



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Tema: Caracterización nanoscópica de la estructura superficial del insecto amazónico
Rhynchophorus palmarum.

Trabajo de titulación, modalidad de proyecto de investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Cynthia Lizbeth Pico Freire

Tutor: PhD. Santiago Casado Rojo

Ambato-Ecuador

Marzo-2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Santiago Casado Rojo

CERTIFICA

Que el presenta trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 7 de Enero del 2022.

PhD. Santiago Casado Rojo

C.I. 1759126954

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Cynthia Lizbeth Pico Freire, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.

Pico Freire Cynthia Lizbeth

C.I. 1805339536

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente de Tribunal

Lic. M Sc. Danae Fernández Rivero

C.I. 1757181209

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

C.I.1804256905

Ambato, 11 de febrero de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Pico Freire Cynthia Lizbeth

C.I. 1805339536

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres y hermanos

A mi esposo Patricio Peralta

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme culminar con sabiduría y esfuerzo todas las etapas de mi vida y
cubrirme con su santo manto.

A mi padre Hernán Pico, por ser el eje fundamental y apoyo durante toda mi vida, su
amor, confianza, ejemplo y motivación.

A mi Madre Mercedes Freire, por su apoyo, amor y por cobijarme en sus brazos en los
momentos más difíciles y estar presente incondicionalmente.

A mi esposo Patricio Peralta, por su amor, apoyo y paciencia, por creer en mí y estar en
los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanos Dennis Pico y Andrea Pico, por todos los momentos vividos juntos y
aventuras, por apoyarme con amor y cariño siempre.

De manera especial a mi tutor de tesis PhD. Santiago Casado, por apoyarnos durante
todo el proceso del trabajo de investigación, con su tiempo, paciencia y dedicación.

A todos los docentes de formaron parte de la carrera de Ingeniería Bioquímica, por
impartir sus conocimientos, paciencia y tiempo.

A mis amig@s que han estado presente en toda la carrera universitaria, por ser
cómplices de aventuras, desvelos, risas y llantos.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPITULO I.....	13
1. MARCO TEÓRICO.....	13
1.1 Antecedentes investigativos.....	13
Chontacuro (<i>Rhynchophorus palmarum</i>).....	2
Importancia del chontacuro.....	2
Microscopio de fuerza atómica	3
Potencial del AFM en muestras biológicas	3
Topografía nanoscópica superficial	5
Rugosidad nanoscópica superficial	5
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos.....	5
CAPÍTULO II.....	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Materiales.....	6

2.1.1. Materiales de laboratorio.....	6
2.1.2 Reactivos	6
2.1.3 Equipos.....	6
2.2 Métodos	6
2.2.1 Recolección de la muestra.....	6
2.2.2 Esterilización y preparación de la muestra.....	7
2.2.3 Observación de las muestras con el microscopio óptico.....	7
2.2.4 Identificación de la topografía superficial del chontacuro mediante el AFM..	7
2.2.5 Determinación de la rugosidad nanoscópica	8
CAPÍTULO III	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
3.1 Análisis de la caracterización de los pliegues abdominales del chontacuro “Rhynchophorus palmarum” mediante la aplicación de un microscopio óptico.....	9
3.2 Análisis de la caracterización nanoscópica de los pliegues abdominales del chontacuro “Rhynchophorus palmarum” mediante la aplicación de un microscopio de fuerza atómica.....	10
3.3 Análisis de la caracterización nanoscópica de los pliegues abdominales del chontacuro “Rhynchophorus palmarum” mediante la aplicación de un microscopio de fuerza atómica.....	13
3.4 Análisis de la rugosidad nanoscópica de las imágenes topográficas obtenidas de la nanoestructura	13
CAPITULO IV	16
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	16
4.1 Conclusiones.....	16
4.2 Recomendaciones	18
BIBLIOGRAFÍA	19

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de configuración de AFM para la obtención de las imágenes topográficas.	8
Tabla 2. Parámetros de rugosidad de las imágenes topográficas mediante programa de procesamiento XEI.	14

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de la nanoestructura de los pliegues abdominales <i>Rhynchophorus palmarum</i> mediante un estereoscopio (a) y microscopio óptico Lente 4x (b).....	9
Figura 2. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales <i>Rhynchophorus palmarum</i> en la zona A (a) y en la zona B (b).	10
Figura 3. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales <i>Rhynchophorus palmarum</i> y perfiles de la Zona A (a) y (b) con un tamaño de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, respectivamente.	11
Figura 4. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales <i>Rhynchophorus palmarum</i> y sus respectivos perfiles, Zona A (a) y (b) $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, respectivamente.	12
Figura 5. Imagen 3D de la nanoestructura de los pliegues abdominales del <i>Rhynchophorus palmarum</i> , en la zona A (a) y en la zona B (b).....	13

RESUMEN

Las propiedades elasto-mecánicas y la caracterización de nanoestructuras de insectos mediante la aplicación de microscopia de fuerza atómica (AFM) son de gran importancia para entender sus propiedades macroscópicas. En el presente estudio de investigación se exploró la topografía superficial nanoscópica y microscópica de los pliegues abdominales del chontacuro, donde se descubrieron diferencias estructurales a micro y a nanoescala.

La topografía superficial presentó una estructura tubular, con diferencias en longitud, profundidad y forma dependiendo de la región analizada, lo que permite analizar su distinta rugosidad. Los parámetros de rugosidad considerados para el análisis fueron: la rugosidad superficial media (Sq), la rugosidad media aritmética (Sa), la curtosis (Sku) y la asimetría (Ssk). Por ejemplo, se obtuvieron los siguientes valores de Sq medios a partir de dos zonas: 0,78 micrómetros y 0,80 micrómetros.

La presencia de rugosidad superficial en los pliegues abdominales podría aumentar la adherencia lateral entre el cuerpo del gusano y la superficie lo cual le permitiría una mayor movilidad. Los parámetros de curtosis y asimetría mostraron la forma que presentó la imagen topográfica, indicando una superficie uniforme. La asimetría exhibió resultados positivos y negativos que indican la presencia de valores de altura considerablemente por debajo y por encima de promedio.

Palabras claves: Nanociencia, insectos, nanoestructura de insectos, *Rhynchophorus palmarum*, chontacuro, larvas comestibles.

ABSTRACT

The elasto-mechanical properties and characterization of insect nanostructures through the application of atomic force microscopy (AFM) are of great importance to understand their macroscopic properties. In the present research study, the nanoscopic and microscopic surface topography of the abdominal folds of chontacuro was explored, where structural differences at the micro- and nanoscale were discovered.

The surface topography presented a tubular structure, with changing length, depth and protruding shape at different regions, which allows analysis comparisons of its roughness. The roughness parameters considered for the analysis were: mean surface roughness (Sq), arithmetic mean roughness (Sa), kurtosis (Sku) and asymmetry (Ssk). For instance, the following mean Sq values were obtained at two different regions: 0.78 micrometers and 0.80 micrometers.

The presence of surface roughness in the abdominal folds could increase the lateral adherence between the worm body and the surface, which would enhance mobility. The kurtosis and asymmetry parameters showed the shape presented by the topographic image, displaying a uniform surface. The asymmetry exhibited positive and negative results, indicating the presence of height values considerably below and above average.

Keywords: Nanoscience, insects, nanostructure of insects, *Rhynchophorus palmarum*, chontacuro, edible larvae.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

La aplicación de nanotecnología para determinar estructuras superficiales mediante un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM), representa una alternativa eficiente para obtener nuevas propuestas de investigación. Esta técnica permite obtener imágenes topográficas tridimensionales con una precisión a nanoescala [24]. Por tal motivo, el presente estudio de investigación tiene como fin caracterizar la topografía de la estructura superficial del chontacuro (*Rhynchophorus palmarum*) y explorar su morfología y rugosidad.

El chontacuro es una larva presente en once especies de árboles de palma en Ecuador, en la región amazónica se encuentra en la palma de chonta y morete [9]. El mecanismo de movilización para obtener alimento dentro de su hábitat está relacionado con la estructura superficial que presenta, siendo de gran importancia la caracterización nanoscópica de los pliegues dorsales para conocer la influencia en la movilización [25].

El alto contenido nutricional que posee el chontacuro ha sido investigado mediante cromatografía de gases y métodos químicos [25]. Sin embargo, no existen estudios relacionados con la nanoestructura del chontacuro mediante AFM. La determinación estructural de su superficie permitirá proporcionar nuevos conocimientos sobre el mecanismo de movilización utilizado por el mencionado insecto para su desplazamiento.

En la actualidad, se han presentado varios estudios de microestructuras de alas de insectos de lepidópteros que permiten diseñar y fabricar alas biónicas gracias a sus características estructurales [19]. En la investigación de nanoestructuras de las alas de libélulas mediante AFM, se ha determinado que se puede modificar la resistencia a la flexión y torsión del ala, debido a que tienen una resistencia asimétrica bajo carga mecánica en el vuelo [15].

Del mismo modo, se ha caracterizado la microestructura y morfología de las alas de escarabajos mariquitas para el diseño de microvehículos aéreos con alas batientes, gracias a que presentan una estructura a prueba de choques, siendo de gran interés para aplicaciones industriales [31].

Los estudios de caracterización de nanoestructuras de insectos nos permiten conocer la importancia de sus propiedades morfológicas estructurales, generalmente utilizadas para diseñar y elaborar objetos nanotecnológicos.

Chontacuro (Rhynchophorus palmarum)

El chontacuro es un insecto que se encuentra dentro de árboles de palma y se alimenta del tallo, pertenece a la orden Coleóptera correspondiente a la familia Curculionidae. Ecuador posee varias especies de árboles de palma en las que habita el chontacuro; fibra, chambira, canambo, insayu, chonduro, pambil, morete, ungurahua, rallador, chonta pambil, entre otros [4].

El insecto picudo *R. palmarum* tiene cuatro etapas en su ciclo biológico; huevo, larva, pupa y adulto. La fase de larva tiene una duración de entre 42 y 62 días, presentando un gran contenido de ácidos grasos saturados e insaturados [3]. Posee un color amarillento, un tamaño de 5 a 6 cm, unos segmentos abdominales con plegamientos ventrales y dorsales, unas ápodas y una cabeza esclerotizada con piezas bucales masticatorias que le permiten alimentarse dentro de la palma [6].

Importancia del chontacuro

La alimentación con insectos es común en algunas zonas de América Latina, África y Asia, además de países desarrollados como Japón, gracias a su alto contenido nutricional en vitaminas, proteínas y aminoácidos [29].

Los alimentos que poseen aminoácidos de insectos en relación a los estándares establecidos según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) presentan mayor importancia nutricional [9].

En la Amazonía ecuatoriana como parte de la gastronomía de la zona se consume el chontacuro, convirtiéndole en un organismo de interés en la industria alimentaria. En el estudio de caracterización de su extracto graso se ha identificado que posee alto contenido de ácido oleico y vitaminas A y E, siendo de gran aporte nutricional [1].

Sin embargo, no se tiene constancia de que se haya caracterizado todavía su nanoestructura, la que potencialmente nos serviría para conocer el mecanismo de movilidad del insecto dentro de la palma.

Microscopio de fuerza atómica

Es una técnica que permite obtener mediciones en la escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), dando como resultado imágenes en 3D de alta resolución, así como parámetros superficiales.

El AFM está integrado por 3 partes fundamentales que permiten el procesamiento y obtención de datos; componentes del AFM en una cámara de aislamiento, monitor de control y software de evaluación de datos, en una mesa anti vibratoria que evita interferencias, además tiene dos modos principales de operación; contacto y "tapping" [13].

El principio de funcionamiento del AFM consiste en un fleje en voladizo conocido como cantiléver con punta de radio menor de 10 nm en su extremo, lo que permite escanear la superficie de la muestra con alta precisión, siguiendo las diferencias de altura nanoscópica de la superficie de la muestra. Esto se consigue reflejando un rayo láser en el cantiléver y observando la posición del haz reflejado en un fotodiodo [24].

Modo de operación contacto (CM)

El principio de funcionamiento se basa en el mantenimiento de la posición del haz del láser en el fotodiodo [8]. Esta posición implica una flexión del cantiléver, y el sistema va a mantener esa misma flexión durante todo el escaneo. Si encontrase una altura nanoscópica, esta flexión se incrementaría, obligando al material piezoeléctrico del sistema a levantar el cantiléver para volver a recuperar la flexión inicial. Este movimiento vertical del material piezoeléctrico es lo que se interpreta como altura. En caso de que disminuyera la flexión el sistema bajaría el cantiléver, igualmente para recuperar la flexión inicial, disminución que se interpreta también como un cambio de altura. La fuerza ejercida sobre la superficie debe controlarse para evitar la deformación de la superficie de la muestra durante el escaneo, y esta fuerza depende de la constante de resorte (K) del cantiléver [21].

Potencial del AFM en muestras biológicas

La técnica de AFM permite generalmente la caracterización de nanoestructuras biológicas sin necesidad de pretratamientos en la muestra. Existen, por ejemplo, medidas en polímeros y en plásticos que, gracias a la innovación de la técnica de AFM,

han permitido la obtención de datos relativos a la cristalización y al crecimiento de lamelas, siendo de gran interés industrial para la elaboración de nuevos productos [8].

De la misma manera, se puede caracterizar la morfología y las nanoestructuras de la superficie de insectos identificando los mecanismos a nivel nanométrico del sistema de movimiento de las alas de mariquita, catozo y mariposa, lo cual ha permitido crear objetos tecnológicos basados en los mismos mecanismos, mejorando los sistemas aéreos existentes [19].

Además, se pueden obtener datos de las oscilaciones existentes en diferentes partes de los insectos y explorar la topografía en diferentes puntos de la muestra, indicando la rugosidad que presenta la superficie [16]. La técnica mediante el AFM tiene mucho potencial y es de gran interés en la biología.

Es importante mencionar que también se puede utilizar la técnica de microscopía electrónica, la cual permite examinar y analizar la morfología de nanoestructuras y la composición química. Esta técnica de microscopía electrónica consiste en la interacción de un haz incidente de electrones con la muestra, donde los electrones funcionan como una onda y se reflejan en la superficie. Sin embargo, para este proceso es frecuentemente necesario cubrir metálicamente las muestras biológicas, además de exigir que resistan condiciones de vacío [17].

Los electrones son conocidos como una radiación ionizante que producen una amplia gama de señales secundarias, que nos proporcionan información química y propiedades de la muestra. Sin embargo, presenta limitaciones debido a que la radiación ionizante produce normalmente un daño sobre muestras biológicas, requiriendo la mencionada metalización superficial [33].

Topografía nanoscópica superficial

Indica las características tridimensionales de la superficie, es decir, desviaciones de una superficie plana, las cuales incluyen la forma del perfil, la rugosidad de la superficie, la ondulación y la aspereza o el acabado [32]. La topografía se puede definir con diferentes parámetros, donde los valores absolutos dependen de la longitud, área analizada, y equipo de medición [27].

Rugosidad nanoscópica superficial

La rugosidad nanoscópica superficial determina las nanoirregularidades que presenta la superficie, se puede cuantificar y describir mediante métodos topográficos, al medir el perfil de la superficie bidimensional o tridimensionalmente [12].

Existen varios parámetros de rugosidad superficial para realizar un análisis comparativo de la rugosidad como, por ejemplo, la rugosidad superficial media cuadrática (S_q), que es la raíz cuadrada de la suma de todas las alturas elevadas al cuadrado sobre el promedio. También existe el parámetro conocido como rugosidad media (S_a), que es el área entre el perfil de rugosidad y su línea media. La S_q nos proporciona datos confiables al tomar en cuenta el efecto global, a diferencia de la S_a que considera diferencia entre pico y valle. Para un análisis de la forma de la superficie se analiza la curtosis (S_{ku}) y la asimetría (S_{sk}), que nos dan a conocer la nitidez de la superficie y la distribución de la altura, respectivamente [7].

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Determinar la nanoestructura de la superficie del *Rhynchophorus palmarum*, insecto amazónico oriundo de Ecuador.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Recolectar la muestra, extraer la superficie del *Rhynchophorus palmarum*, y observar mediante un microscopio óptico.
2. Medir la nanoestructura del *Rhynchophorus palmarum* con el microscopio de fuerza atómica en modo contacto.
3. Analizar la rugosidad nanoscópica medida a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la parte experimental se desarrolló en los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA).

2.1 Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

- Puntas de AFM de modo contacto
- Portaobjetos metálicos de AFM
- Cubreobjetos
- Frascos de vidrio
- Pinzas
- Cinta adhesiva
- Guantes asépticos
- Rollo de papel absorbente

2.1.2 Reactivos

- Etanol al 96 %

2.1.3 Equipos

- Microscopio de Fuerza Atómica
- Microscopio óptico
- Computadora
- Software para la adquisición de datos por AFM

2.2 Métodos

2.2.1 Recolección de la muestra

El chontacuro se obtuvo de la ciudad del Puyo perteneciente a la provincia de Napo, en el mercado mayorista de Tarqui. Se utilizó el método de preservación temporal según el manual de recolección de insectos [28]. Se procedió a colocar en un frasco de vidrio esterilizado durante dos horas, luego se retiró del recipiente y se colocó con papel

absorbente, se procedió a etiquetar las muestras con los siguientes datos: nombre del recolector, fecha, lugar y código de muestra.

Posteriormente, se transportaron las muestras al laboratorio de Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato (UTA).

2.2.2 Esterilización y preparación de la muestra

Para el procedimiento de esterilización de la muestra se utilizó un flujo de aire libre de impurezas para retirar los restos de la palma en la superficie del chontacuro. Luego, para obtener la estructura superficial de la larva se congeló hasta debajo del punto de fusión de la grasa. Después, con un bisturí se cortó la zona media de los pliegues abdominales del chontacuro y se desechó el contenido interno según el tipo de residuo establecido en el manual de normas de seguridad de laboratorio [11].

2.2.3 Observación de las muestras con el microscopio óptico

Se observaron las muestras limpias y preparadas mediante un objetivo de microscopio óptico en reflexión y con luz blanca. Se procedió a colocar la muestra en un portaobjeto, se colocó en microscopio óptico y se enfocó la muestra con lentes de aumento de 4x.

2.2.4 Identificación de la topografía superficial del chontacuro mediante el AFM

Primeramente, se preparó la muestra a analizar, luego en una placa se posicionó de manera plana la muestra con cinta adhesiva, luego se colocó en la plataforma del AFM la muestra y se ajustó con los tornillos en el eje (x) y (y). Posteriormente, se descendió el objetivo óptico para el análisis y focalización de la muestra, se seleccionaron los canales de medida y se configuraron los parámetros: la resolución, el tamaño de la medida, la velocidad de escaneo, la ganancia y la fuerza, como se observa en la Tabla 1, para las dos muestras analizadas.

Tabla 1. *Parámetros de configuración de AFM para la obtención de las imágenes topográficas.*

Nombre de la muestra	M1	M2	M1	M2
Modo	Contacto	Contacto	Contacto	Contacto
Resolución (plx)	512	512	512	512
Tamaño de escaneo en X (μm)	30	30	50	50
Tamaño de escaneo en Y (μm)	30	30	50	50
Velocidad de escaneo (Hz)	2.1	2	2.1	1
Ganancia	1.5	1	1.7	1.5

Posteriormente, mediante la utilización del programa informático XEI especializado para el procesamiento de datos obtenidos de AFM, se obtuvieron las imágenes topográficas bidimensionales y tridimensionales. Para el análisis del perfil se realizó una sustracción del fondo lineal, se trazó una línea inclinada y se obtuvo el perfil de las imágenes topográficas.

2.2.5 Determinación de la rugosidad nanoscópica

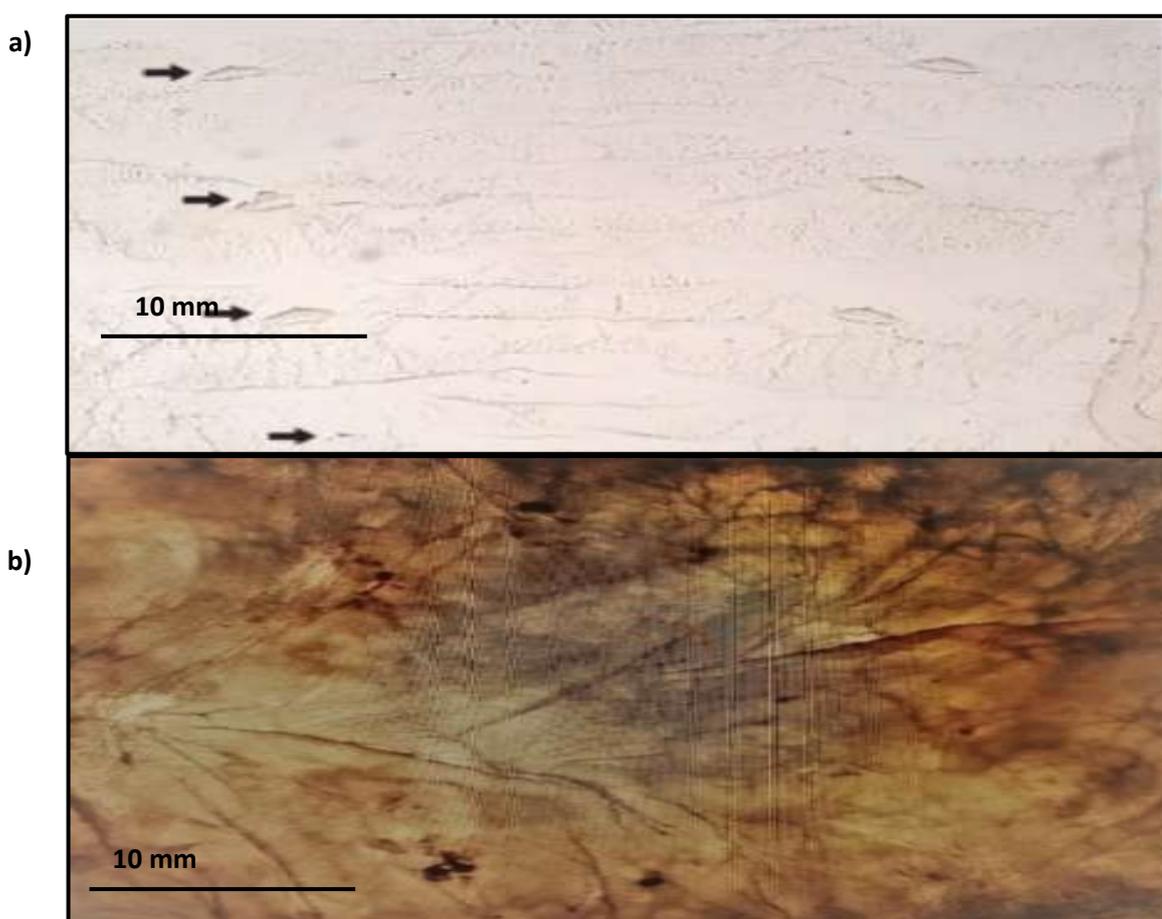
Se determinó la rugosidad nanoscópica de las imágenes obtenidas utilizando el mismo programa especializado para el procesamiento de datos. Se realizó la comparación estadística entre los datos de rugosidad nanoscópica obtenidos en distintas regiones.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*3.1 Análisis de la caracterización de los pliegues abdominales del chontacuro “*Rhynchophorus palmarum*” mediante la aplicación de un microscopio óptico.*

En la caracterización a microescala de los pliegues abdominales del chontacuro se utilizó el microscopio óptico, para identificar la estructura que presenta. En la figura 1 se observa la estructura de los pliegues. Sin embargo, no se logra identificar los cuatro pliegues dorsales, setas dorsales, setas posdorsales, setas espiracular que presenta en su morfología de los pliegues abdominales. Debido a que se analizó una pequeña zona de la parte dorsal. En contraste con la caracterización del chontacuro mediante un estereoscopio, imagen obtenida a partir de la literatura (Figura 1a), se observa un mayor número de pliegues y pequeñas setas dorsales [20] que las medidas en el laboratorio con la ayuda de un microscopio óptico (Figura 1b).



*Figura 1. Imagen de la nanoestructura de los pliegues abdominales *Rhynchophorus palmarum* mediante un estereoscopio (a) y microscopio óptico Lente 4x (b).*

3.2 Análisis de la caracterización nanoscópica de los pliegues abdominales del chontacuro “*Rhynchophorus palmarum*” mediante la aplicación de un microscopio de fuerza atómica.

La caracterización de la nanoestructura se realizó en distintas zonas (A y B), donde se evidenció que las dos zonas tienen una estructura tubular, figura 2.

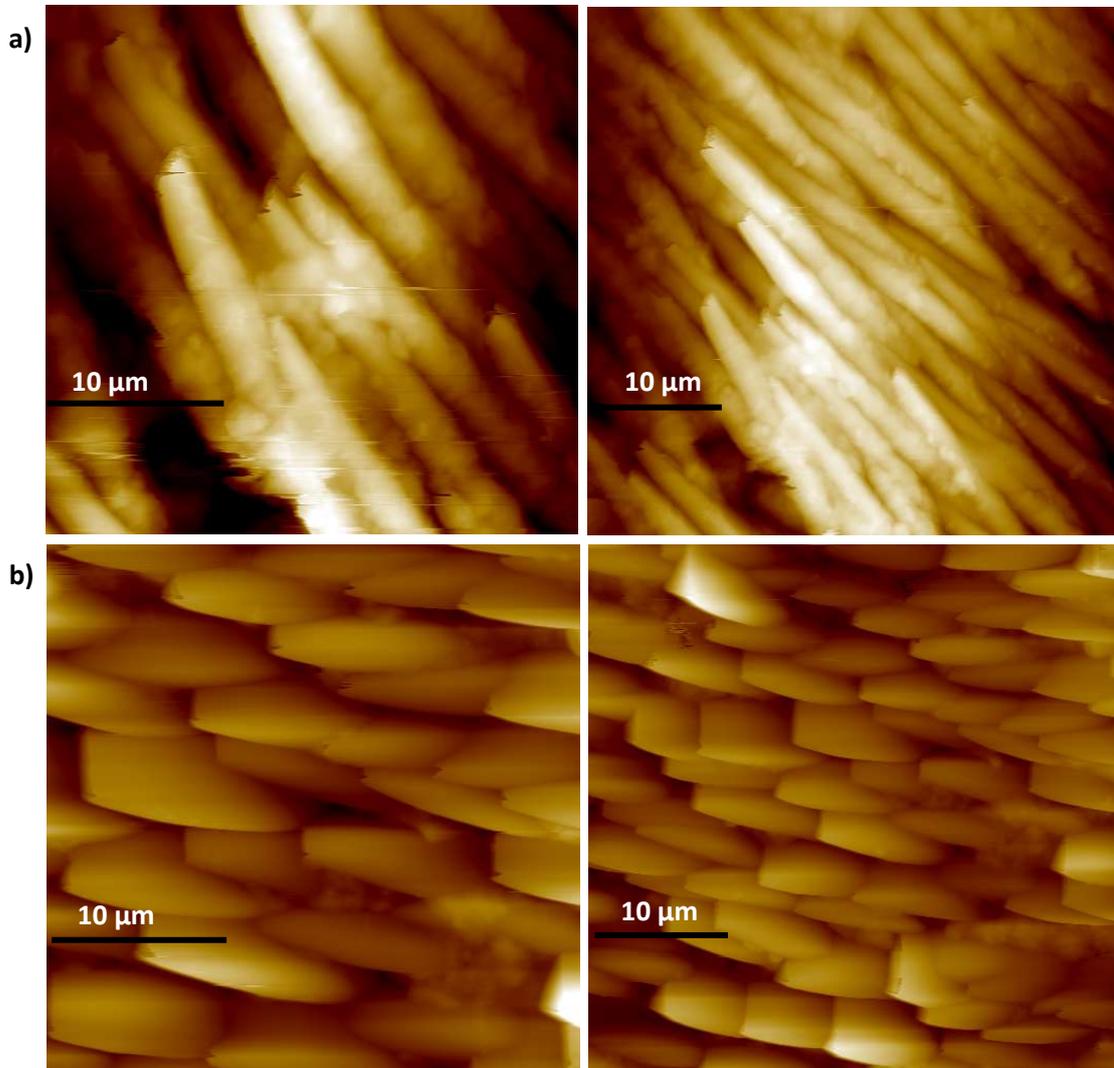


Figura 2. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales *Rhynchophorus palmarum* en la zona A (a) y en la zona B (b).

En la zona A (figura 2a), la estructura de los tubos observados se ve completamente con una profundidad notable, presentando mayor longitud que la zona B (figura 2b), donde la morfología de los tubos se encuentra desde abajo observando solo una parte de su forma geométrica y aparentando una estructura más sobresaliente en forma de escama, y con una longitud mucho menor. Para observar mejor las diferencias

estructurales de la superficie del chontacuro se aumentó el tamaño de medida en las zonas analizadas, obteniendo características similares.

Se analizaron los perfiles trazando una línea inclinada en la imagen topográfica bidimensional, donde la estructura tubular estaba más definida. Se representa la relación del tamaño respecto altura y profundidad.

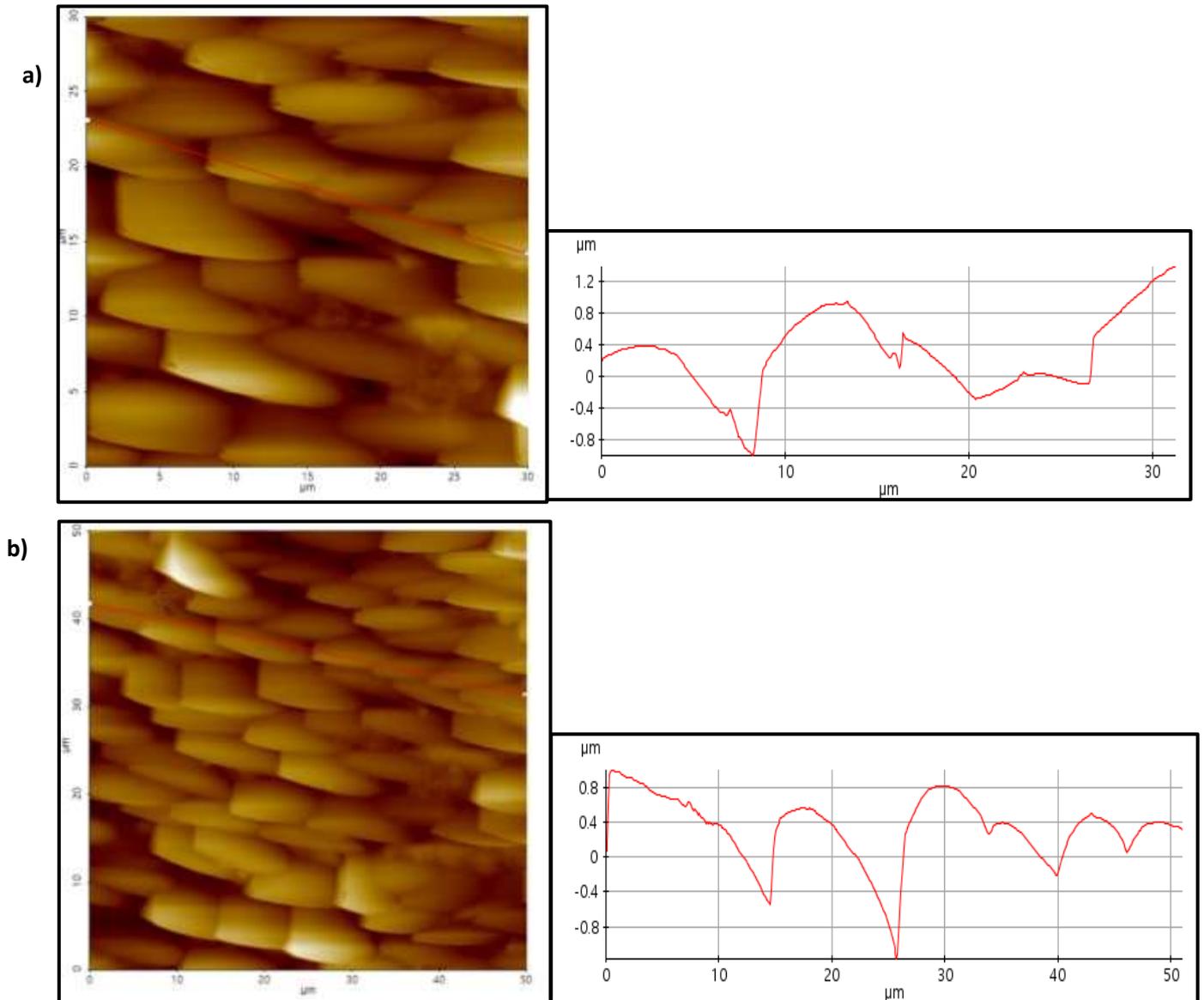


Figura 3. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales *Rhynchophorus palmarum* y perfiles de la Zona A (a) y (b) con un tamaño de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

El perfil analizado nos da a conocer las irregularidades que presenta la superficie analizada, en la zona A, figura 3 (a y b) se evidencia que la superficie de la muestra es irregular y al medir en la misma zona la altura máxima y mínima no varia

significativamente, encontrándose entre los siguientes límites: de $-0,991 \mu\text{m}$ a $1,376 \mu\text{m}$ en la imagen $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $-1,169 \mu\text{m}$ a $0,992 \mu\text{m}$ en la imagen $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

En la figura 4 (a y b), se observan los perfiles correspondientes a la zona B, donde presentan una superficie irregular, la altura máxima y mínima no varía significativamente al medir la misma zona, se encuentran en un rango de $-1,222 \mu\text{m}$ a $1,247 \mu\text{m}$ en la imagen $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $-2,902 \mu\text{m}$ a $1,770 \mu\text{m}$ en la imagen $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

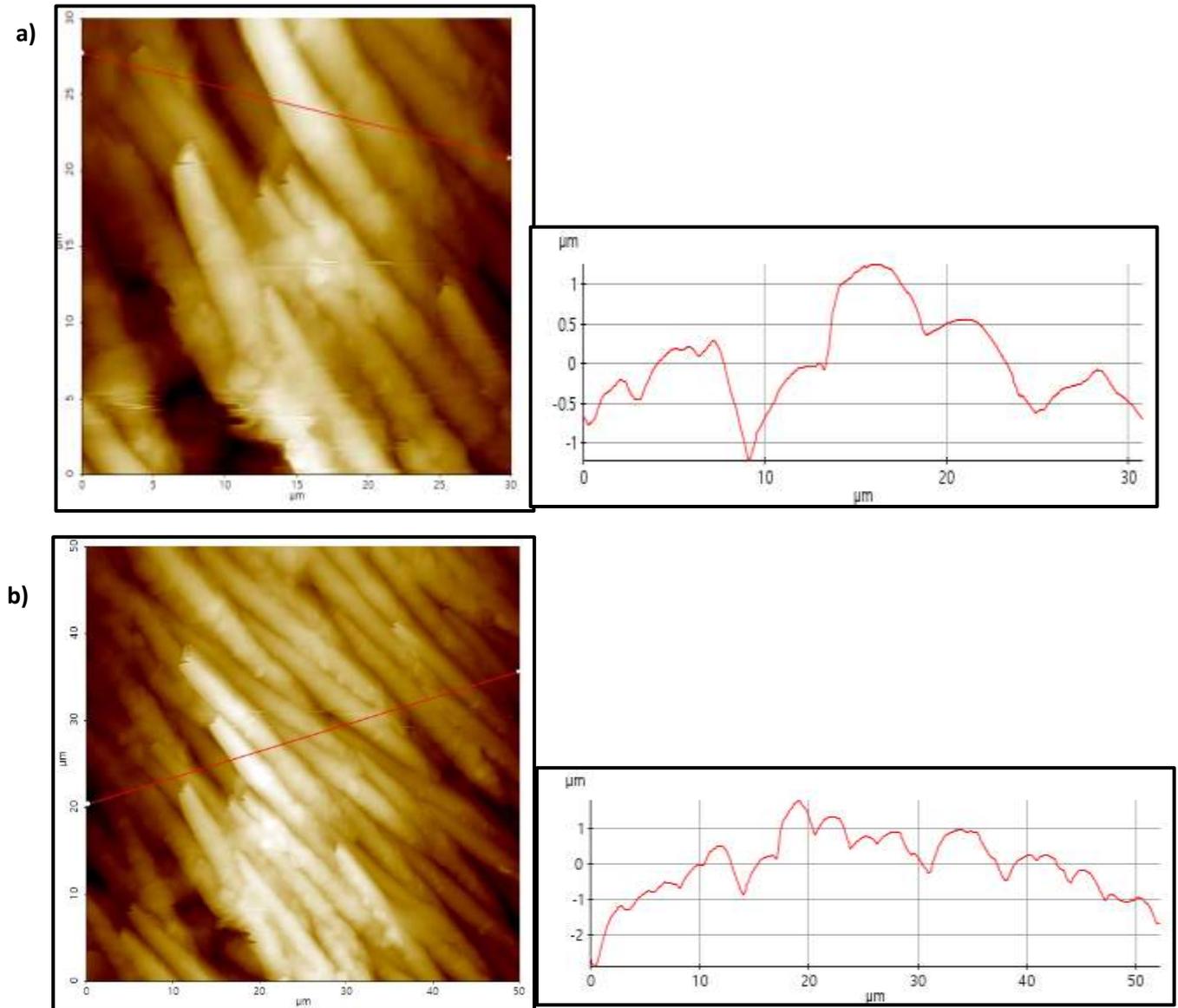


Figura 4. Imagen 2D de la nanoestructura de los pliegues abdominales *Rhynchophorus palmarum* y sus respectivos perfiles, Zona A (a) y (b) $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ y $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

La topografía superficial del chontacuro presenta una estructura resistente que se puede caracterizar mediante microscopia de fuerza atómica en modo contacto, indicando la conformación de la nanoestructura de la superficie en distintos puntos. Los perfiles observados nos indican que la superficie es irregular y que, al medir en la misma zona, modificando la escala, los resultados no varían significativamente; pero también que no hay grandes diferencias al comparar las nanoestructuras de las distintas zonas analizadas. La estructura superficial del chontacuro presenta cambios estructurales al medir en micro y a nanoescala, donde la estructura tubular no se evidencia mediante un microscopio óptico, siendo de gran interés la nueva conformación estructural observada.

3.3 Análisis de la caracterización nanoscópica de los pliegues abdominales del chontacuro “*Rhynchophorus palmarum*” mediante la aplicación de un microscopio de fuerza atómica.

En la figura 5 se muestra una comparativa entre las imágenes tridimensionales en dos zonas (A y B), mediante una perspectiva tridimensional de la distribución de los tubos.

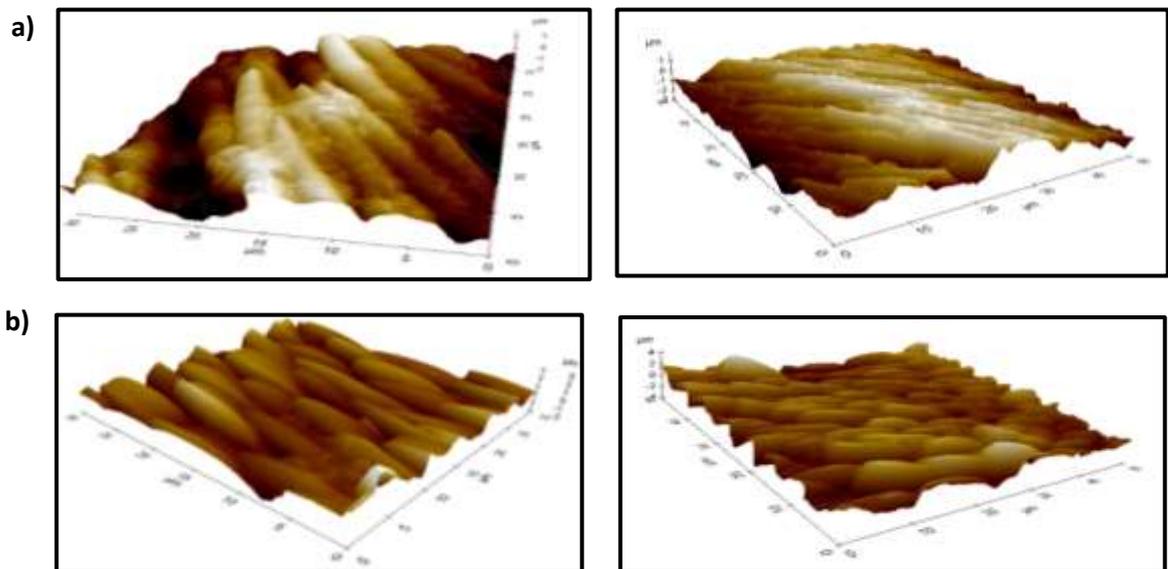


Figura 5. Imagen 3D de la nanoestructura de los pliegues abdominales del *Rhynchophorus palmarum*, en la zona A (a) y en la zona B (b).

En el eje Z se observa la altura que presentan las imágenes topográficas, y el tamaño de escaneo en el eje (x) e (y). En las dos zonas la conformación estructural muestra diferencias significativas, como las mencionadas en las imágenes topográficas bidimensionales.

3.4 Análisis de la rugosidad nanoscópica de las imágenes topográficas obtenidas de la nanoestructura

Los parámetros de rugosidad fueron obtenidos mediante un software de procesamiento de datos XEI en dos zonas del chontacuro como se observa en la Tabla 2. Antes de la comparación de la rugosidad se realizó una sustracción del fondo lineal para evitar el valor promedio de la superficie.

Tabla 2. Parámetros de rugosidad de las imágenes topográficas mediante programa de procesamiento XEI.

Muestra	A		B	
Tamaño (μm)	30	50	30	50
Sq (μm)	0.6918	0.8806	0.5962	1.0043
Ssk	-0.2196	-0.2286	0.2318	0.1965
Sku	2.4713	2.3326	4.4587	3.477
Sz (μm)	3.8005	4.965	5.6399	8.7597
Sa (μm)	0.5703	0.7367	0.4631	0.7879

La media de todas medidas de rugosidad de la superficie (Sq) se realizó mediante la fórmula de la raíz cuadrada media de la superficie, utilizando la siguiente expresión matemática procesada por el software XEI.

$$Sq = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Z_i^2}$$

Donde Z_i es la altura en cada punto registrado por el AFM y N es el número de total de puntos, la resolución de las imágenes obtenidas fue de 512 x 512 pixeles, es decir, que existen 262144 puntos. La zona A exhibió valores de rugosidad media cuadrática (RMS) de 0,880 y 0,691 μm y la zona B de 0,596 y 1,004 μm.

De la misma manera, se analizó la rugosidad media aritmética superficial (Sa) procesada por software mediante la siguiente fórmula:

$$Sa = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N |Z_{ij}|$$

Los valores de la rugosidad media aritmética superficial en la zona A fueron de 0,570 y de 0,736 μm , y en la zona B de 0,463 y de 0,787 μm . Al comparar los resultados con la rugosidad media se evidencia que los valores cambian significativamente. En un análisis comparativo de rugosidad es conveniente utilizar la rugosidad media cuadrática porque previsiblemente se visualizan mejor las diferencias entre los valores de la imagen de rugosidad, a pesar de que la rugosidad aritmética podría proporcionar también datos muy útiles [22].

La curtosis (Sku) nos indica la nitidez que presenta la superficie y expresa el apuntado de la distribución de la altura, fue procesada por el software mediante la siguiente fórmula:

$$Sku = \frac{1}{Sq^4} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N Z_{ij}^4$$

Generalmente, se utiliza para evaluar el brillo y lustre de la superficie: si el Sku es igual a 3, entonces se distribuye normalmente; si es mayor a 3, la distribución de altura se considera con picos; y, si es menor a 3, la superficie es más plana [20].

Los valores obtenidos de la curtosis superficial en la zona A fueron de 2.4713 y 2.33, los cuales indican que la distribución de la altura es uniforme con una superficie plana, mientras que los valores de curtosis en la zona B fueron: 3,477 y 4.4587, indicando que la distribución de altura se considera con picos.

La asimetría de la línea (Ssk) refleja la asimetría de distribución de las alturas procesada por software mediante la siguiente fórmula:

$$Ssk = \frac{1}{Sq^3} \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N Z_{ij}^3$$

La asimetría de la zona A exhibió valores negativos encontrándose en un rango de -0,228 a -0,219. A diferencia, de la asimetría en zona B que mostro valores positivos, encontrándose en un rango de 0,196 a 0,231. Los valores negativos y positivos indican la presencia de valores de altura considerablemente por debajo y por encima de promedio, respectivamente [18].

La altura máxima superficial (sz) indica la media aritmética de los cinco picos más altos y cinco valles más bajos de la línea, por lo cual no se consideró para el análisis comparativo de la rugosidad, debido a que puede producir resultados engañosos por los picos espurios o por artefactos durante el escaneo [22].

Se consideró la rugosidad superficial para el análisis de los parámetros de rugosidad debido a que incluye el efecto global, es decir, que incluye todos los puntos de altura. A medida que presenta mayor superficie, la rugosidad aumenta como se evidenció en los resultados obtenidos; a diferencia de los valores exhibidos de la rugosidad media aritmética, que fueron inferiores. Esto es debido a que considera la diferencia pico-valle y, al encontrarse algún dato espurio correspondiente a un artefacto, puede afectar a los resultados obtenidos.

Se podría plantear como hipótesis que la rugosidad superficial presente en los pliegues abdominales permite aumentar la adherencia lateral entre el cuerpo de la larva y la superficie, lo cual le permitiría incrementar la movilidad, en contraste con el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el cual presenta rugosidad superficial en el área de los surcos, que le permite tener mayor adherencia en la superficie para su desplazamiento [10]. Es importante mencionar que ni Sa ni Sq permiten definir la forma de la superficie; por tal motivo se analizó la asimetría y curtosis, donde se identificaron picos relativamente planos y valles profundos.

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

La caracterización de la nanoestructura del chontacuro "*Rhynchophorus palmarum*", obtenida mediante microscopia de fuerza atómica, nos da a conocer la conformación estructural a nivel nanométrico que presenta la topografía superficial y la influencia que podría tener en el mecanismo de movilidad.

La recolección y extracción de la muestra de *Rhynchophorus palmarum*, se realizaron sin introducir o desinfectar la superficie con compuesto químicos, observando la topografía sin la interferencia de algún compuesto que no forma parte de la superficie de donde se extrajo la muestra. Posteriormente, fue sometida a congelación bajo el punto de fusión de las grasas, observando a microescala la estructura de los pliegues dorsales y viéndose diferencias geométricas a micro y a nanoescala.

La nanoestructura del chontacuro "*Rhynchophorus palmarum*" es resistente al ser medida mediante un microscopio de fuerza atómica en modo contacto, presentando una estructura en forma tubular en las dos zonas analizadas. La zona A presento mayor longitud en el tamaño de tubos observados y mayor profundidad en la morfología, a diferencia de la zona B, donde la estructura tubular estaba orientada desde abajo observándose solo una parte de geometría de los tubos y con una estructura más sobresalida en forma de escamas.

Se analizaron los parámetros de rugosidad de las imágenes topográficas obtenidas en distintas zonas del chontacuro, considerando la rugosidad media superficial para el análisis comparativo, debido a que considera todos los puntos, a diferencia de la rugosidad media aritmética, que toma en cuenta los picos-valles, pudiéndose encontrar en la lectura con algún dato espurio. Los pliegues abdominales presentaron rugosidad superficial mayor que la rugosidad media aritmética, donde esta diferente estructura podría estar relacionada con el mecanismo que utiliza para su desplazamiento. De la misma manera, se analizaron los valores exhibidos de curtosis y asimetría que nos indicaron la forma de las imágenes topográficas. Las curtosis obtenidas en la zona A fueron inferiores a 3, mientras que en la zona B fueron superior a 3. Esto indica que la distribución de altura es uniforme con una superficie plana en zona A y una distribución de altura que considera con picos en la zona B. De la misma manera, se

evidenciaron valores positivos y negativos en la zona A y B, que indican la presencia de valores de altura considerablemente por debajo y por encima de promedio, respectivamente.

4.2 Recomendaciones

Realizar un análisis de la composición química que presenta la superficie del chontacuro mediante cromatografía líquida de capa fina de alto rendimiento, e identificar si presentan algunos de compuestos de interés, como grupos funcionales de resilina en las zonas más elásticas, lo cual permitiría conocer el mecanismo de movilidad y mimetizar en un equipo nanotecnológico. También podría analizarse la presencia de quitina, existente en varios insectos, los cuales la utilizan en su superficie como protección contra depredadores.

Caracterizar la nanoestructura de los pliegues abdominales de larvas con diferente hábitat y conocer si presenta la misma conformación de su estructura, y relacionarlo con el mecanismo de movilidad que presentan.

Analizar la influencia de la curtosis y asimetría en relación al coeficiente de fricción estática, verificar si los valores exhibidos de asimetría disminuyen si el coeficiente de fricción estática aumenta. De la misma manera, con los valores de la curtosis si son superiores o inferiores a 3, aumenta o disminuye el coeficiente de fricción estática, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera, D., Valverde, D., Sarabia, D., & Álvarez, M. (2015). Caracterización del extracto graso de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. *CITECAL*, 25, 39-44.
2. Aguirre, E., & Rivas, R. (2013). *Estudio Investigativo de la Cultura Gastronómica de la parroquia San José ,ubicada en el Cantón Santa Clara, provincia de Pastaza y propuesta gastronómica con productos locales*. Obtenido de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11812/1/53425_1.pdf
3. Aldana, C., Aldana, A., & Moya, M. (2011). *Manejo de picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera:Curculionidae)*. Obtenido de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19497/45148_61209.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. Balslev, H., Navarrete, H., Torre, L., & Macía, M. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* . Obtenido de <https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de%20la%20Torre%20et%20al.%202008%20Encyclopedia%20of%20useful%20plants%20of%20Ecuador.pdf>
5. Batista, A., Bastos, F., Pereira, T., Ferreira, J., Barbosa, & EstevanS. (2015). Enamel wear characterization based on a skewness and kurtosis surface roughness evaluation. *ScienceDirect*, 35-41.
6. Cartay, R. (2018). Entre el asombro y el asco: el consumo de insectos en la cuenca amazónica. El caso del *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera Curculionidae). *Revista Colombiana de Antropología Scielo*, 54(2), 143-169. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0486-65252018000200143&lng=en&nrm=iso&tlng=es#B21
7. Dehghani, S., Mansour, M., Nezhad, A., Karimi, J., Hosseinpour, S., & Davoodi, A. (2021). Exploring mechano-bactericidal nature of *Psalmocharias*

cicadas wings: an analytical nanotopology investigation based on atomic force microscopy characterization. *ScienceDirect*, 26.

8. Díaz, M. (2004). *Aplicaciones de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) cómo método de caracterización de polímeros* *Aplicaciones de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) cómo método de caracterización de polímeros*. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/3209>
9. Espinosa, A., & Hidalgo, M. (2019). *Estudio del valor nutricional y caracterización de los ácidos grasos del chontacuro de la especie *Rhynchophorus palmarum* L.* Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/19286/1/T-UCE-0008-CQU-156.pdf>
10. Fakhrullina, G., Akhatova, F., Kibardina, Maria, Fokin, D., & Falkhrullin, R. (2017). Nanoscale imaging and characterization of *Caenorhabditis elegans* epicuticle using atomic force microscopy. *ScienceDirect*, 483-491. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1549963416301733>
11. Fondecyt. (2018). *Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados*. Obtenido de https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual-Bioseguridad-junio_2018.pdf
12. Freyman, C., Zhao, B., & Chung, W.-Y. (2007). Suppression of Moisture Sensitivity of Friction in Carbon-Based Coatings. *ScienceDirect*, 295-310.
13. García, A., & Cruz, K. (2020). Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos. *Revista Infraestructura Vial / LanammeUCR*, 22(40), 20-27. Obtenido de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/infraestructura/v22n40/2215-3705-infraestructura-22-40-20.pdf>
14. Gil, T. (1993). *Procedimiento de Metodología Clínica*. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1.pdf>
15. Gorb, S., Kesel, A., & Berger, J. (2009). Microsculpture of the wing surface in Odonata: evidence for cuticular wax covering. *ScienceDirect*, 129-135.

16. Guz, N., Sokolov, I., & Vasilyev, S. (2010). Atomic force microscopy to detect internal live processes in insects. *Applied Physics Letters*, p.4.
17. Hanley, S., Giasson, J., Revol, J., & Gray, D. (1992). Atomic force microscopy of cellulose microfibrils: comparison with transmission electron microscopy. *ScienceDirect*, 4639-4642. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/003238619290426W>
18. Kumar, R., & Rao, S. (2012). AFM STUDIES ON SURFACE MORPHOLOGY, TOPOGRAPHY AND. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 1881-1889. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Brajesh-Kumar-32/publication/279702126_AFM_studies_on_surface_morphology_topograp](https://www.researchgate.net/profile/Brajesh-Kumar-32/publication/279702126_AFM_studies_on_surface_morphology_topography_and_texture_of_nanostructured_zinc_aluminum_oxide_thin_films/links/5fb660a7299bf104cf5b0bd1/AFM-studies-on-surface-morphology-topograp)
[hy_and_texture_of_nanostructured_zinc_aluminum_oxide_thin_films/links/5fb660a7299bf104cf5b0bd1/AFM-studies-on-surface-morphology-topograp](https://www.researchgate.net/profile/Brajesh-Kumar-32/publication/279702126_AFM_studies_on_surface_morphology_topograp_hy_and_texture_of_nanostructured_zinc_aluminum_oxide_thin_films/links/5fb660a7299bf104cf5b0bd1/AFM-studies-on-surface-morphology-topograp)
19. Muhammad, A., Nguyen, Q., Park, H., Hwang, D., Byum, D., & Goo, N. (2010). Improvement of Artificial Foldable Wing Models by Mimicking the Unfolding/Folding Mechanism of a Beetle Hind Wing. *SpringerLink*, 134-141.
20. Muhanad, M., Wu, X., Alnazzawi, A., Watson, J., & Watts, D. (2018). Surface characteristics and biocompatibility of cranioplasty titanium implants following different surface treatments. *ScienceDirect*, 676-683. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0109564118300423>
21. Nieto, A., Martínez, R., Mendoza, J., & Valcárcel, J. (2017). Microscopía de fuerza atómica como herramienta de caracterización de superficies fotográficas. *La Ciencia y el arte VI. Ciencias experimentales y conservación del patrimonio*, 166-181.
22. Otero, J., Ketabi, S., Zafra, R., Garcia, M., Villa, C., Casado, S., & Teus, M. (2014). Atomic force microscopy comparative analysis of the surface roughness of two posterior chamber phakic intraocular lens models: ICL versus IPCL. *Springer Link*, 21-280. Obtenido de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s12886-021-02039-6.pdf>
23. Pan, X. (2014). *Processing and feature analysis of atomic force microscopy images*. Obtenido de

https://scholarsmine.mst.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=8267&context=masters_theses

24. ParkSYMTEMS. (2017). *How AFM Works*. Obtenido de <https://parksystems.com/medias/nano-academy/how-afm-works>
25. Prubner, K., Pingel, K., Dressel, P., Becker, J., Reiner, C., Schollosser, M., & Hans, C. (2001). Las Enseñanza de Técnicas de Caracterización de Materiales: Un método Interdisciplinario para Desarrollar Software Interactivo Multimedia para la Enseñanza basado en Red. *Journal of Materials Education*, 105-111.
26. Reséndiz, G., & Uribe, J. (2005). Microscópio de de fuerza Atómica. *Universidad Autónoma del Estado de Morelos, UAEM*.
27. Sahoo, P. (2011). Surface topography- Tribology for Engineers. *ScienceDirect*, 1-32.
28. Stayskal, G., Murphy, W., & Hoover, E. (1986). *Insects and mites: Techniques for collection and preservation*. Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture, Agricultural Research Service.
29. Vantomme, P. (2010). Los insectos forestales comestibles, una fuente de proteínas que se suele pasar por alto. *FAO*, 61, 19-21. Obtenido de <https://www.fao.org/3/i1758s/i1758s06.pdf>
30. Vásquez, A., Lohr, L., & Marvaldi, E. (2020). Comparative morphology of the larvae of the palm weevils *Dynamis borassi* (Fabricius) and *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) (Curculionidae: Dryophthorinae): Two major pests of peach palms in the Neotropics. *Scielo Brasil*, 55-68.
31. Xiang, J., Du, J., Li, D., & Zhen, C. (2016). Functional morphology and structural characteristics of wings of the ladybird beetle, *Coccinella septempunctata* (L.). *Wiley Analytical Science*, p.550-556.
32. Xin, Q. (2013). Friction and lubrication in diesel engine system design. *ScienceDirect*, 651-758.
33. Zhou, W., Apkarian, R., & Wang, Z. (2006). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). *SpringerLink*, 1-40. Obtenido de https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-39620-0_1