emergieron después de la primera semana se les consideran como no aptas para el estudio ya que pueden ser producto del F2.

Tabla 3.9. Número promedio de moscas por concentración de nanopartículas de magnetita

<i>Tipo</i>	<i>Concentración de Fe₃O₄NPs (mg/L)</i>	<i>Total de moscas*</i>	\bar{X}_m^*	σ
	0	700	70	15,3
Moscas	100	1193	119	31,5
expuestas a	250	1551	155	29,6
Fe₃O₄NPs	500	714	71	16,8
	1000	1350	136	39,9
	0	819	82	16,4
Moscas	100	1099	110	25,1
Expuestas a	250	1195	120	17,0
Fe₃O₄NPs-Ch	500	1222	122	19,4
	1000	1147	115	15,3

\bar{X}_m : Promedio del número de moscas por concentración

*: Los datos completos recolectados de cada cruzamiento se encuentran reportados en el Anexo 6

En la Tabla 3.9 se puede observar el mismo fenómeno que se analizó en la Tabla 3.16 con respecto a las moscas expuestas a una concentración de 500 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ sin recubrimiento. En esta concentración no existe una notable alteración en el número de moscas que se producen con respecto a los blancos, en donde los rangos van de 700 a 800 individuos.

Por otro lado, al recubrir las nanoestructuras de hierro con quitosano, se puede observar que el número de individuos por concentración disminuyó con respecto al conteo de individuos expuestos a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, pero no se observa una disminución de los individuos a la concentración de 500 mg/L por lo que se puede concluir que las moscas pueden desechar las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ del cuerpo debido a la incapacidad de digerir el quitosano. En la Figura 3.18 se pueden observar gráficamente los datos obtenidos en las diferentes concentraciones.

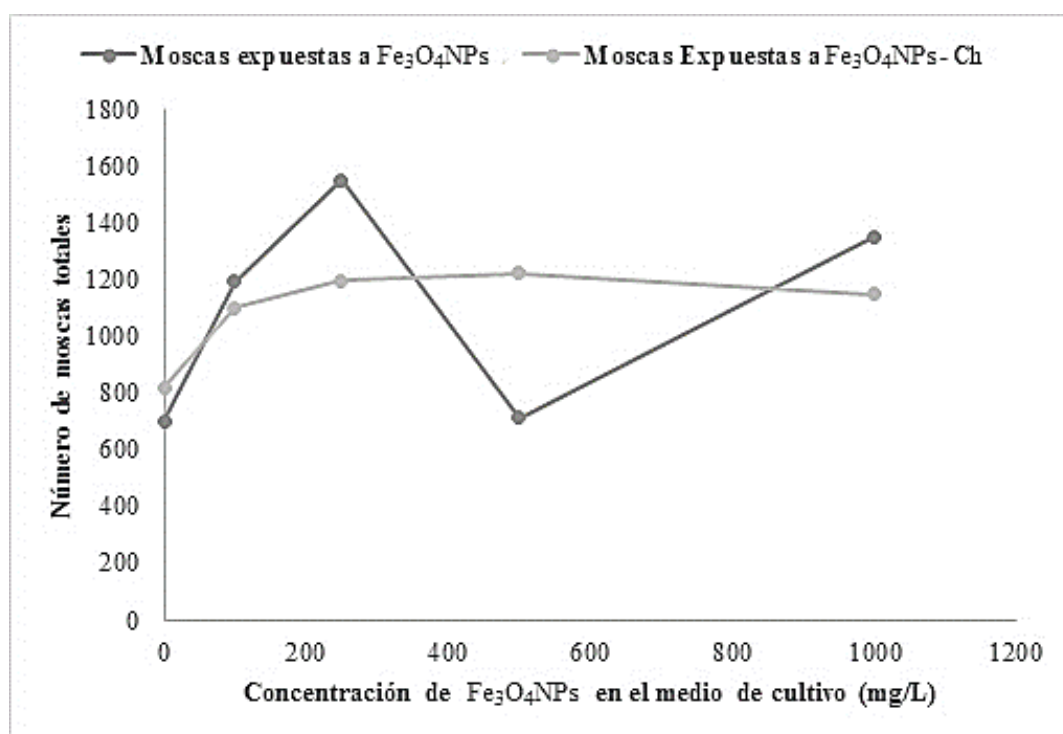


Figura 3.18. Número de individuos moscas totales por concentración utilizada

Como se observó en los datos de bioacumulación de hierro, el quitosano produce que las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ alteren en menor cantidad a las moscas *Drosophila*, lo que se puede observar en la Figura 3.19, en donde la cantidad de individuos resultantes es menor a la cantidad obtenida con las nanopartículas sin recubrimiento.

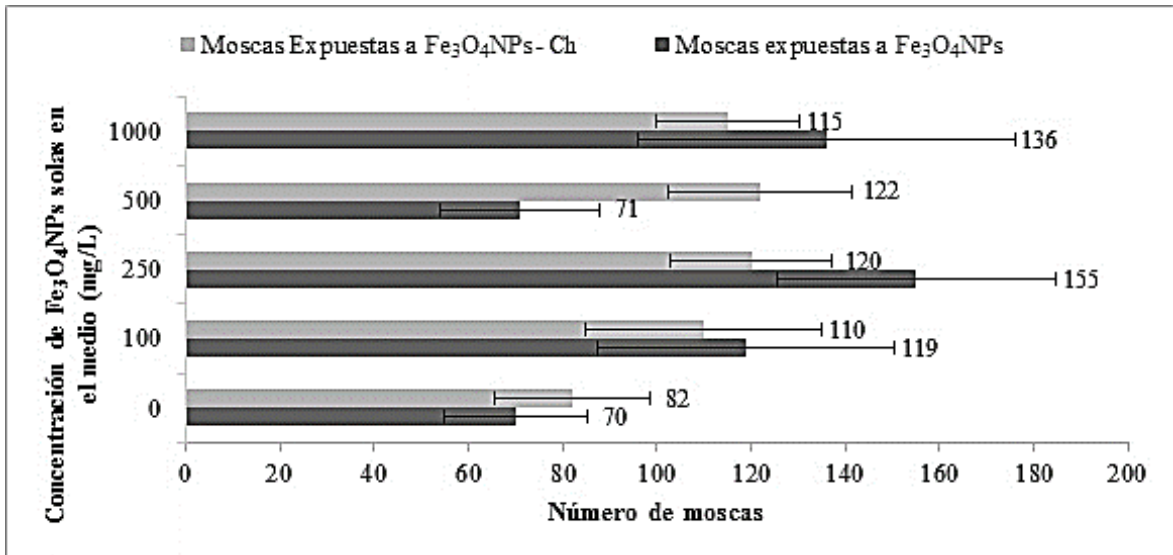


Figura 3.19. Número de moscas *Drosophila melanogaster* obtenidas por concentración de hierro a la cual fueron expuestas

El número de moscas que se obtuvieron de cada concentración fue variable en cada tubo, pero se puede ver una tendencia muy lógica en la cual se demuestra que al colocar $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-Ch}$ la cantidad de descendencia de las moscas es más constante y por consiguiente menos alarmante.

3.7. MORFOLOGÍA DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Debido a los resultados obtenidos a los análisis de bioacumulación de hierro como con los conteos de la descendencia, se vio la necesidad de obtener imágenes reales de los individuos expuestos de la F1 a las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ comparadas con las descendencias posteriores realizadas fuera de este estudio, F2 y F3.

En la Figura 3.20 se puede observar una larva y una mosca patrón con sus características morfológicas correctas. Las moscas utilizadas de partida, cumplen con las características propias de la especie. En el caso de la larva, se muestra una estructura homogénea y segmentos claramente distinguibles. La mosca adulta muestra los ojos rojos propios de las moscas *Drosophila melanogaster* y una contextura corporal armónica.

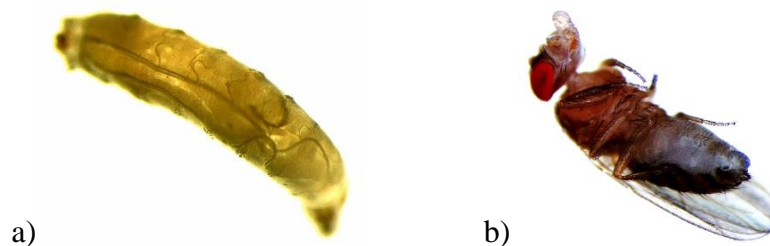


Figura 3.20. Moscas *Drosophila* analizadas: a) Larva de *Drosophila melanogaster* b) Mosca adulta *Drosophila melanogaster*. Ninguna de los individuos de las imágenes fue expuesta a nanopartículas de magnetita o a exceso de hierro.

De acuerdo a los resultados, a 100 mg/L como 250 mg/L de nanopartículas en medio de cultivo no se ven alteraciones visibles en la morfología de las moscas, como se presenta en la Figura 3.21.



Figura 3.21. Mosca *Drosophila melanogaster* expuesta a 100 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento

A concentraciones de 500 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ se encontraron individuos que presentan tumores debido a la bioacumulación de hierro como se observa en la Figura 3.22.

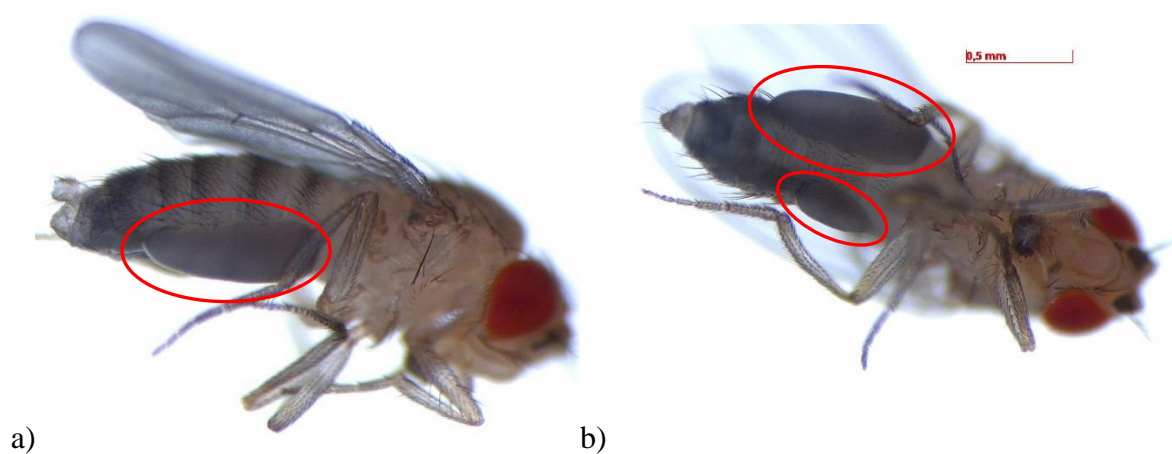


Figura 3.22. Moscas *Drosophila melanogaster* expuestas 500 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento: a) vista lateral, b) vista ventral

En los puntos 3.5 y 3.6 se observó que a la concentración de 500 mg/L en la F1 no se encontró bioacumulación ni alteraciones significativas de la descendencia, pero en las generaciones F2 y F3 fuera de este estudio, se evidencio que la alta presencia de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ produce que en los individuos se desarrollen tumores, por lo que es evidente que existe una interacción entre las moscas y las nanopartículas de magnetita, así no exista bioacumulación.

Al trabajar a concentraciones de 1000 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, la cantidad de hierro biacumulado es mayor, por lo cual se puede presumir que el daño de las nanoestructuras a los organismo aumenta de manera significativa. En la Figura 3.23 y 3.24 se presentan tanto larvas como las moscas adultas expuestas a 1000 mg/L de nanopartículas en el medio de cultivo.



Figura 3.23. Moscas *Drosophila* analizadas: a) Larva de mosca *Drosophila melanogaster* F3 usadas como blanco, b) Larva de mosca *Drosophila melanogaster* nacida en medio de cultivo con concentración de 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita

El literal a de la Figura 3.25 corresponde a una larva de mosca *Drosophila melanogaster* que no ha estado en contacto con las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, se puede observar que su estructura interna es clara y la larva es ligeramente transparente. En el apartado b de la Figura 3.25 se muestra una larva de mosca *Drosophila melanogaster* nacida en un medio de cultivo con concentración de 1000 mg/L de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, se observa que todas las estructuras del individuo se oscurecieron notablemente debido a la bioacumulación de un exceso de hierro, por esta razón la transparencia de la larva disminuyó enormemente.

La estructura de la larva de F3 presentada en la Figura 3.25 b es alarmante y en la mosca adulta presenta enormes malformaciones, como se presenta en la Figura 3.24.



Figura 3.24. Mosca *Drosophila melanogaster* nacida en medio de cultivo con 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita

Verificando la morfología de las moscas, se puede indicar que la presencia de las $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ a 1000 mg/L produjo anomalías morfológicas desde el estadio de larva y que se evidenció de manera muy claramente en la mosca adulto, donde se puede observar la falta de una ala, fenómeno correspondiente al daño que reside en el cromosoma 2 de las moscas [29]. Sin embargo, es necesario realizar un estudio genético para confirmar que se trate de un efecto somático o mutagénico.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Utilizando la síntesis de nanopartículas de magnetita por coprecipitación química, se logró obtener nanoestructuras de hierro con un tamaño promedio de 10 nm. Además, el cambio del reductor de hidróxido de sodio a amoníaco permitió una funcionalización exitosa de las nanopartículas con quitosano, lo cual se comprobó satisfactoriamente con el espectro FT-IR, mismo que presentó las bandas correspondientes a los puentes de hidrógeno (1170 cm^{-1}), a las vibraciones de los enlaces N-H y O-H ($3750\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$) y del anillo sacárido del quitosano (820 cm^{-1}). El pico de la estructura nanométrica de magnetita se presentó a los 520 cm^{-1} , propio de la vibración del enlace entre el oxígeno y el hierro. Por otro lado, se obtuvieron rendimientos de reacción mayores al 90 % para las nanopartículas con y sin recubrimiento de quitosano.
- Al exponer a moscas jóvenes a concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento, se observó una alteración significativa en la fertilidad de las moscas, provocando un aumento en la cantidad de descendencia comparada con los individuos usados como blanco. Las moscas *Drosophila melanogaster* expuestas a 100 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento, presentaron un aumento en el número de descendencia de 70 individuos a 1193, con

250 mg/L de nanopartículas nacieron 1551 imagos y a 1000 mg/L se obtuvieron 1350 moscas.

- La bioacumulación de hierro analizada en la primera generación F1 de moscas *Drosophila melanogaster* nacida en el medio de cultivo con nanopartículas de magnetita, aumentó de manera proporcional con la concentración. Las moscas expuestas a 100 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento presentaron una bioacumulación de 6,6 mg de hierro por kg de moscas, a 250 mg/L de 21.4 mg/kg y a 1000 mg/L de 39.5 mg/kg respectivamente. A concentraciones de 500 mg/L de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento en medio de cultivo, se obtuvieron resultados incongruentes con la tendencia seguida por las demás concentraciones, ya que las moscas nacidas bajo este parámetro, no biacumularon hierro y la cantidad de individuos fue muy cercana a la población patrón, debido a que es la concentración ideal de asimilación del metal.
- Las moscas expuestas a nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano, presentaron un sobrefertilidad igual que las nanoestructuras sin recubrimiento, pero el número de individuos fue menor y se presentaron cantidades constantes en todas las concentraciones. A 100 mg/L se obtuvieron 1099 moscas, a 250 mg/L nacieron 1195 individuos, a 500 mg/L emergieron 1222 moscas adultas y a 1000 mg/L de Fe₃O₄NPs se contaron 1147 imagos. Se logró demostrar que el quitosano evita que el hierro afecte en gran medida a las moscas. De la misma forma, la bioacumulación de hierro disminuyó y se mantuvo relativamente constante para todas las concentraciones estudiadas, encontrándose en un rango entre 8.8 a 25.8 mg de hierro por kg de moscas,

concluyendo de esta manera, que al funcionalizar las nanopartículas de magnetita se logró evitar su interacción directa con el organismo vivo facilitando su excreción.

- Se analizó la morfología de las moscas *Drosophila melanogaster* de la F1 con los especímenes de la F2 y F3 de cada concentración utilizando nanopartículas de magnetita sin recubrimiento y se evidenció que a altas concentraciones se producen alteraciones en las moscas, presentando tumores y morfología alterada en especial a concentraciones de 500 y 1000 mg/L de nanopartículas de magnetita.
- Finalmente se concluye que el trabajo fue realizado, cumplió con parámetros internacionales de calidad, debido a que se publicó en el *Journal of Nanotechnology & Biomedicine* de diciembre del 2014.

4.2. RECOMENDACIONES

Tomando como base los resultados expuestos en este trabajo, quedan abiertas las puertas para la investigación del daño genético en las moscas de las generaciones F2 y F3, además se podría centrar un estudio específico a la concentración de 500 mg/L de nanopartículas, en donde se observó un comportamiento peculiar tanto en el ámbito de la fertilidad como en la bioacumulación..

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rosell, M., (2008), Riesgos asociados a la nanotecnología, <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/786a820/797%20web.pdf>, 8 de enero del 2015.
- [2] Gutiérrez, C., (2010). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicación tienen?, *El ININ hoy*, volumen 4, pp. 24-29.
- [3] Ramos, M. y Castillo, C., (2011). Aplicaciones biomédicas de nanopartículas magnéticas, *Ide@s CONCYTEG*, volumen 6, pp. 629-646
- [4] Luna, M., (2011) ¿Por qué el oro es rojo, verde y azul?, <http://www.elmundo.es/elmundo/2011/06/24/nanotecnologia/1308903941.html>, 7 de julio del 2014.
- [5] Elechiguerra, J., Burt, J., Morones, J., Camacho, A., Gao, X., Lara, H. y Yacaman, M., (2005), Interaction of silver nanoparticles with HIV-1, *Journal of Nanobiotechnology*, volumen 3:6, pp. 10-20.
- [6] Simbolo calidad Blog (2012), Investigación de la posición de nanopartículas CORE-SHELL mediante campos magnéticos – NANOMAGNET, <http://www.simbolocalidad.com/blog/investigacion-de-la-posicion-de-nanoparticulas-core-shell-mediante-campos-magneticos-nanomagnet>, 7 de julio del 2014
- [7] Akbarsadeh, A., Samiei, M. y Davara, S., (2012), Magnetic Nanoparticles: preparation, physical properties, and application in biomedicine, *Nanoparticle Res Lett*, volumen 7, pp. 144-157.

- [8] Feira, T., (2012), Esmaltes y Nanotecnología: Productos cosméticos innovadores, <http://entendendocosmetologia.blogspot.com/>, 16 de agosto del 2014.
- [9] Grande, A., (2007), Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: La física actual en lucha contra la enfermedad, *Revista de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, volumen 101, pp. 321-327.
- [10] Nanomag (s/a), Magnetic nanoparticles, <http://www.nanomag-project.eu/magnetic-nanoparticles.html>, 16 de agosto del 2014
- [11] García, S., (2012), *Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas*, Disertación de Doctorado en Biotecnología, Universidad de Barcelona, España, pp. 3-18.
- [12] Cruz, D., Rodríguez, M., López, J., Herrera, V., Orive, A. y Creus, A., (2011), Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: una relación profunda, *Avances de la ciencia e ingeniería*, volumen 3, pp. 67-78.
- [13] Wei, W., Quanguo, H., Changzhong, J., (2008), Magnetic iron oxide nanoparticle: Synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res Lett*, volumen 3, pp. 397-415.
- [14] Universidad de Vigo, (2011), Magnetismo, http://webs.uvigo.es/quintans/recursos/Web_electromagnetismo/magnetismo_materiales.htm#ini, 17 de septiembre del 2014.
- [15] Poole, C. y Owens, F., (2003), *Introduction of Nanotechnology*, Jonh Wiley & Sons Inc., Estados Unidos de América, pp. 165-193
- [16] De Toro, J., (2001), *Propiedades magnéticas tipo vidrio de espín en materiales aleados mecánicamente*, Disertación de Doctorado en Física Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, España, pp. 15-23.

- [17] Benz, M., (2012), Superparamagnetism: Theory and applications, http://www.microstructure.ethz.ch/FILE/1302_Superparamagnetism_ManuelBenz.pdf, 18 de septiembre del 2014
- [18] D'Onofrio, L., (2011), Magnetismo en Nanosistemas, <http://www.redvnano.org/enano2011/contenido/Donofrio1.pdf>, 18 de septiembre del 2014
- [19] Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C., Bengele, H. y Josephson, L., (1990), Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrasts agents for MR imaging, *Radiology*, volumen 175, pp.489-493
- [20] Arias, J., López, M. y Ruiz, M., (2008), Partículas superparamagnéticas ultrapequeñas de óxido de hierro para aplicaciones biomédicas, *Ash Pharm*, volumen 49, pp. 101-111
- [21] Sanchez, J., Matínez, J., Segura, E., Contreras, J., Medina, M. y Aguilar, C., (2014), Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas, *Química Nova*, volumen 37, pp. 504-512
- [22] Minuesa, S., (2010), *Síntesis de nanopartículas de ferritas tipo MFe_2O_4 ($M=Fe, Co, Cu$) para su aplicación en superconductores*, Disertación de Maestría en Ciencias y Tecnología Química, Universidad Autónoma de Barcelona, pp. 55-59.
- [23] Soheila, H., Pouneh, E., Hossein, A. y Mahsa, A., (2013), Optimization of preparation of chitosan-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications by chemometrics approaches, *International Nano Letters*, volumen 3, pp. 1-5.
- [24] Ahmed, L., (2014), *Toxicity studies of polymer based superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, Disertación de Doctorado en Física de la materia condensada, Universidad de Zaragoza, España.

- [25] Hong, S., Chang, Y. y Rhee, I., (2009), Chitosan-coated Ferrite (Fe₃O₄) nanoparticles as a T₂ Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging, *Journal of the Korean Physical Society*, volumen 56, fascículo 3, pp. 868-873.
- [26] Quenting, J., (2013), The Evolution of Detoxification Genes, <http://www.genetics.unimelb.edu.au/research/robin/index.html>, 22 de noviembre del 2014.
- [27] Rinaudo, M., (2006), Chitin and Chitosan: Properties and applications, *Progress in Polymer Science*, volumen 31, pp. 603-632.
- [28] Gozde, U., Serap, Y., Rouhollah, K., Gungor, G. y Ufuk, G., (2012), Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications, *Journal of Nanoparticles Research*, volumen 14, pp. 1-13.
- [29] Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. y Heras, A., (2009), Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology*, volumen 3, pp. 203-230.
- [30] Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., Stepnowski, S., (2010), Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan, *Marine Drugs*, volumen 8, pp. 1567-1636.
- [31] Amorrós, M., (2001), *Estudio de mutaciones en el cromosoma III de Drosophila melanogaster: el gen ash-2 como regulador de diferenciación celular*, Disertación de Doctorado en Biología, Universidad de Barcelona, España, pp. 7-10.
- [32] Prud'homme, B., (s/a), Vista dorsal y lateral de un macho y una hembra *Drosophila melanogaster*, <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/mosca.html>, 22 de noviembre del 2014.

- [33] Flymove, (s/a), Life Cycle, http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life_cycle.jpg, 1 de diciembre del 2014.
- [34] González, B., Kass, C., Martínez, E. y Puentes, J., (2007), Efecto de la densidad poblacional en la supervivencia en la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophiladae), <http://www.fcnym.unlp.edu.ar/catedras/ecopoblaciones/TP/Proyecto%202007%20Efecto%20de%20la%20densidad.%20Gonzalez%20et%20al.pdf>, 20 de noviembre del 2014.
- [35] Lemus, J., (2007), Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueletos de camarón, http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_07_QUI01.pdf, 3 de febrero del 2014
- [36] Tresilwised, N., Pithayanuku, P. y Plank, C., (2005), Factors affecting sizes magnetic particles formed by chemical co-precipitation, *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, volume 32, pp. 71-76
- [37] Trujillo, W., (2013), *Preparación y caracterización de nanopartículas de magnetita funcionalizados con ácido láurico, oleico y etilendiamino tetraacético para aplicaciones biomédicas y remediación ambiental*, Disertación de Licenciatura en Física, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, pp. 9-21.
- [38] Dozier, D., Palchoudhury, S. y Bao, Y. (2010), Synthesis of iron oxide nanoparticles with biological coatings, *The University of Alabama Research*, volume , pp. 16-18.
- [39] Gregorio-Jauregui, K., Pineda, M., Rivera, J., Hurtado, G., Saade, H., Martínez, J., Ilyina, A. y López, R. (2012), One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan, *Journal of Nanomaterials*, volumen 2012, pp. 1-9.

- [40] Montalvo, C., (2010), Microscopía, http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf, 6 de diciembre del 2014.
- [41] Universidad Nacional de Córdoba, (s/a), Microscopia electrónica, <http://agro.unc.edu.ar/~fito/teoricos/MICROSCOPIA%20ELECTRONICA.htm>, 6 de diciembre del 2014.
- [42] Universidad Autónoma de Madrid, (2010), Microscopia electrónica TEM y SEM, <http://ceramicayvidrio.revistas.csic.es/index.php/ceramicayvidrio/article/viewFile/540/560>, 6 de diciembre del 2014.
- [43] Universidad Andrés Bello, (s/a), Microscopia electrónica de barrido con detector EDS, <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>, 6 de diciembre del 2014.
- [44] Universidad Carlos III, (2008), Fundamentos de la caracterización de materiales Microscopia de Transmisión electrónica, http://ocw.uc3m.es/ciencia-e-oin/caracterizacion-de-materiales/material-de-clase-1/Unidad_4_Tema_TEM.pdf, 6 de diciembre del 2014.
- [45] Naik, A., (s/a), Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la industria textil, <https://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6074/1/Article03.pdf>, 6 de diciembre del 2014.
- [46] Skoog, A., Holler, J., Nieman, T., (2001), *Principios del Análisis Instrumental*, Quinta edición, McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid-España, pp. .
- [47] Universidad de Granada, (s/a), Espectrofotometría Infrarroja de Transformadas de Fourier. Estudio del Espectro de Vibración-Rotación del HCl y DCl,

<http://www.ugr.es/~proyecto08173/qbiofisica/PRACTICAS%20DE%20LABORATORIO/Practica%20de%20espectroscopia%20infrarroja.pdf>, 6 de diciembre del 2014.

- [48] Prada, R., (2012), Algunas consideraciones éticas sobre la investigación con animales (II), <http://www.hablandodeciencia.com/articulos/2012/12/10/algunas-consideraciones-eticas-sobre-la-investigacion-con-animales-ii/>, 1 de diciembre del 2014.
- [49] Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C) (2002), *Determination of lead, cadmium, copper, iron and zinc in foods*, Estados Unidos de América.
- [50] Wei, W., Quanguo, H., Changzhong, J., (2008), Magnetic iron oxide nanoparticle: Synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res Lett*, volumen 3, pp. 397-415.
- [51] Bacon, R., (s/a), Determinación de hierro al estado óxido férrico, <http://www.calidoscopio.com/calidoscopio/ecologia/quimica/analit2.pdf>, 8 de marzo del 2015.
- [52] Brugnerottoa, J., Lizardib, J., Goycooleab, F., ArguÈelles-Monalc W., DesbrieÁresa, J., Rinaudoa, M., (2001), An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, volumen 42, pp. 3569-3580.
- [53] Anicuta, S., Dobre, L., Stroescu, M., Jipa, I., (2010), Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy For Characterization Of Antimicrobial Films Containing Chitosan, *Analele UniversităŃii din Oradea Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie si Tehnologii de Industrie Alimentarã*, pp. 1234-1240.
- [54] Coto, C., (2011), Las curvas de calibración, <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/calibracion/calibracion.htm>, 24 de enero del 2015.

[55] Miller, J., Miller, J., (2002), *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, cuarta edición, Pearson Educación S.A., Madrid-España, pp. 111-152.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1: CÁLCULO DE CONCENTRACIONES DE HIERRO EN MUESTRAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA

Para el cálculo de concentraciones de hierro en la muestra se debe considerar que la concentración neta del hierro en la muestra es la suma del blanco más la cantidad de hierro bioacumulada o colocada.

1.1. CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE HIERRO EN BLANCOS DE MOSCAS

Drosophila melanogaster

Tomando una de las muestras como ejemplo de los cálculos de concentración de hierro, se tiene lo siguiente:

Se pesaron 0,3179 g de moscas utilizadas como blanco, se calcinó durante 12 horas a 450 °C. Las cenizas fueron tratadas durante una hora con HNO₃ 0,1 N, filtradas y aforadas con el mismo ácido a un volumen de 25 mL, obteniendo una absorbancia de 0,1620 mg/L.

$$P_{muestra} = 0,3179 \text{ g}$$

$$V_{aforo} = 25 \text{ mL}$$

$$Absorbancia = 0,1620 \text{ mg/L}$$

0,162 mg Fe	1000 mL solución
0,0162 mg Fe	100 mL solución
0,0162 mg Fe	0,3179 g muestra
50,96 mg Fe	1000 g muestra

El valor de hierro obtenido de muestra de mosca es de 50,96 mg de Fe/kg de moscas.

1.2. CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN MUESTRAS DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Si se toma como ejemplo a una muestra de moscas expuestas a 250 mg/L de nanopartículas de magnetita, se obtuvieron los siguientes datos:

$$P_{muestra} = 0,4759 \text{ g}$$

$$V_{aforo} = 50 \text{ mL}$$

$$Absorbancia = 0,672 \text{ mg/L}$$

$$Conc. \overline{X}_{Fe} \text{ blancos} = 49,55 \text{ mg/L}$$

0,672 mg Fe	1000 mL solución
0,0336 mg Fe	50 mL solución
49,55 mg Fe	1000 g moscas
0,0236 mg Fe	0,4759 g moscas
0,0336 -	0,0236 = 0,010019
0,01 mg Fe	0,4759 g muestra
21,05 mg Fe	1000 g muestra

Siendo la concentración de hierro en la muestra de 21,05 mg de Fe/kg de moscas.

ANEXO 2

ANEXO 2: ACONDICIONAMIENTO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DE LLAMA

Se realizaron varios ensayos para el aseguramiento de los resultados de hierro obtenidos:

- Curvas de calibración
- Regresión lineal de las curvas de calibración, linealidad y límites de confianza
- Determinación del límite de detección y cuantificación
- Fortificaciones aplicando únicamente estándar.

2.1. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Una curva de calibración es la representación gráfica de las señales que se miden en función de la concentración de estándares preparados de un analito y sirve para conocer la concentración del elemento en una muestra [54].

Para las curvas de calibración se empleó una solución certificada de 1000 mg/L de hierro marca LABEQUIM. Se prepararon 50 mL de cada solución estándar para ser utilizados en las curvas de calibración y se almacenaron en frascos de plásticos nuevos y herméticos para evitar la degradación de las soluciones.

Se trabajó con dos curvas de calibración. La primera, cubre el rango bajo de las concentraciones de hierro que se encontraba compuesta por cinco concentraciones: 0,125mg/L, 0,500 mg/L, 0,750 mg/L, 1,000 mg/L y 1,500 mg/L. La segunda curva utilizada fue de alto rango, se conformó por cinco puntos de concentración: 1,000 mg/L, 2,000 mg/L, 3,000 mg/L, 4,000 mg/L y 5,000 mg/L. Ambas, permitieron mayor flexibilidad al momento de preparar las muestras, considerando que la cantidad de materia muestral era limitada.

2.2. REGRESIÓN LINEAL DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN, LINEALIDAD Y LÍMITES DE CONFIANZA

Para el análisis estadístico de las curvas de calibración utilizadas se siguieron los métodos descrito en el texto *“Estadística y Quimiometría para Química Analítica”* en donde la regresión lineal de las curvas de calibración se realiza a base de los datos obtenidos de las lecturas en el equipo de Absorción Atómica y, en cadena, se calcula los datos para encontrar el error estadístico y los límites de confianza de las rectas, lo que permite determinar su linealidad [55].

Para encontrar la correlación lineal de la curva se utiliza la siguiente ecuación:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{[\sum(x_i - \bar{x})^2 \times \sum(y_i - \bar{y})^2]^{1/2}} \quad (1)$$

Donde, X_i son los datos reportados en la ordenada, \bar{x} es el valor medio de las mediciones en x , y_i es el valor de los datos en la abscisa y \bar{y} el valor promedio de y .

Por otro lado, sabiendo que la ecuación general de la recta es $y = bx + a$, se puede calcular el valor de b y a para los valores de la curva de calibración utilizando las ecuaciones que se presentan a continuación:

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

$$a = \bar{y} - (b \times \bar{x})$$

Donde a es el valor correspondiente al punto donde $x=0$ y la recta corta con la abscisa. El valor de b corresponde a la pendiente de la recta.

Para encontrar el error estándar se va a utilizar la siguiente ecuación:

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (3)$$

En donde \hat{y} es la señal teórica calculada utilizando la ecuación de la recta encontrada empleando los datos obtenidos de la curva de calibración y n es el número de estándares leído para la creación de la curva de calibración.

El error Y/X o error estándar permite encontrar los valores de la desviación para la pendiente (b) y el intercepto (a) utilizando la siguiente ecuación:

$$Sa = S_{Y/X} \times \sqrt{\frac{x^2}{n \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

$$Sb = \frac{S_{Y/X}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde Sa corresponde al valor de la desviación en la abscisa y Sb es el valor del error en la pendiente.

Utilizando el valor de a y b encontrados anteriormente, conjuntamente con los datos de Sa y Sb se pueden calcular los límites de confianza de la pendiente y del intercepto de las curvas sabiendo que:

$$LCI = a \pm (Sa \times T) \quad (5)$$

$$LCP = b \pm (Sb \times T)$$

En donde LCI quiere decir límite de confianza del intercepto y LCP límite de confianza de la pendiente. Por otro lado, T se refiere al valor tabulado para la distribución T Student a $n - 1$ grados de libertad y 95% de confianza a dos colas.

Para esta investigación se utilizaron dos curvas de calibración del mismo analito, aun así, todos los tratamientos estadísticos utilizados deben ser realizados por separados para cada

curva. En la Tabla A2.1, se presentan los valores de absorbancia y concentración de cada curva, los cuales fueron utilizados para encontrar la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación a través de cálculos de regresión lineal.

Tabla A2.1. Coeficientes de correlación y ecuaciones de la recta de las curvas de calibración de hierro

<i>Curva de Calibración de Bajo</i>		<i>Curva de Calibración de Alto Rango</i>	
<i>Rango</i>			
<i>Concentración</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>Concentración</i>	<i>Absorbancia</i>
<i>(mg/L)</i>	<i>AA.</i>	<i>(mg/L)</i>	<i>AA.</i>
0,000	-0,023	0,000	-0,142
0,125	0,122	1,000	1,035
0,250	0,257	2,000	2,111
0,500	0,525	3,000	3,114
1,000	1,008	4,000	4,012
1,500	1,485	5,000	4,871
Σ	3,375	Σ	15
\bar{x}	0,563	\bar{x}	2,5
$r=$	0,9996	$r=$	0,9982
$r^2=$	0,9991	$r^2=$	0,9964
$b =$	1,0000	$b =$	1,0000
$a =$	-0,0001	$a =$	0,0002
$y = 1.0000x - 0.0001$		$y = 1.0000x + 0.0002$	

Tanto para la curva de alto rango como para la de bajo rango se obtuvieron coeficientes de correlación muy cercanos a 1, indicando que existe una tendencia lineal muy marcada. En

la Figura A2.1 se representan las curvas de calibración de alto y bajo rango de hierro, y se observa claramente la tendencia lineal de ambas curvas.

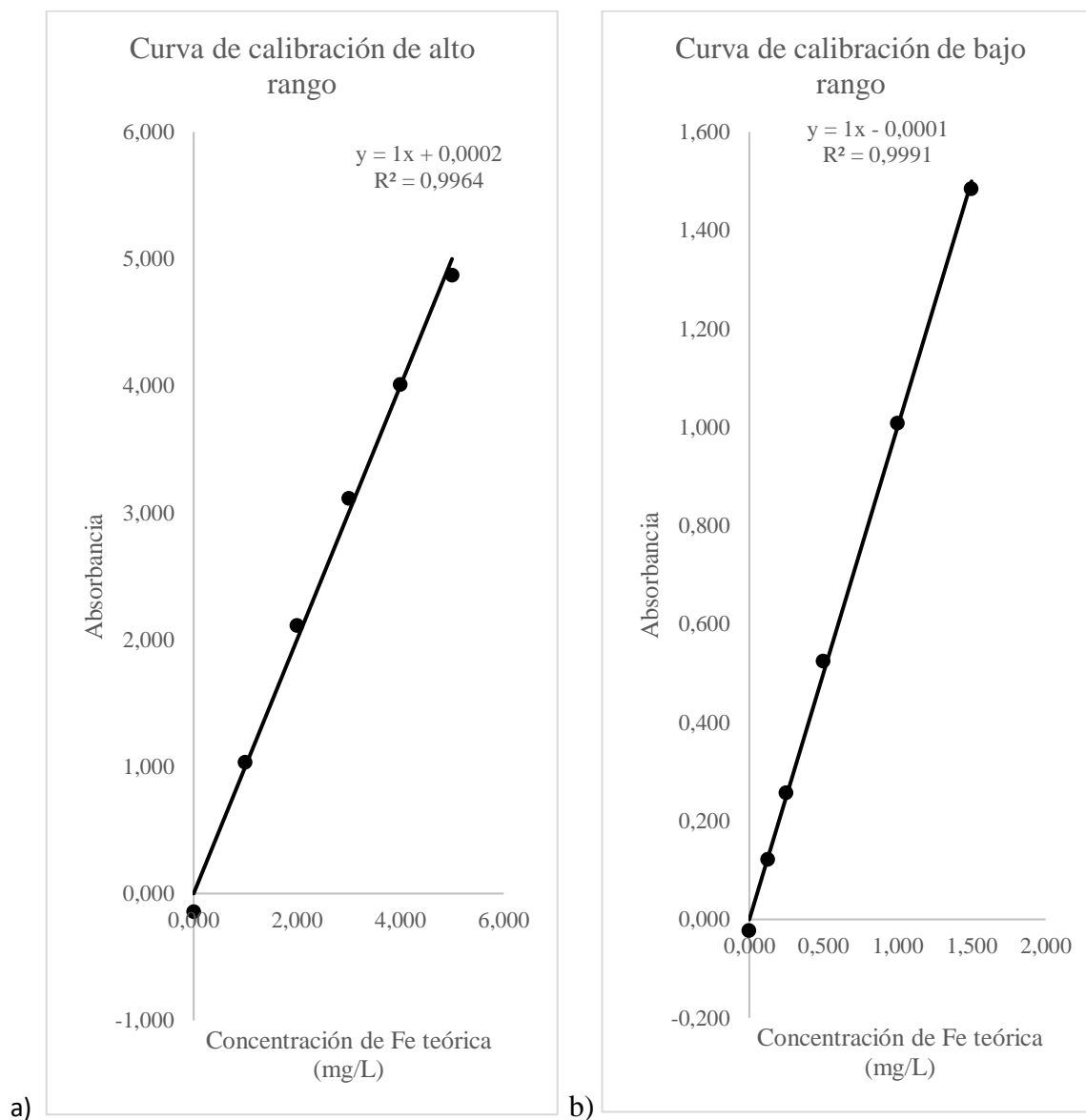


Figura A2.1. Curvas de calibración de hierro: a) alto rango, b) bajo rango

Las ecuaciones de la recta obtenidas para ambas curvas indican una linealidad casi sin desviaciones, pero es necesario encontrar los límites de confianza para poder asegurar los resultados obtenidos.

Tabla A2.2. Límites de confianza del intercepto y la pendiente de las curvas de calibración de hierro de alto y bajo rango

		<i>Alto</i>	<i>Bajo</i>
		<i>Rango</i>	<i>Rango</i>
<i>Desviación de y sobre x (S y/x)</i>		0,1260	0,0194
<i>Desviación del intercepto (Sa)</i>		0,0912	0,0115
<i>Desviación de la pendiente (Sb)</i>		0,0738	0,0149
<i>Límites de confianza del intercepto (LCI)</i>	<i>Superior (LCIS)</i>	0,2346	0,0295
	<i>Inferior (LCII)</i>	-0,2341	-0,0298
<i>Límites de confianza de la pendiente (LCP)</i>	<i>Superior (LCPS)</i>	1,1896	1,0384
	<i>Inferior (LCPI)</i>	0,8104	0,9616

Para graficar los límites de confianza de la curva de calibración es necesario el error en la pendiente y en el intercepto por punto, teniendo como resultado final dos rectas paralelas a la curva de calibración que demuestran los límites en los cuales pueden estar ubicados los puntos, tomando en cuenta la incertidumbre al realizar la regresión lineal para los cálculos.

Si en la ecuación general de la recta se intercambia b por el LCP y a por LCI se obtienen las siguientes ecuaciones:

- Límite de confianza superior: $y = LCPSx + LCIS$
- Límite de confianza inferior: $y = LCPIx + LCII$

Con lo cual se puede calcular el límite superior e inferior por punto, utilizando como X el valor de la concentración teórica del estándar. En la Tabla A2.3, se encuentran tabulados los datos correspondientes a los límites superiores e inferiores de cada curva.

Tabla A2.3. Límites de confianza superiores e inferiores para cada punto de las curvas de calibración de hierro

<i>Alto Rango</i>			<i>Bajo Rango</i>		
<i>Concentración</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>	<i>Concentración</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>teórica (mg/L)</i>	<i>Superior</i>	<i>Inferior</i>	<i>teórica (mg/L)</i>	<i>Superior</i>	<i>Inferior</i>
0,000	0,235	-0,234	0,000	0,030	-0,030
1,000	1,424	0,576	0,125	0,159	0,090
2,000	2,614	1,387	0,250	0,289	0,211
3,000	3,803	2,197	0,500	0,549	0,451
4,000	4,993	3,007	1,000	1,068	0,932
5,000	6,182	3,818	1,500	1,587	1,413

Tomando los datos expuestos en la Tabla A2.3, se obtienen los gráficos de la Figura A2.2 en donde se puede observar claramente que la tendencia lineal se mantiene a lo largo de los

dos rangos y que a medida que la concentración de los estándares aumenta las desviaciones de los puntos es mayor.

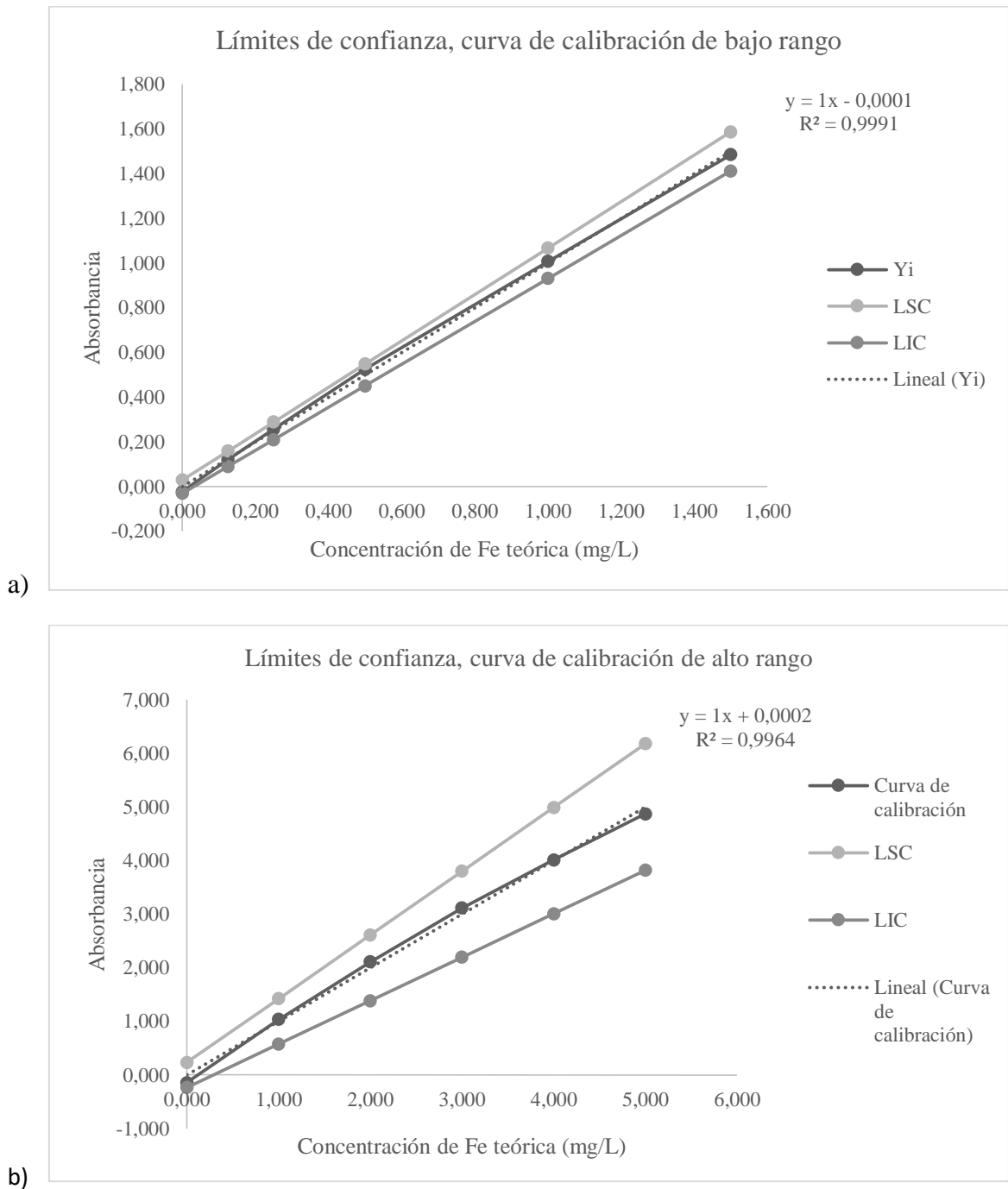


Figura A2.2. Límites de confianza de las curvas de calibración de hierro

Si se observa cuidadosamente el literal b de la Figura A2.2, los límites de confianza de la curva de calibración de hierro de alto rango, no presentan una confianza aceptable, en especial desde 3,000 a 5,000 mg/L de hierro. Por esta razón, la curva de alto rango fue utilizada únicamente para la lectura de medios de cultivo, cuando se hizo imposible realizar una dilución por falta de muestra, pero los resultados obtenidos se encontraban comprendidos entre 1 a 2 mg/L de hierro, por lo cual se consideraron aceptables para el estudio.

2.3. DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (Limit of Detection, LOD) se refiere a la menor señal del analito que el equipo puede identificar sin confundirse con la señal del blanco, mientras que el límite de cuantificación (Limit of Quantification, LOQ) es la señal más débil que el equipo puede cuantificar asegurando la concentración dada [55].

Tanto para los límites de detección como para los de cuantificación se siguió el método del AOAC 999.11, tratando capsulas vacías como blancos. Se realizaron seis mediciones de blancos por curva de calibración, teniendo en total doce valores de blancos con los cuales trabajar.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos y los cálculos de los límites de detección y cuantificación de las curvas utilizadas se siguió el método descrito en el texto

“*Estadística y Quimiometría para Química Analítica*” en donde el cálculo de los límites de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y límites de cuantificación (LOQ, por las iniciales en inglés) se basa en las mediciones de las curvas de calibración y en especial de los valores obtenidos de la muestra con concentración de 0 ppm del metal.

El límite de detección se define como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la del blanco, simbolizado como Y_B , más tres desviaciones estándar del blanco (S_B), mientras que el límite de cuantificación se considera aceptable tener la señal del blanco más 6 desviaciones estándar del mismo [55]. En la ecuación 6 se presenta la ecuación para calcular el LOD Y el LDQ.

$$LOD = Y_B + 3S_B \quad (6)$$

$$LOQ = Y_B + 10S_B$$

Para este estudio se realizaron 12 mediciones de blancos, 6 para la curva de alto rango y 6 para la de bajo rango, obteniendo los resultados tabulados en la Tabla A2.4.

Tabla A2.4. Mediciones de blancos de hierro

<i>Mediciones</i>	<i>Curva de bajo rango</i>	<i>Curva de alto rango</i>
1	-0,007	-0,124
2	-0,021	-0,015
3	-0,023	-0,065
4	-0,028	-0,091
5	-0,032	-0,085
6	-0,034	-0,098
Σ	-0,145	-0,478
\bar{X}	-0,024	-0,079
S_B	0,009	0,037
LOD	0,005	0,031
LOQ	0,035	0,143

Como se observa en la Tabla A2.4 se pueden asegurar valores mínimos de lectura son 0.035 mg/L en el caso de la curva de bajo rango y 0.143 mg/L en la curva de alto rango.

2.4. FORTIFICACIONES DE MUESTRAS

Una muestra fortificada es aquellas en la cual se colocan concentraciones conocidas de analito, en este caso hierro y se utilizan para determinar la recuperación del método.

Se realizaron 4 fortificaciones de hierro en matriz de moscas con las siguientes concentraciones: 18,5 mg/L, 20,0 mg/L, 45,0 mg/L y 60,0 mg/L. Las soluciones estándar colocadas en las muestras fueron preparadas a partir de una solución estándar certificada de 1000 mg/L de hierro marca LABEQUIM.

Se pesaron aproximadamente 0.2 – 0.3 g de moscas *Drosophila melanogaster* usadas como blanco, sin nanopartículas. Se colocó 1 mL de cada una de las soluciones de hierro sobre la cantidad de moscas pesadas y se evaporó con la ayuda de una plancha de calentamiento el líquido restante cuidando que no entre en ebullición. Las muestras se sometieron a 8 horas de calcinación a una temperatura de 450°C en una mufla marca Comecta. Las cenizas se trataron durante 1 hora con 10 mL de ácido nítrico 0,1 N y se aforó a 50 mL con el mismo ácido para ser leídas por Absorción Atómica de Llama en el equipo AAnalyst 400.

Cada una de las concentraciones trabajadas se realizó el análisis por duplicado, a excepción de la concentración más baja de 18,5 mg/L que únicamente se realizó una muestra.

Se intentó realizar las fortificaciones sin el uso de una matriz, pero se obtuvieron porcentajes de recuperación bajos debido a que el hierro se adhería a las paredes del crisol, por consiguiente se trabajó con blancos de las propias moscas para obtener el contenido de hierro por comparación a aquellas que fueron expuestas a Fe₃O₄NPs.

Tabla A.2.5. Recuperación de Fe en moscas *Drosophila melanogaster*

<i>Concentración de Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. Fe recuperada (mg/L)</i>	<i>Rendimiento de recuperación (%)</i>	\bar{X}	σ
18,5	20,3	109,6	18,5	-
20	32,9	164,7	161,18	5,00
	31,5	157,6		
45	40,4	89,8	92,75	4,16
	43,1	95,7		
60	57,7	96,2	95,20	1,46
	56,5	94,1		

Para que un método de recuperación pueda ser considerado aceptable, los límites de recuperación deben estar comprendidos entre el 95% al 105 %, y como se puede observar en la Tabla A2.5, las recuperaciones obtenidas se encuentran fuera de los rangos aceptables, pero aún cerca de los datos requeridos, tomando en cuenta las pérdidas de

hierro por adherencia a las paredes del crisol y la variabilidad de la concentración de hierro en las moscas debido a su almacenamiento.

Cuando se realizaron fortificaciones de bajas concentraciones (18.5 y 20 mg/L de Fe) se obtuvo una recuperación mayor al 105% debido a que la concentración de hierro en las moscas no siempre es homogénea y muchas veces depende de las condiciones en las cuales fueron almacenadas, alterando la cantidad de hierro recuperado. Este fenómeno permite concluir que el método funciona para recuperaciones de hierro en concentraciones mayores a 20 mg/L.

ANEXO 3

ANEXO 3: TABLA GENERAL DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE EL ESTUDIO

Tabla A3.1. Tabla general de concentraciones de hierro en blancos, medios de cultivo, moscas *Drosophila melanogaster* y fortificaciones con y sin matriz

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
27/03/2014	Moscas	NP1	X	0	0,2565	X	100	X	0,1230	47,9532
		NP2	X	0	0,3179	X	100	X	0,1620	50,9594
		NP3	X	0	0,2598	X	100	X	0,1200	46,1894
		NP4	X	0	0,3090	X	100	X	0,1540	49,8382
07/05/2014	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs	NP1	X	0	0,1996	X	25	X	0,4170	52,2295
		NP2	X		0,1974	X	50	X	0,2190	55,4711
		NP3	X	100	0,2489	X	50	X	0,4400	38,8349
		NP4	X		0,2909	X	25	X	0,9160	29,1672

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>	
07/05/2014	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs	NP5	X	500	0,3007	X	25	X	0,5980	0,1633	
		B1	X		0,3298	X	25	X	0,4570	14,9118	
	Blancos	BL1	X	X	0	X	25	X	<LC	<LC	
		BL2	X	X	0	X	25	X	<LC	<LC	
09/06/2014	Blancos	BL1	X	X	0	X	25	X	<LC	<LC	
		BL2	X	X	0	X	25	X	<LC	<LC	
	Medio de cultivo	NP6	X	0	3,0202	X	25	X	0,4060	3,3607	
		7	X		100	NO SE TOMAN EN CUENTA PORQUE SE REALIZARON REPETICIONES					
		NP7	X								
		NP2	X		250	3,1088	X	50	X	>LC	>LC
NP3	X		3,1641	X		50	X	>LC	>LC		
	B1	X	500	NO SE TOMAN EN CUENTA PORQUE SE REALIZARON REPETICIONES							

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
		NP1	X	500	NO SE TOMAN EN CUENTA PORQUE SE REALIZARON REPETICIONES					
09/06/2014	Medio de cultivo	B2	X	1000	3,1602	X	50	X	>LC	>LC
		NP5	X	0	3,1641	X	50	X	>LC	>LC
		NP2	X	250	2,1088	X	50	10	1,0470	248,2454
	Medio de cultivo	NP3	X		2,1806	X	50	10	0,9200	210,9511
		NP1	X	500	NO SE TOMAN EN CUENTA PORQUE SE REALIZARON REPETICIONES					
13/06/2014		NP5	X	1000	1,1641	X	50	10	2,1930	941,9294
		B2	X		1,1002	X	50	10	1,9110	868,4785
	Blancos	NP1BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0
		NP2BL	X	X	0	X	25	X	<0	<0
		NP3BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
13/06/2014	Blancos	NP5BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0
		NP6BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0
		NP9BL	X	X	0	X	25	X	<0	<0
		7BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0
		SN	X	X	0	X	25	X	<0	<0
	Blancos	BL1BL	X	X	0	X	50	X	<0	<0
13/06/2014		B1BL	X	X	0	X	25	X	<0	<0
		B2BL	X	X	0	X	25	X	<0	<0
		BL2BL	X	X	0	X	25	X	<0	<0
		NP1F	0	X	X	3	25	X	<LC	<LC
	Fortificaciones sin matriz	NP2F	0	X	X	3	25	X	<LC	<LC
		NP3F	100	X	X	3	25	X	<LC	<LC

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
13/06/2014	Fortificaciones sin matriz	NP9F	100	X	X	3	25	X	0,0050	0,0417
		NP5	250	X	X	3	25	X	0,0720	0,6000
		NP6	250	X	X	3	50	X	0,0060	0,1000
		7F	500	X	X	3	50	X	<LC	<LC
		SN F	500	X	X	3	50	X	<LC	<LC
		BL1F	1000	X	X	2,5	50	X	0,0200	0,3333
		BL2F	1000	X	X	3	50	X	<LC	<LC
		B1F	BLANCO	X	X	0	25	X		0,0000
		B2F	BLANCO	X	X	0	25	X	<0	<0
11/08/2014	Fortificaciones sin matriz	F1F1	100	X	X	10	25	X	0,0990	0,2475
		F3F1	100	X	X	10	25	X	0,1290	0,3225

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
11/08/2014	Fortificaciones sin matriz	B2F1	250	X	X	10	50	X	0,1120	0,5600
		NP5F1	250	X	X	10	50	X	0,1670	0,8350
		NP1F1	500	X	X	10	50	X	0,1590	0,7950
		BL1F1	500	X	X	10	50	X	0,1160	0,5800
		NP2F1	1000	X	X	10	50	X	0,2070	1,0350
		NP3F1	1000	X	X	10	50	X	0,2060	1,0300
18/08/2014	Fortificaciones con moscas	F1	18,5	X	0,2895	1	25	X	1,39	20,4041
		NP3	0	X	0,2719	0	25	X	0,502	46,1567
	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs	NP1M	X	100	0,3668	X	50	X	0,399	4,8353
NP5M		X	0,4856		X	50	X	0,57	9,1363	
F3M		X	250		0,4759	X	50	X	0,672	21,0490

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
18/08/2014	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs	NP2M	X	250	0,5647	X	50	X	0,814	22,5196
		BL1M	X	500	0,2026	X	50	X	0,184	-4,1444
		BL2M	X		0,2044	X	50	X	0,178	-6,0120
		F2M	X	1000	0,5289	X	50	X	0,967	41,8621
		NP6M	X		0,5935	X	50	X	1,039	37,9776
19/08/2014	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs-Ch	NP6	X	0	0,2006	X	25	X	0,407	50,7228
		NP1	X	100	0,2552	X	25	X	0,655	14,6113
		BL2	X		0,2598	X	25	X	0,61	9,1450
		F1	X	250	0,3687	X	50	X	0,434	9,3014
		NP3	X		0,3897	X	50	X	0,477	11,6469
		BL1	X	500	0,3317	X	50	X	0,397	10,2892

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
19/08/2014	Moscas Fe ₃ O ₄ NPs -Ch	A	X	500	0,3694	X	50	X	0,424	7,8363
		F3	X	1000	0,3323	X	50	X	0,451	18,3063
		NP2	X		0,3015	X	50	X	0,457	26,2337
10/09/2014	Medios de cultivo Fe ₃ O ₄ NPs - Ch	NP5	X	0	0,404	X	25	X	0,017	1,0520
		F1	X		0,4099	X	25	X	0,025	1,5248
		BL2	X	100	0,4173	X	50	10	0,104	124,6106
		NP2	X		0,4173	X	50	10	0,083	99,4488
		F3	X	250	0,3789	X	50	5	0,344	226,9728
		BL1	X		0,4789	X	50	10	0,22	229,6930
		A	X	500	0,4478	X	50	10	0,38	424,2966
		NP6	X		0,3859	X	50	10	0,327	423,6849

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
10/09/2014	Medios de cultivo Fe ₃ O ₄ NPs - Ch	NP1	X	1000	0,5439	X	50	25	0,418	960,6545
		NP9	X		0,5363	X	50	25	0,415	967,2758
29/09/2014	Medios de cultivo Fe ₃ O ₄ NPs-Ch	NP5	X	0	0,4038	X	25	X	0,024	1,4859
		F1	X		0,3995	X	25	X	0,026	1,6270
		BL2	X	100	0,4256	X	50	10	0,11	129,2293
		NP2	X		0,3569	X	50	5	0,18	126,0857
		F3	X	250	0,4056	X	50	10	0,184	226,8245
		BL1	X		0,3706	X	50	5	0,298	201,0254
		A	X	500	0,3915	X	50	10	0,327	417,6245
		NP5A	X		0,4356	X	50	5	0,736	422,4059
		NP1	X	1000	0,4796	X	50	25	0,371	966,9516

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
29/09/2014	Medios de cultivo Fe ₃ O ₄ NPs-Ch	NP9	X	1000	0,4996	X	50	25	0,388	970,7766
22/10/2014	Medio de cultivo	NP5	X	100	0,405	X	25	X	1,566	96,6667
		F3	X	100	0,3156	X	25	5	0,243	96,2452
		NP1	X	500	0,3695	X	50	10	0,364	492,5575
		BL2	X	500	0,335	X	50	10	0,334	498,5075
25/10/2014	Fortificaciones con moscas	NP5	20	X	0,2009	1	50	X	0,858	32,9446
		F3		X	0,2002	1	50	X	0,829	31,5293
		F1	45	X	0,2005	1	50	X	1,007	40,4144
		NP2		X	0,2005	1	50	X	1,06	43,0644
		BL1		60	X	0,2454	1	50	X	1,398

<i>Fecha</i>	<i>Tipo</i>	<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. Fe (mg/L)</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Vol. de estándar de Fe (mL)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Dilución (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
25/10/2014	Fortificaciones con moscas	NP1		X	0,2008	1	50	X	1,329	56,4996
		BL2	X	X	0,3056	X	25	X	0,568	46,4660

ANEXO 4

ANEXO 4: CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN BLANCOS DE MOSCAS

Drosophila melanogaster

Tabla A4.1. Concentraciones de hierro en moscas *Drosophila melanogaster* utilizadas como blanco

<i>Código de la capsula</i>	<i>Conc. de Fe₃O₄NPs muestras (mg/L)</i>	<i>Peso muestra (g)</i>	<i>Aforo (mL)</i>	<i>Abs. AA.</i>	<i>Conc. Muestra (mg/kg)</i>
NP1	0	0,2565	100	0,1230	47,9532
NP2	0	0,3179	100	0,1620	50,9594
NP3	0	0,2598	100	0,1200	46,1894
NP4	0	0,3090	100	0,1540	49,8382
NP1	0	0,1996	25	0,4170	52,2295
NP2	0	0,1974	50	0,2190	55,4711
NP3	0	0,2719	25	0,502	46,1567
NP6	0	0,2006	25	0,407	50,7228
BL2	0	0,2478	25	0,568	46,4660
				\bar{X}	49,5540

ANEXO 5

**ANEXO 5: CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster*
EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN
RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO**

**5.1. CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster*
EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN
RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO**

Tabla A5.1. Cronograma de conteo de moscas *Drosophila melanogaster* expuesta a nanopartículas de magnetita sin recubrimiento de quitosano

<i>Día</i>	<i>250 y 1000 Fe₃O₄NPs</i>	<i>100 Fe₃O₄NPs</i>	<i>500 Fe₃O₄NPs</i>	<i>Actividad</i>
Día 1	9 de mayo	6 de junio	9 de junio	Siembra de cruzamientos
Día 7	15 de mayo	12 de junio	16 de junio	Sacar a los parentales
Día 14	19 de mayo	19 de junio	23 de junio	Inicio de conteo F1
Día 22	30 de mayo	27 de junio	1 de julio	Fin de conteo F1

**5.2. CRONOGRAMA DE CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster*
EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON
RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO**

Tabla A5.2. Cronograma de conteo de moscas *Drosophila melanogaster* expuesta a nanopartículas de magnetita con recubrimiento de quitosano

<i>Día</i>	<i>Todas las concentraciones</i>	<i>Actividad</i>
Día 1	6 de junio	Siembra de cruzamientos
Día 7	12 de junio	Sacar a los parentales
Día 14	19 de junio	Inicio de conteo F1
Día 22	27 de junio	Fin de conteo F1

ANEXO 6

**ANEXO 6: CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE
QUITOSANO**

**6.1. CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SIN RECUBRIMIENTO**

**Tabla A6.1. Conteo de moscas *Drosophila melanogaster* expuesta a nanopartículas de
magnetita sin quitosano**

<i>Cruce</i>	<i>0 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>100 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>250 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>500 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>1000 mg/L Fe₃O₄NPs</i>
1	82	124	166	71	169
2	47	98	153	69	158
3	76	134	168	50	126
4	85	126	85	104	165
5	81	132	176	94	53
6	47	175	168	58	145
7	87	78	162	69	86
8	72	101	151	76	124
9	55	150	192	69	149
10	68	75	130	54	181
<i>Total</i>	700	1193	1551	714	1350

6.2. CONTEO DE MOSCAS *Drosophila melanogaster* EXPUESTAS A NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA CON RECUBRIMIENTO DE QUITOSANO

Tabla A6.2. Conteo de moscas *Drosophila melanogaster* expuesta a nanopartículas de magnetita recubiertas con quitosano

<i>Cruce</i>	<i>0 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>100 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>250 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>500 mg/L Fe₃O₄NPs</i>	<i>1000 mg/L Fe₃O₄NPs</i>
1	82	146	135	99	115
2	84	118	114	103	131
3	66	53	120	106	122
4	91	96	124	139	112
5	43	123	131	162	115
6	98	110	110	116	143
7	88	132	77	111	113
8	96	107	122	134	91
9	91	97	130	124	110
10	80	117	132	128	95
<i>Total</i>	819	1099	1195	1222	1147

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Elena Sofía Cárdenas Alcóser, C.I. 1723419667 autor del trabajo de graduación intitulado “Síntesis y caracterización de nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento de quitosano para la determinación de la bioacumulación en moscas *Drosophila melanogaster*”, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA** en la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:**

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 12 de marzo del 2015

Srta. Elena Sofía Cárdenas A.

C.I.: 1723419667