
CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA ESCAMA DE TILAPIA NILÓTICA *OREOCHROMIS SP / NILOTICUS*, QUE DETERMINE SU TIPO DE BIOPOLÍMERO Y SU IMPLEMENTACIÓN EN EMPAQUES INDUSTRIALES

Ángela Joana Ávila Acosta
Gestora Red Tecnoparque nodo La Angostura
ajavila2@misena.edu.co

Kathryn Yadira Guzmán Pacheco
Instructora Centro de Formación Agroindustrial La Angostura
kyguzman@misena.edu.co

Jean Carlo Quintero García
Aprendiz del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura
qgjean@misena.edu.co

Resumen: Durante las últimas décadas constantemente se buscan nuevas alternativas en la generación de valor agregado a materias primas y, especialmente, a subproductos, buscando beneficiar al medio ambiente y proporcionando innovación en los productos que surgen, a tal punto de que sea comercializable y por tanto haya beneficio económico. Es esta la razón por la que se plantea un proyecto que busca innovar en la creación de empaques biodegradables, elaborados a partir de la escama de tilapia nilótica, subproducto generado de la industria de la piscicultura (en la cual el departamento del Huila es potencia y líder a nivel nacional). Para cumplir con ese objetivo se plantea llevar a cabo procesos nanotecnológicos y análisis a nanoescala para mayor precisión en los resultados, determinando el efecto a gran proporción al igual que el aporte en el impacto ambiental desde todos sus ámbitos.

Palabras clave: Nanotecnología, tilapia, escamas, quitosano, biopolímero.

CHARACTERIZATION BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FLAKE NILOTIC TILAPIA *OREOCHROMIS SP / NILOTICUS*, TO DETERMINE ITS TYPE OF BIOPOLYMER AND ITS IMPLEMENTATION IN INDUSTRIAL PACKAGING

Abstract: In recent decades, there is almost a daily search for new alternatives to generate added value to raw materials and especially to by-products looking for benefits to the environment and providing the innovation to the emerging products, to such an extent that it is marketable and therefore it has economic benefits; for this reason a project to innovate biodegradable packaging, made from Nile tilapia flake (a by-product of the fish farming industry, in which the department of Huila is an economic power and national leader), to meet the objective nanotechnology processing and nano-scale analysis for more accurate results, are approached... determining a large share equally the effect that the contribution to the environmental impact from all areas.

Keywords: Nanotechnology, tilapia, scales, chitosan, biopolymer.

Introducción

La acuicultura en Colombia se ha incrementado significativamente y aún más durante la última década, lo que ha provocado que se busquen distintos sistemas y nuevas tecnologías que promuevan hábitos ambientales para no prescindir de materiales reutilizables, los cuales poseen un valor agregado que se puede originar y que desafortunadamente no se presenta; precisamente por esto, constantemente se están buscando soluciones que eviten arraigadas pérdidas y a la vez generen ingresos económicos.

La piscicultura en el departamento del Huila ha aumentado el 21,5 % durante en el periodo comprendido de 2003 a 2011, y actualmente continúa en ascenso, considerándose una de las apuestas productivas del Huila definidas en la Agenda Interna de Productividad y Competitividad del Departamento, hasta el punto de convertirse en potencia nacional en producción y exportación de tilapia, según lo indica la cadena acuícola del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

En el 2013 la piscicultura aumentó un 10,24 %, en comparación con el 2011, ascendiendo la cifra de producción a 37.069 toneladas, ocupando así el primer puesto, seguido por Meta, Tolima y Antioquia, con 12.667, 5.515 y 4.767 toneladas, respectivamente, según el reporte del Ministerio de Agricultura.

La producción nacional durante el año 2014 fue de 88.871 toneladas, donde el Huila aportó el 41,71%, de los cuales el aprovechamiento en carne es del 25 %, dejando así el 75 % en subproductos que comprenden vísceras, esqueletos y escamas.

Debido a que existe gran demanda y oferta de peces para consumo humano, y que la generación de subproductos puede afectar el medio ambiente, se están implementando distintos métodos en los cuales se aproveche y se genere valor agregado a estos subproductos, entre los que se destacan la extracción de aceite a partir de las vísceras y la elaboración de concentrado para animales empleando los esqueletos.

Respecto al aprovechamiento de las escamas no se poseen conocimientos sustanciales y precisos de productos o procesos concretos; sin embargo, se conoce que en instituciones y centros de desarrollo tecnológico del departamento se adelantan investigaciones para determinar los beneficios y aportes que pueden generar las escamas al sector productivo y las diferentes industrias.

La red Tecnoparque nodo La Angostura es una estrategia del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) para el desarrollo de la innovación; esta institución decide analizar la problemática presentada con la disposición de la escamas, situación que genera gran impacto ambiental en cuanto a la generación de olores y lixiviados;

por esta razón se plantea el proyecto "Caracterización por microscopia de fuerza atómica y microscopia electrónica de barrido de la escama de tilapia *Oreochromis sp / niloticus*, que determine su tipo de biopolímero y su implementación en empaques industriales", mediante el cual se busca emplear la nanotecnología como medio para purificar el biopolímero presente en las escamas de la tilapia y utilizarlo en empaques que aporten positivamente al medio ambiente, ya que serán biodegradables.

Existen varios estudios realizados al respecto en el marco de tesis e investigaciones, entre los cuales se destaca el realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana de México en el 2012, donde se estableció un proyecto para crear un bioproceso para la obtención de quitina y quitosano a partir del exoesqueleto del camarón; de igual forma, durante el año 2012 en la Universidad de Madrid se constituye el proyecto "Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria". En estos procesos se analizó el quitosano, que es el segundo biopolímero más abundante en el planeta después de la celulosa. Las aplicaciones fueron vinculadas a caparazones de crustáceos, y debido a que la consistencia de este material posee cierta relación en su estructura con las escamas del pescado de agua dulce, se presume que el quitosano se encuentra presente también en ellas, lo que se pretende comprobar mediante la implementación de análisis nanométrico, después de realizar un proceso de purificación del polímero.

El quitosano es implementado en industrias como la alimenticia, la farmacéutica, la agroindustrial, entre otras, pues se trata de un material muy versátil. Para este caso, el uso que se plantea dar a este polímero, como el proyecto lo indica, es el de implementarlo en empaques de alimentos o cualquier otro producto, cumpliendo con la función de almacenarlos protegiéndolos de las condiciones externas que puedan llegar a afectarlo.

Metodología

Para el análisis nanométrico de las muestras de escamas se emplearon dos instrumentos: el microscopio de fuerza atómica y el microscopio electrónico de barrido, que proporcionan información de topografía y morfología,

respectivamente, siendo este último el primer análisis que se realiza con el objeto de determinar a nanoescala la forma que posee el material para determinar su posible repercusión a mayor proporción.

La microscopia de fuerza atómica, a diferencia de la microscopia electrónica de barrido, entra en contacto directo con la muestra, generando distintos factores que determinan resultados verídicos si se lleva a cabo un análisis preciso y con las condiciones apropiadas.

En ambos casos se presentan momentos en los cuales se debe ser muy preciso para no alterar los resultados a obtener; por ejemplo, en la microscopia de barrido es de vital importancia la preparación de la muestra, pues el equipo requiere condiciones especiales como que la muestra se encuentre deshidratada (sin alto contenido de humedad) y sea conductora, y en caso de no ser así, se deberá realizar un procedimiento de modo que facilite el proceso.

Para la microscopia atómica la muestra no requiere condiciones especiales, pero sí se debe tener precisión en los parámetros de lectura que se ingresan y el tipo de materiales que se está empleando.

Para la purificación del biopolímero se realizaron distintos métodos con el objetivo de determinar su eficacia con distintas sustancias químicas (ácidas y bases), y para lo cual se sigue un protocolo establecido con este fin, de modo que facilite las labores.

Purificación del biopolímero

Obtención de la muestra: adquirir las escamas resulta sencillo, pues existen en la región distintas empresas cuyos procesos productivos están relacionados directamente con la piscicultura; para esto se elige una cantidad considerable de la muestra establecida en el protocolo, la cual se procesa y analiza para el desarrollo del proyecto.

La especie de tilapia con la que se ejecuta el proyecto es la nilótica, denominada así debido a que es originaria del Río Nilo. La identificación de la especie se realizó teniendo en cuenta que las tilapias de mayor producción son la *Oreochromis sp* (conocida comúnmente como mojarra roja) y la *Oreochromis niloticus* (denominada mojarra negra).

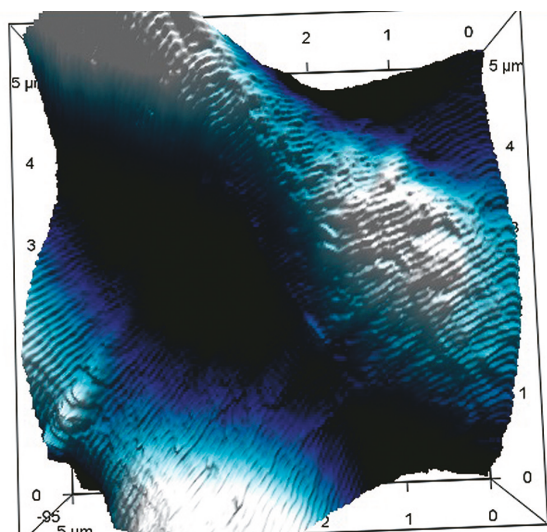
Las escamas que presentan estas especies son de tipo ctenoide (ver Figura 1) las cuales se caracterizan por poseer pequeñas rugosidades en el borde posterior, lo que les da una textura rugosa, en forma de peine.

Figura 1. Escamas de tilapia y su macro estructura



Lavado de la muestra: cuando la muestra es obtenida en cantidades suficientes o necesarias para continuar con el proceso, se realiza un primer lavado con agua destilada para retirar impurezas (restos de esqueletos, espinas y piel); luego se realiza una desinfección con glutthermaldeído de baja concentración, procedimiento que consiste en sumergir las escamas en una solución de agua con desinfectante y dejarlas allí por algunos minutos; después de esto se retiran las escamas y se drena el agua que haya quedado aprisionada en la muestra.

Figura 2. Imagen de AFM en escama con Fibriles de colágeno



Fuente: Autores

Secado de la muestra: una vez limpias y desinfectadas las muestras, se continúa con el secado de las mismas; para este procedimiento se aplicaron 3 distintos métodos. El primer método consistió en secar las muestras en un horno industrial que alcanzaba temperaturas de $\pm 120^{\circ}\text{C}$, pero que no permitía un control eficaz, obteniendo resultados poco favorables debido a que la muestra cambiaba su color y forma y además perdía sus propiedades adhesivas características. El segundo método consistió en realizar un secado en horno industrial con control de temperatura y tiempo, donde mejoraron las condiciones casi en un 60% y los resultados obtenidos fueron muestras con su color característico y tamaño adecuado que conservaban sus propiedades adhesivas; sin embargo, se presentó una leve complicación: ciertas deformaciones en los extremos de la escama que no cambiaban la estructura general de la muestra. Por último, se llevó a cabo un secado en horno solar, que emplea la luz y el calor del sol para deshidratar muestras teniendo como ventaja el sitio elevado en el cual se encuentra construido, por lo que la luz solar está presente en todo momento durante el día, a lo que se suma el hecho de que el Huila presenta temperaturas ambiente que oscilan entre los 28°C y 30°C , beneficiando el secado de diferentes elementos; al emplear este método los resultados arrojaron muestras con el color apropiado, con tamaño y forma característicos y con propiedades adhesivas presentes, ello con la condición de que el tiempo de secado se extienda hasta en un 300%. Para estandarizar el proceso (y debido a las características presentadas por cada método), se decide trabajar con la segunda opción, es decir, con el horno deshidratador industrial.

Molido de la muestra: para mayor eficacia en el tratamiento, manejo y procesamiento de la muestra es necesario disminuir y estandarizar el tamaño de la partícula; para esto se emplea un molino martillo con malla de 2 mm, en el cual se tritura la muestra hasta obtener diminutas fracciones con dimensiones estandarizadas, logrando mejores resultados en el tratamiento y veracidad de los análisis que se realicen posteriormente.

Desproteínización de la muestra: Basados en imágenes (obtenidas por microscopia de fuerza atómica) de escamas sin ningún tratamiento químico, se presume que poseen contenido de colágeno, proteína en forma de

fibriles (Figura 2) caracterizada por su dureza, y la cual se debe remover para purificar el biopolímero presente; un modo de hacer esto es empleando una solución ácida, para lo cual las muestras obtenidas se sumergen en ácido clorhídrico durante 24 horas a temperaturas de 30 °C, luego se lleva a cabo un segundo secado a 80 °C por 4 horas, y en cuanto se haya culminado este proceso se podrá hablar de quitina cruda, que es un polímero que requiere de un segundo proceso para llegar a ser quitosano.

Desacetilización de la muestra: el quitosano es la forma desacetilizada de la quitina, y para lograr obtenerlo se requiere emplear soluciones bases que cumplen con la función de remover sales (elemento innecesario que debe ser eliminado para la purificación del biopolímero); por esta razón, en el desarrollo del proyecto y procesamiento de la muestra se emplea hidróxido de sodio (0,1 N) sustancia donde se sumerge la muestra por 30 minutos a 95 °C, posteriormente se realiza un lavado con agua desionizada y un tercer secado a 105 °C durante 24 horas, luego de esto se podrá hablar de quitosano; los resultados obtenidos deberán corroborarse mediante análisis fisicoquímicos, de propiedades mecánicas y nanométricos, siendo que las dos últimas se realizan en equipos nanotecnológicos como el AFM (microscopio de fuerza atómica) y el SEM (microscopio electrónico de barrido).

Tratamientos: la eficacia de un procedimiento se determina, la mayoría de veces, comparando resultados con otros factores similares; por tal motivo, se toma la decisión de proceder en cinco pasos:

- **Paso uno:** la muestra patrón se toma como referencia para notar las variaciones al momento de realizar los análisis.
- **Paso dos:** consiste en desproteinizar la escama con adición únicamente de ácido clorhídrico.
- **Paso Tres:** la tercera muestra solo se trata con hidróxido de sodio para retirar sales, sin desproteinizar, aunque el colágeno se degrade.
- **Paso cuatro:** el cuarto procedimiento se ejecuta sumergiendo las escamas, inicialmente en solución ácida, después en solución alcalina, como lo indican estudios previos en crustáceos.
- **Paso cinco:** por último, la muestra No. 5 se trata de manera inversa a la numero cuatro, es decir, primero se

aplica la solución base y después el ácido; el objetivo de estos procesos es diferenciar los distintos factores que pueden presentar cada uno de los modelos y así elegir el que presente mejores resultados, además de determinar la importancia de cómo desarrollar el proyecto y su estandarización en la preparación de la muestra.

Figura 3. Muestras con distintos tratamientos



Fuente: Autores

En lo referente al secado, cada una de las muestras presentó variaciones cromáticas según el tratamiento (Fig. 3), lo que lleva a preferir la N° 4 debido a su color característico y propiedades de traslucidez que presenta.

Análisis

En los análisis nanométricos existen diferentes métodos que permiten una lectura detallada y eficaz de muestras; para dichos procedimientos existen equipos especializados en distintos ámbitos, tales como el microscopio de fuerza atómica (Figura 4) y el microscopio electrónico de barrido (Figura 5). Para este último, los requerimientos de preparación de la muestra antes de la lectura son exigentes, debido a que el equipo funciona mediante la acción de vacío e inyectando electrones que viajan a alta temperatura a través de una cámara, razón por la cual la muestra debe ser conductora ya que las muestras orgánicas, por la alta temperatura, se incineran, y cuando tienen este origen resulta necesario realizar un tratamiento especial que consiste en recubrir la mues-

tra con materiales conductores (como el oro, la plata, el carbono o el argón); el elemento elegido se aplica como recubrimiento mediante la acción del equipo conocido como sputter (y el proceso derivado de él denominado sputtering), el cual, ejerciendo vacío, recubre la muestra y deja una fina capa, permitiendo así que la muestra se torne conductiva y conserve su forma, al mismo tiempo que proporciona las condiciones apropiadas para la lectura en el microscopio electrónico de barrido.

Figura 4. Microscopio de fuerza atómica



Al realizar lecturas en el microscopio de fuerza atómica (AFM) se puede determinar topografía y propiedades mecánicas; la muestra no debe poseer condiciones especiales pero los parámetros de lectura, calibración, estado del equipo e implementos de trabajo son de vital importancia.

Resultados

Dentro de los resultados obtenidos se destacan imágenes de los distintos métodos que se ejecutaron y sus variaciones según el tratamiento.

Figura. 6 Imagen en AFM de la escama

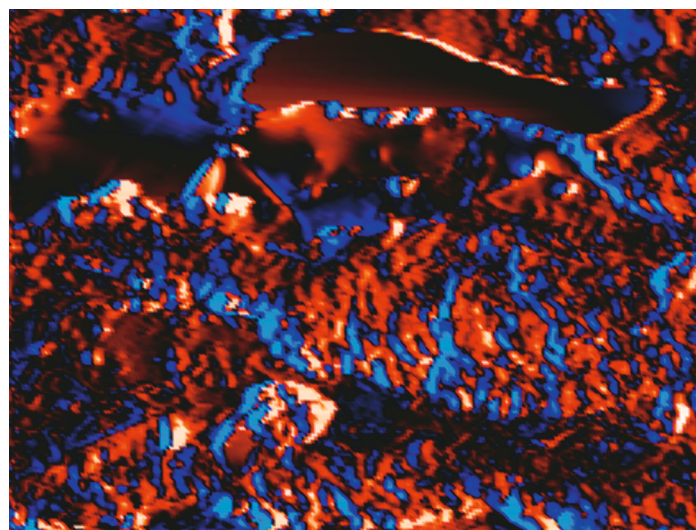


Figura 5. Microscopio electrónico de barrido



Figura 7. Imagen muestra No. 2 - HCl

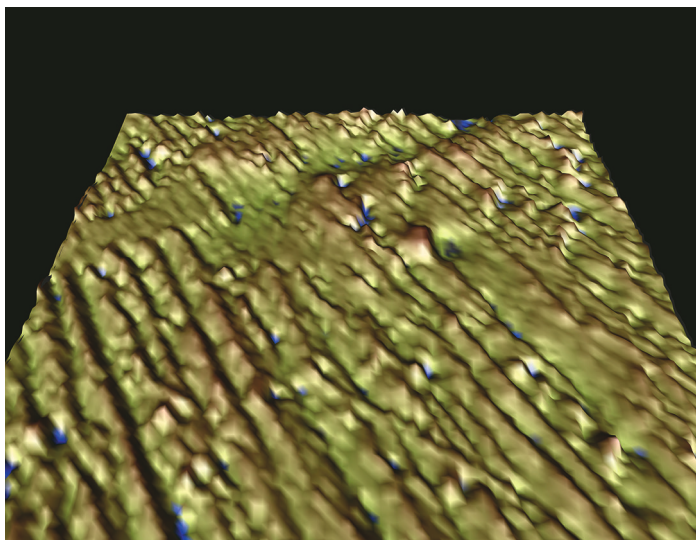


Las imágenes obtenidas de la muestra patrón (Figura 6), en el microscopio de fuerza atómica, denotan una estructura donde aparentemente existen dos materiales, esto debido a la variación de propiedades que se puede observar en el cambio sustancial de color; esto lleva a asumir que los materiales presentes son quitina y quitosano, polímeros de origen natural que desean aprovecharse (según lo establecido en el proyecto) para su implementación en empaques. Este comportamiento genera una reacción favorable para cumplir con el objetivo planteado en principio.

La muestra No. 2, como se esperaba, realizó la remoción de toda la proteína presente en la escama, incluyendo el colágeno; por lo tanto, se observa en la Figura 7 una topografía con efectos de arrastramiento causados por el ácido clorhídrico y, además, se logra observar cómo el adhesivo presente al secarse toma una estructura firme, aportando brillo y transparencia a la escama.

Respecto a la muestra No. 3 (Figura 8), los resultados muestran una estructura con fibriles de colágeno desgastados, ello debido a la adición de ácido clorhídrico (HCl), pero que se encuentran presentes en la escama; a diferencia de la muestra No. 2, sí se presenta proteína, pues el hidróxido de sodio cumple con la función de eliminar sales.

Figura 8. Muestra No. 3 - NaOH



En la muestra No. 4 (Figura 9), como se esperaba y según lo planteado en bases teóricas de estudios realizados previamente (utilizando materiales similares a las escamas, como caparazones de crustáceos), se observan formaciones de materiales que presentan estructura polimérica, siendo aparentemente elásticos y flexibles; además, se observa este material como único en la muestra, lo que denota la efectividad del tratamiento.

Figura 9. Muestra 4: HCl + NaOH

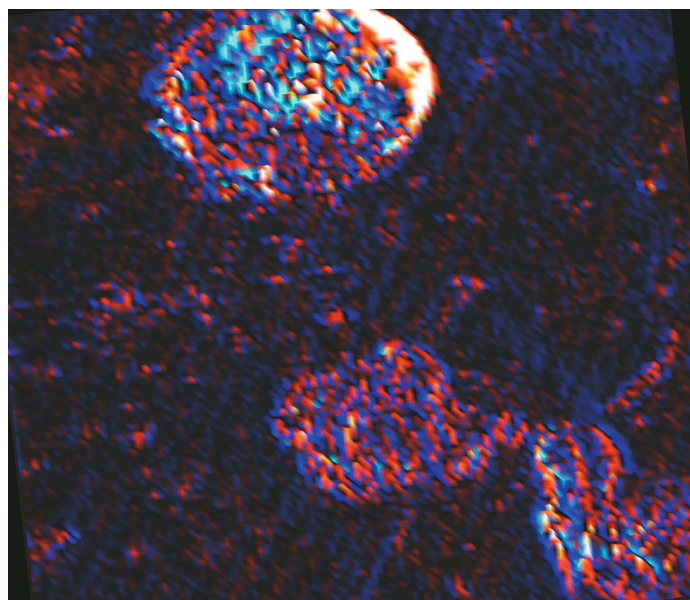
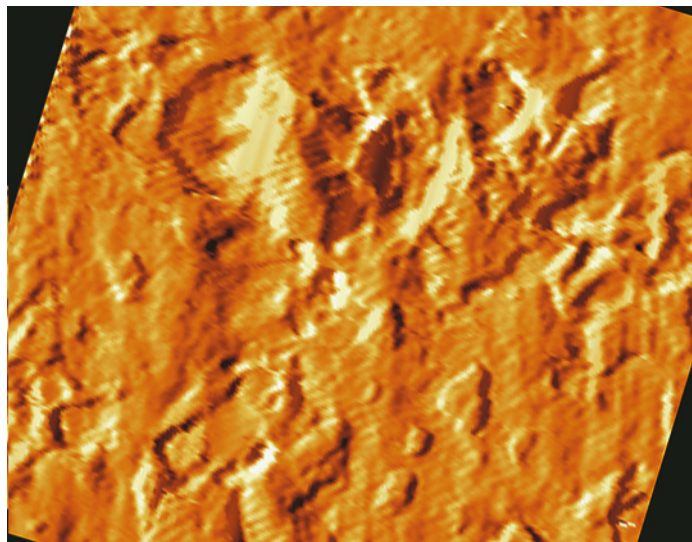


Figura 10. Muestra 5: NaOH + HCl



Las imágenes obtenidas de la muestra No. 5 (Figura 10) indican que el material presente allí también se encuentra en estado puro, pero que presenta características rígidas y aparentemente duras, lo que ocasionaría que el producto final se quiebre o presente defectos. Apartir de los resultados obtenidos se establece que, para la estandarización del procedimiento, la viabilidad se encuentra en el proceso ejecutado a la muestra No. 4; tomada esta decisión, se continúa con la elaboración del prototipo final, el cual se lleva a cabo sometiendo las escamas a alta temperatura y provocando un derretimiento para después moldear y/o formar films de quitosano.

Distintas investigaciones, como la ejecutada por el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de Cuba, arrojaron resultados favorables en cuanto a la obtención de quitosano a apartir del exoesqueleto de la langosta, obteniendo primero quitina, que posteriormente fue tratada con una solución alcalina a altas temperaturas para desacetilizarla y transformarla en quitosano; una vez realizado el proceso, se llevaron a cabo distintos análisis como cenizas, humedad, microscopia infraroja y microscopia electrónica de barrido, donde los resultados dieron como conclusión que este material cumplía con las características para ser implementado en la industria farmacéutica.

Adicional a esto, la universidad de Zulia, en un estudio de quitosano, determinó la versatilidad de este biopolímero y su implementación en distintas industrias, que cuenta entre sus aplicabilidades con el uso como aditivo alimentario, la elaboración de recubrimientos, la purificación del agua y el control de plagas para la agricultura. La Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, también logró desarrollar un ungüento con este biopolímero para aplicar en heridas y ampollas, que se caracteriza por su efectividad en la sanación.

Los antecedentes del proyecto brindan la confianza para el éxito del mismo, y conociendo las propiedades del material y sus aplicaciones se establecen las variaciones y factores relacionados para el producto final propuesto en la investigación.

El desarrollo del proyecto brinda una alternativa de solución para las empresas del departamento vinculadas a la cadena acuícola en el aprovechamiento de subpro-

ductos, enfatizando en el uso de las escamas. Todo esto empleando la nanotecnología (ciencia emergente) como medio para cumplir con los objetivos trazados y con el fin de buscar ese factor de innovación y desarrollo para la región.

Bibliografía

- (s.n.). (s.f.). *Acuerdo de la competitividad de la cadena de la piscicultura en Colombia*. Recuperado de http://www.huila.gov.co/documentos/A/Acuerdo_Nacional_Piscicola.pdf
- Albarracín, W. & Valderrama, N. (s.f.). Inclusión de compuestos químicos en matrices poliméricas de quitosano y su efecto en las propiedades de película. Universidad de Antioquia. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 21(1). Recuperado de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/15320/16258>
- Alzate, L. Valencia, M. & Cuervo R. (2013). Extracción y caracterización de quitosano a partir del hondo A. Níger para andamios como soporte para el crecimiento de tejidos. *Revista colombiana de materiales*.
- C. Lárez (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química*.
- Delgado, M., Ulloa, C. & Ramírez, J. (2015). *La economía del departamento del Huila: Diagnóstico y perspectivas a mediano plazo*. FEDESERROLLO.
- Gacén, J. & Gacén, I. (1996). *Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles*, Boletín Intexter.
- García, T. & Roca, J. (2008). Industrialización de los crustáceos para la obtención de quitosano en ungüento con efecto cicatrizante. *Revista de la facultad de ingenierías*, 11(2).
- Gobernación del Huila (2007). *Agenda Interna del Huila para la productividad y la competitividad*.
- Gobernación del Huila (s.f.). *Informe cadena piscícola del Huila*. Recuperado de <http://www.huila.gov.co/documentos/I/INFORMECADENAPISCICOLAHUILA.pdf>
- Merino, M.C., Bonilla, S. & Bages, F. (2013). *Diagnóstico del estado de la acuicultura en Colombia*. Autoridad

Nacional de Acuicultura y Pesca (AUNAP).

Mican, J. & Arias, P. (s.f.). *Acuicultura*. Sistema de información de gestión y desempeño de organizaciones de cadenas. Ministerio de agricultura. Recuperado de <http://sioc.minagricultura.gov.co/index.php/art-inicio-cadena-acuicultura/?ide=51>

Montoya, A. (2014). Piscicultura huilense creció 10,24%. *La Nación*. Recuperado de <http://www.lanacion.com.co/index.php/economica/item/230914-piscicultura-huilense-crecio-10-24>

N. de la Paz, M. Fernández, O. López...D. Díaz (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*. Vol. 13(3).

Z. Mármol, G.Paez, M. Rincón...E. Gutiérrez (2011). Quitina y quitosano, polímeros amigables. Una aplicación a sus aplicaciones. *Revista tecno científica URU* (N°1 Julio).