

## Colorante luminiscente superpurificado a base de fosfato de gadolinio dopado con europio en ácido carmínico para tinción histológica

C.Y. Eslava Monroy<sup>1</sup>, G.G. Sánchez Gutiérrez<sup>1</sup>\*, V.T. Promontor Gómez<sup>1</sup>,  
A. Garrido Hernández<sup>2</sup>, L. E. Chávez Güitrón<sup>2</sup>, L. Flores-Alatorre Hernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>División de Procesos Industriales, Universidad Tecnológica de Tecámac, Carretera Federal México-Pachuca km. 37.5, Predio Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México, 55740, México. yahireslava@outlook.es, sgggpe170198@gmail.com, vtpg1998@gmail.com.

<sup>2</sup>División de Biotecnología, Universidad Tecnológica de Tecámac, Carretera Federal México-Pachuca km. 37.5, Predio Sierra Hermosa, Tecámac, Estado de México, 55740, México. agarridoh@uttecamac.edu.mx, lrxhavez@yahoo.com, floalae@hotmail.com.

\*Autor de correspondencia: sgggpe170198@gmail.com

### RESUMEN

En los estudios histológicos es indispensable que las muestras exhiban una coloración para identificar sus componentes, por ello, es necesario el uso de tintes. En la actualidad, se emplean colorantes que generan residuos, son tóxicos y no son correctamente tratados para su deshecho. La respuesta a esta problemática, es la elaboración de nuevas sustancias, con una igual o mayor capacidad de tinción y afinidad a ciertos componentes de la célula. En este trabajo se presenta el desarrollo de un colorante elaborado a base de la dispersión mediante cavitación acústica, de fosfato de gadolinio dopado con europio ( $\text{GdPO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ), un nanocompuesto cerámico biocompatible y con propiedades fluorescentes que, al estar inmerso en ácido carmínico, un extracto de grana cochinilla (*Dactylopius coccus costa*) con alta capacidad tintorea y fijación de color, forman un tinte histológico capaz de generar mayor contraste en la muestra para el óptimo estudio de las subestructuras celulares. En los análisis de caracterización realizados (DRX, FT-IR y MEB) se muestran datos característicos del material sintetizado, corroborando sus propiedades estructurales y morfológicas, se reportan evidencias de microscopías ópticas realizadas en muestras de tejido bajo diferentes condiciones de teñido, que permiten comparar su acción tintorea, con el puro extracto y el tejido sin colorante; mostrando la afinidad que tiene y la eficacia para mantener el color por largos periodos de tiempo, demostrando que es posible la utilización de materiales biodegradables para la sustitución de sustancias tóxicas utilizadas en la actualidad en el área de la medicina y salud.

**Palabras Clave:** Colorante, Histología, Fosfato de gadolinio dopado con europio, Ácido carmínico, Tinción.

### 1. INTRODUCCIÓN

La histología y el desarrollo de nuevos materiales a base de nanotecnología se han convertido en herramientas importantes en el área médica clínica para el conocimiento y diferenciación de estructuras subcelulares; para realizarlo, se tiñen las muestras proporcionando un contraste de color en ellas que facilita su estudio, arrojando resultados de fácil interpretación [3]. No obstante, los colorantes utilizados en la

actualidad deben de tener un cuidado especial al momento de operar con ellos, además de generar desechos tóxicos que necesitan de un procesamiento final para su disposición final, generando un gasto extra para los laboratorios que trabajan con ellos.

Este trabajo, presenta el desarrollo de una solución alternativa de tinción histológica, que busca sustituir algunos colorantes sintéticos por naturales. Así, el objetivo planteado es la preparación y evaluación de un colorante fluorescente a partir de la dispersión de fosfato de Gadolinio dopado con Europio ( $GdPO_4:Eu^{3+}$ ) en un extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac) para su aplicación en tinción de muestras de tejido animal y vegetal.

El fosfato de Gadolinio dopado con Europio ( $GdPO_4:Eu^{3+}$ ), es un compuesto biocompatible, capaz de presentar fluorescencia bajo una longitud de onda de 254 nm al ser elaborado vía hidrotermal, mientras que, el extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac), es usado en la biología molecular por su alta fijación de color, para ver proteínas de nitrocelulosa sobre membranas celulares [2]; mejorando los resultados en estudios histológicos al propiciar la identificación de estructuras celulares; entregando mejores resultados debido al contraste de tonalidades que presenta, sin generar residuos que deban ser procesados y desechados; anulando su contaminación al medio ambiente y manteniendo la integridad del laboratorista intacta.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Para la preparación del colorante histológico a base de  $GdPO_4:Eu^{3+}/Ac$  se llevaron a cabo cinco procedimientos, donde se obtuvieron extractos de grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) conteniendo ácido carmínico a una concentración de 5% vol. Se sintetizó fosfato de gadolinio dopado con europio ( $GdPO_4:Eu^{3+}$ ) vía hidrotermal a pH 1.6 y 6; favoreciendo su dispersión en el extracto por cavitación acústica para formar el tinte, y aplicarlo en muestras biológicas (cavidad oral, raspado cutáneo y tejido animal y vegetal) para observar su comportamiento en cada medio.

### 2.1 Extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac)

Para la obtención del extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac), se utilizaron como reactivos: grana cochinilla seca, alcohol del 96° y agua destilada. Se lavó la grana cochinilla con alcohol hasta retirar por completo la grasa que rodea al insecto (coccerina); dejándose secar durante una hora a 50°C en estufa bacteriológica. Posteriormente, se maceró hasta obtener un polvo fino para mejorar su disolución, luego, el polvo se diluyó a 5%vol. de agua destilada, manteniéndose en agitación a 60rpm y 70°C con el fin de extraer el ácido carmínico del insecto. Acto seguido, se centrifugó a 5 mil rpm por 15 minutos para sedimentar los residuos sólidos. Finalmente, la solución se filtró en papel Whatman 50p, y el colorante se vertió en envases ámbar, que fueron esterilizados a calor húmedo (121°C, 15lbs de presión, 15 min) para evitar el crecimiento de bacterias.

## 2.2 Síntesis de $GdPO_4:Eu^{3+}$ vía Hidrotermal

La síntesis se basó en el método de Garrido (2014), donde se tuvo un mayor control de los parámetros de reacción en la obtención del material, garantizando una pérdida nula de materia gracias a que fue un sistema cerrado. Los reactivos utilizados para la síntesis de fosfato de gadolinio dopado con europio fueron: óxido de gadolinio (99.9%), óxido de europio (99.99%) y fosfato diamónico (99%) como reactivos principales, mientras que agua destilada y glicerol fungieron el papel de solventes. Las condiciones manejadas fueron dos pH uno de 1.6 y otro de 6, a una temperatura de 1000°C por 4 horas al 5% de concentración.

## 2.3 Dispersión de $GdPO_4:Eu^{3+}$ en extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico (Ac)

Los principales reactivos utilizados fueron el  $GdPO_4:Eu^{3+}$  obtenido y el extracto de grana cochinilla que contiene el ácido carmínico (Ac), además de etanol como su disolvente. Se diluyó el Ac en el disolvente a una proporción 1:1. Se agregó el  $GdPO_4:Eu^{3+}$  a una concentración de 5% respecto al volumen de la primera disolución, esta ingresó al ultrasonificador por 30 minutos para su dispersión y homogeneización para su correcta aplicación.

## 2.4 Pruebas de tinción

Se aplicó el tinte en muestras de cavidad oral, raspados cutáneos y tejidos animales y vegetales montados en portaobjetos, a los cuales se le aplicó el puro extracto de grana cochinilla y el colorante dispersado, de tal manera que cubriera por completo su superficie; se dejó actuar por 10 minutos para que se impregnara a las estructuras celulares, luego se retiró el excedente con agua destilada y se dejó secar. Finalmente, los cuatro tipos de muestras obtenidas (sin tinción, Ac y  $GdPO_4:Eu^{3+}/Ac$  pH 1.6 y 6) fueron observadas bajo microscopio óptico para evaluar los cambios presentados en su estructura celular y determinar el comportamiento de cada uno en medios distintos.

# 3. RESULTADOS

## 3.1 ESPECTROSCOPIA INFRAROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) y DRX DE $GdPO_4:Eu^{3+}$ .

En el espectro infrarrojo de la Figura 1, se observan las bandas de absorción centradas a 642 y 518  $cm^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de los enlaces O-P-O asociados al grupo ortofosfato, también se muestra la banda centrada 1000  $cm^{-1}$  que corresponde a 1240 del  $PO_4^{3-}$  [4]. La banda ubicada a 1635  $cm^{-1}$  se les atribuye a los enlaces  $OH^-$ , los cuales están asociados al agua coordinada de la fase hexagonal del  $GdPO_4$  que normalmente se caracteriza por tener 0.0001 mol de  $GdPO_4:nH_2O$ . En la difracción de rayos X de las nanopartículas, todos los picos de difracción se indexan a las fases hexagonales correspondientes a la carta (JCPDS No. 39-0232) esta fase pertenece a la categoría de Rhabdophane [3].

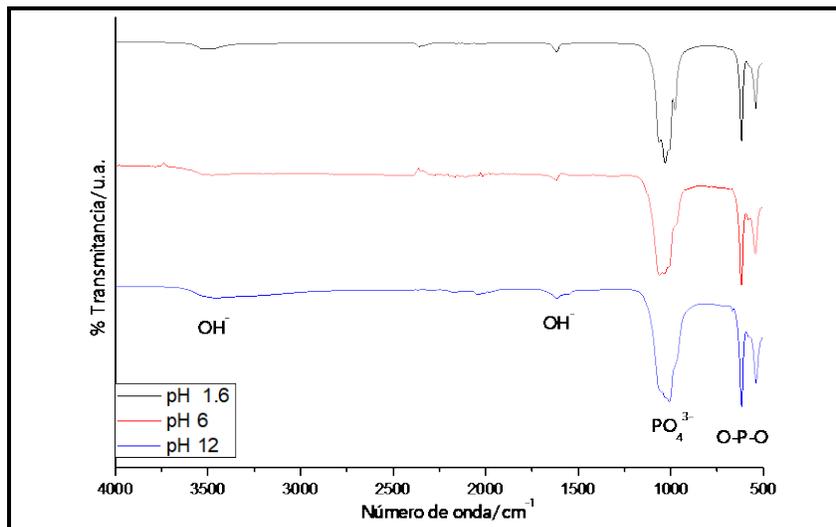


Figura 1. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier de  $GdPO_4:Eu^{3+}$  a) pH 1.6, 6, 12.

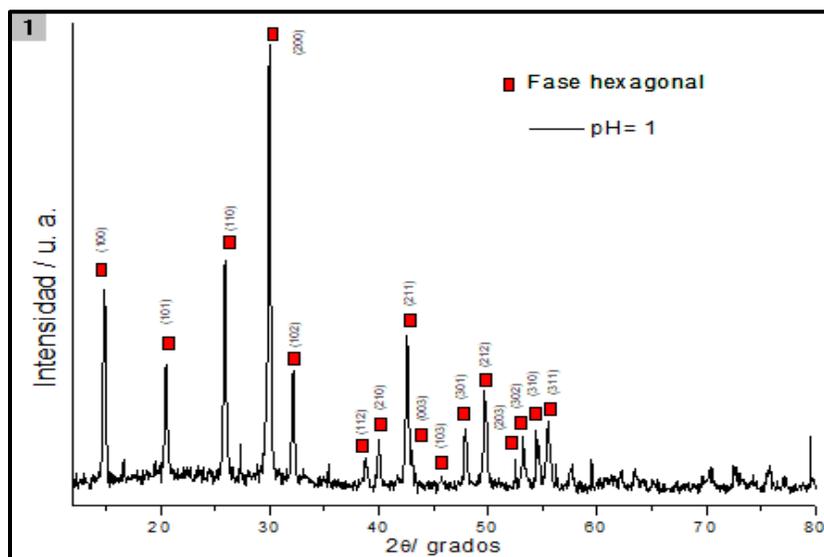


Figura 2. Difracción de polvos de  $GdPO_4:Eu^{3+}$  obtenidos por proceso Hidrotermal.

### 3.2 EVALUACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE $GdPO_4:Eu^{3+}$ / ETANOL.

Normalmente las partículas que tienen alta energía superficial tienden a aglomerar las nano partículas. Esto se deriva del pequeño tamaño que tienen, ya que su superficie específica es extremadamente elevada, lo que origina una retribución de los átomos incrementando la fracción de átomos encontrados en la superficie. Las partículas individuales se mantienen unidas debido a fuerzas de atracción de diversa naturaleza fisicoquímica, que incluyen las fuerzas de van Der Waals y de tensión superficial. Se

han de vencer estas fuerzas por lo que en la actualidad se ocupan métodos de dispersión los cuales ayudan a que las partículas rompan estas fuerzas intermoleculares. (la redacción es perfectible)

Uno de ellos es la ultrasonificación la cual aporta una eficiencia a la hora de separar las partículas ya que al variar el tiempo y la temperatura los aglomerados van perdiendo su energía y por ello al conjuntarse con el extracto de grana cochinilla genera homogeneidad que ayuda a la aplicación del tinte.

Los polvos de  $(\text{GdPO}_4:\text{Eu}^{3+})$  presentaron morfología esférica a un pH 6 que ayudaron a una dispersión homogénea, resultando en una solución coloidal; además de mantenerla intacta en el proceso, indicando que no ocurre reacción química alguna en el tinte.

La morfología obtenida al tener un pH de 1.6 es de nanorodillo el cual tiene la capacidad de tener una mayor energía de superficie por lo que al disminuirla con un tratamiento de dispersión aporta mayor afinidad celular en hisopados orales.

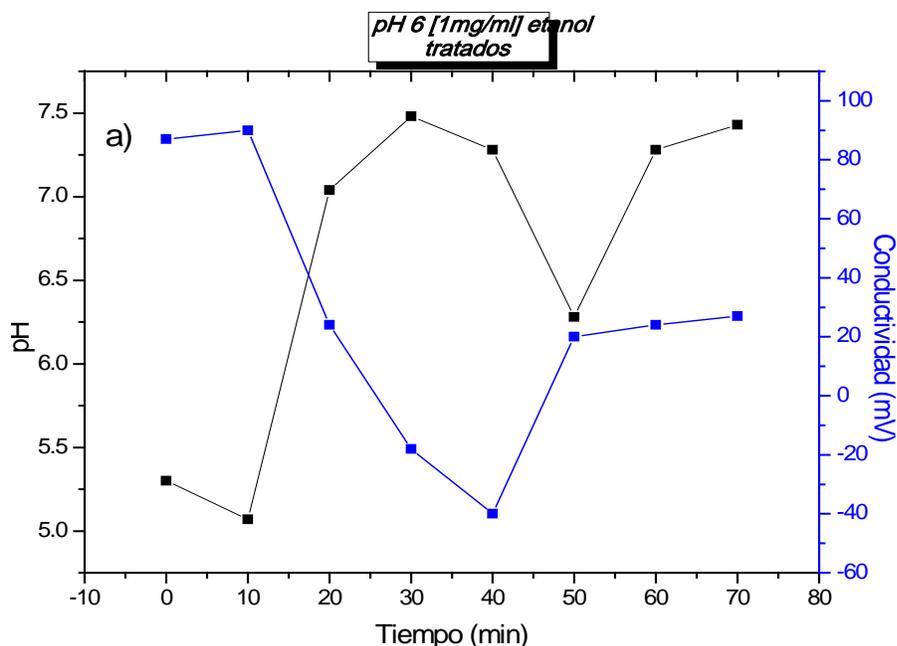


Figura 3. Evaluación de la dispersión de fosfato de gadolinio dopado con europio en etanol.

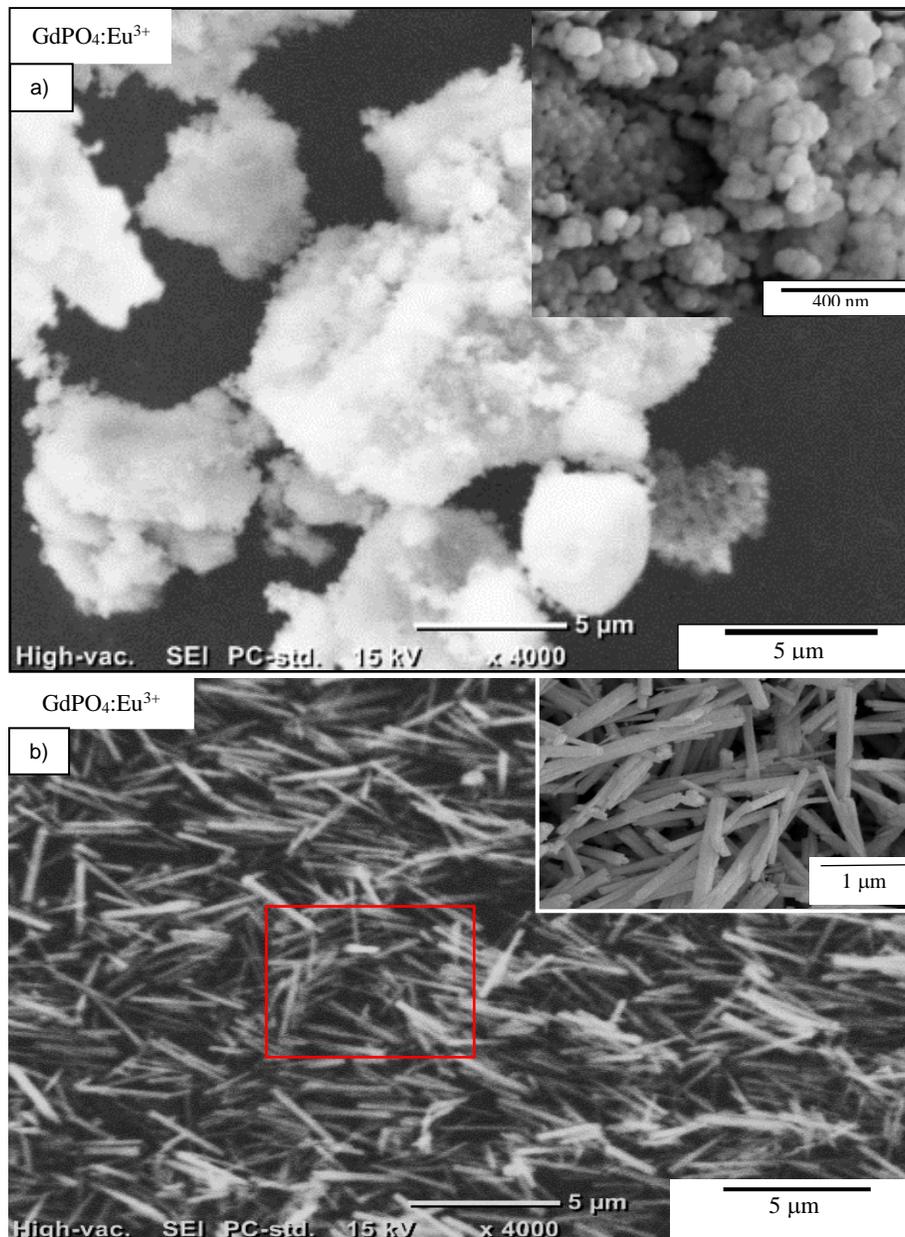


Figura 4 Microscopía electrónica de barrido de  $GdPO_4:Eu^{3+}$  a) pH 12 b) pH 1.6.

### 3.3 HISOPADO ORAL, RASPADOS CUTANEOS, TEJIDOS ANIMALES Y VEGETALES.

Las muestras de los hisopados se realizaron por triplicado, donde las variables a comparar fueron las soluciones utilizadas para teñir y la capacidad de fijación del tinte a las células de las muestras. Originalmente, las células de la cavidad oral, al igual que las de la mayoría de nuestro organismo, no presentan coloración propia, como se observa en la Figura 5 (a) el comportamiento del extracto de ácido carmínico en el exudado se observa en la Figura 5 (b) que muestra una coloración anaranjada tenue que no cubre completamente la zona de la membrana celular, indicando un posible cambio en el pH del reactivo al entrar en contacto con la célula permitiendo visualizar la

células y los límites entre ellas sin marcar un contraste que permita distinguir subestructuras subcelulares, demostrando que el ácido carmínico tiene adherencia a las células. Con la aplicación del colorante  $GdPO_4:Eu^{3+}/Ac$  a pH 1.6 se aprecia una gran diferencia en la tinción de las células, debido a que el color abarca toda el área celular, concentrándose en el núcleo al mostrar diferente tonalidad, permitiendo diferenciarlo de la membrana celular; evidenciando que el fosfato de gadolinio dopado con europio cumple un papel fundamental en la fijación del color a la célula animal, al transportar el color a través de la membrana y evidenciando la estructura del núcleo Figura 5 (c). Cabe mencionar que los resultados presentados hasta el momento sólo corresponden a dos de los tres pH mencionados en la metodología, que serán realizados en el periodo faltante.

Las tinciones muestran gran diferencia de coloración y contraste, evidenciando la relación que lleva el pH con el comportamiento de éste. En la Figura 6 (a) se tiene la microscopía de la muestra cutánea sin teñir, donde se distinguen los espacios entre cada célula, mientras que en la muestra teñida con extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico presentada en la Figura 6 (b), se distingue con mayor facilidad el perímetro de las membranas celulares dejando su interior sin teñir a excepción del núcleo que se logra ubicar como concentraciones pequeñas del colorante que contrastan con el entorno, permitiendo incluso el conteo de células por unidad de área si así el estudio lo requiriera. Cuando se agrega el colorante de  $GdPO_4:Eu^{3+}/Ac$  con pH=1.6 en la Figura 6 (c) se logró una coloración uniforme de toda la membrana celular con un gran contraste para la parte de su núcleo, siendo hasta el momento, uno de los más óptimos resultados obtenidos a comparación de la Figura 6 (d) donde es la misma sustancia solo con la variable del pH con valor de 6, en el cual no es posible visualizar con detenimiento la célula ni alguna de sus subestructuras.

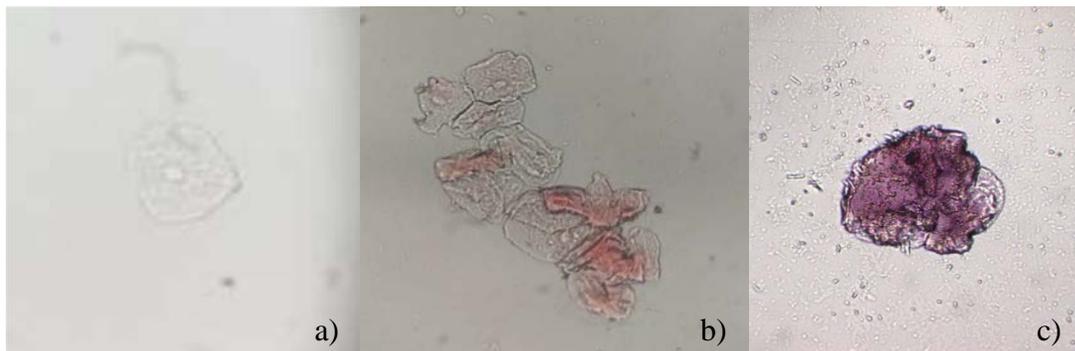


Figura 5. Tinción de exudados de cavidad oral. a) Exudado de cavidad oral sin teñir, 40x. b) Exudado cavidad oral teñido con extracto de grana cochinilla que contiene ácido carmínico al 5% de concentración, 10x. c) Exudado cavidad oral teñido con colorante histológico biocompatible  $GdPO_4:Eu^{3+}$  pH=1.6 40x.

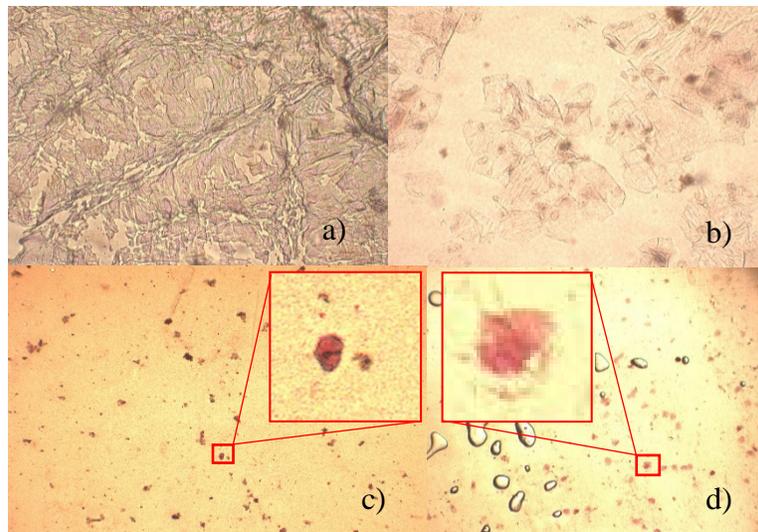


Figura 6. Tinción de raspados cutáneos. a) Raspado cutáneo sin teñir, 40x. b) Raspado cutáneo teñido con extracto de gadolinio que contiene ácido carmínico al 5% de concentración, 10x. c) Raspado cutáneo teñido con colorante histológico biocompatible  $GdPO_4:Eu^{3+}$ , pH=1.6, 4x-40x. d) Raspado cutáneo teñido con colorante histológico biocompatible  $GdPO_4:Eu^{3+}$ , pH=6, 4x-40x.

Los cortes histológicos vegetales, el colorante de a pH 1.6 afecta la estructura celular de la planta, dejando residuos de éste en las cavidades que antes formaba la red de células del tejido como se observa en la Figura 7 (a) en comparación del colorante a pH 6 en la Figura 7 (b), donde la estructura se mantiene intacta sin alguna alteración en la morfología del tejido, concentrándose en mayor cantidad en los espacios entre cada célula.



Figura 7. Tinción de corte de tejido vegetal. a) Corte de tejido vegetal teñido con  $GdPO_4:Eu^{3+}$ , pH=1.6, 40x. b) Corte de tejido vegetal teñido con  $GdPO_4:Eu^{3+}$  pH=6, 40x.

En los cortes animales, ocurre el mismo fenómeno que en los vegetales a menor proporción, sin embargo, la afectación al tejido es evidente al comparar la Figura 8 (a) que contiene el pH de 1.6 donde el área superficial es afectada en gran proporción en comparación con la Figura 8 (b) que contiene el pH de 6 donde la superficie se tiñe sin problema alguno por la afinidad de pH que cada tinte presenta.

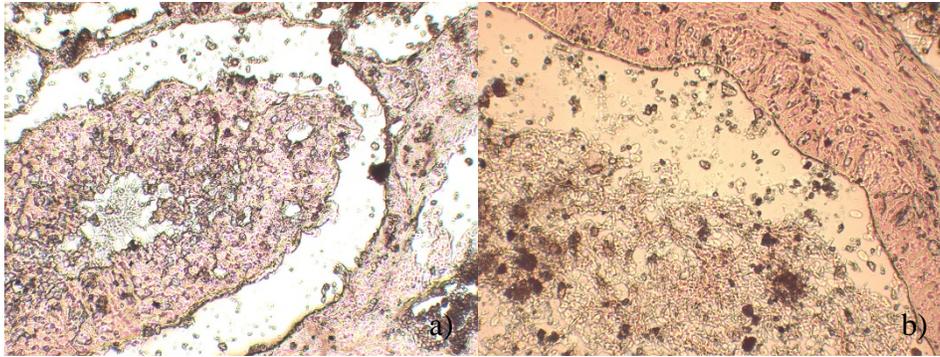


Fig. 8 Tinción de corte de tejido animal. a) Corte de tejido animal teñido con  $GdPO_4:Eu^{3+}$ ,  $pH=1.6$ , 40x. b) Corte de tejido animal teñido con  $GdPO_4:Eu^{3+}$   $pH=6$ , 40x.

#### 4. CONCLUSIONES

Las nanopartículas cumplen la función de transporte de la molécula de Ac, debido a su morfología; ayudando a entrar en la membrana para facilitar la visualización del color del tinte, la morfología de la nanopartícula da una mayor afinidad al núcleo de la célula, tiñéndolo con una tonalidad más oscura y adhiriéndose a la membrana celular de manera homogénea; el tinte presenta una repulsión a las bacterias, rodeándolas por completo.

La capacidad de fijación del tinte a las células de las muestras fue efectiva. Las muestras teñidas con ácido carmínico son de menor calidad que las que están con el compuesto ya que éste tuvo mayor capacidad tintórea.

Las nanopartículas al ser dispersas en etanol logran tener mayor estabilidad coloidal y ocasiona que el tinte tenga una homogeneidad por tiempo prolongado.

#### AGRADECIMIENTOS

A nuestros asesores por creer en nuestra capacidad y darnos la oportunidad de seguir creciendo como personas y estudiantes. A nuestros profesores de carrera, por brindarnos los conocimientos necesarios que fueron clave para llegar al nivel en el que estamos. Finalmente, a nuestras familias por darnos la vida y apoyarnos en esta gran travesía del conocimiento.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] Garrido Hernández , A. *Síntesis de fosfatos de lantánidos para aplicaciones en iluminación* . Instituto Politécnico Nacional.México. (2014).
- [2] Méndez , A. *Ácido carmínico*. Instituto Politécnico Nacional.México. (2013).
- [3] Ouhaïd Hessissen, A. *Nanotecnología y sus aplicaciones en microbiología* . Sevilla : Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia. (2016).