



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Afinidad tintorial del Achiote (*Bixa orellana*) al 5%, en
reemplazo de la Eosina en la técnica de coloración
Hematoxilina-Eosina, en tejidos de hígado de ovino-
Cajamarca**

TESIS

Para Optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentada por la Bachiller
MIRIAM NOEMÍ MESTANZA LLANOS

Asesores
M.Cs. M.V. Raúl Alberto Barrantes Heredia
Blgo. Wálter La Torre Cabanillas

CAJAMARCA - PERÚ

2019



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS


En Cajamarca, siendo las diez horas con quince minutos del veintiseis de diciembre del dos mil dieciocho, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “**César Bazán Vásquez**” de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada: “**AFINIDAD TINTORIAL DEL ACHIOTE (*Bixa orellana*) AL 5%, EN REEMPLAZO DE LA EOSINA EN LA TÉCNICA DE COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA, EN TEJIDOS DE HÍGADO DE OVINO - CAJAMARCA**”, asesorada por los docentes: **M.Cs. M.V. Raúl Alberto Barrantes Heredia** y el **Blgo. Wálter La Torre Cabanillas**, y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **MIRIAM NOEMÍ MESTANZA LLANOS**.

Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación, y para los efectos del caso se invitó a la sustentante a exponer su trabajo.

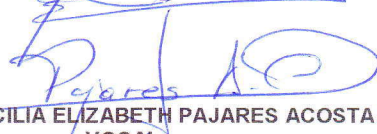
Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del Jurado Calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes, relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el Presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.


Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el Jurado Calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el Calificativo Final obtenido de **QUINCE (15)**.

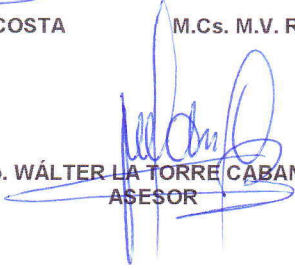
Siendo las once horas con treinta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


Dr. JORGE EDUARDO BURGA LEÓN
PRESIDENTE


Dr. JORGE BERNARDO GAMARRA ORTIZ
SECRETARIO


Dra. CECILIA ELIZABETH PAJARES ACOSTA
VOCAL


M.Cs. M.V. RAÚL ALBERTO BARRANTES HEREDIA
ASESOR


Blgo. WÁLTER LA TORRE CABANILLA
ASESOR



DEDICATORIA

A mis padres: **RICARDO Y ADELAIDA**, por el apoyo moral y económico, que me brindan diariamente, sin su ayuda no fuera posible llevar a cabo mis aspiraciones de superación personal y profesional.

A mi hija **ANA GABRIELA**, fuente de mi superación, su cariño y amor hacia mi persona, despierta responsabilidad para ser mejor cada día como profesional en el campo de las ciencias biomédicas.

A mis hermanos: **AIDHE Y EDUARDO**, por creer en mí, por depositar su confianza en los años universitarios y llegar a ser una profesional en beneficio de la sociedad y del país.

MIRIAM NOEMÍ



AGRADECIMIENTO

A Dios, por acompañarme y protegerme en los momentos más difíciles de mi vida, por cuidar de mi familia para permanecer en la fe, gracias a su amor tuve la sabiduría necesaria durante todos los años de estudiante universitaria para poder alcanzar una profesión digna como Médico Veterinario al servicio de la sociedad.

Al M.Cs. M.V. Raúl Barrantes Heredia y al Blgo. Wálter La Torre Cabanillas, Docentes de la Universidad Nacional de Cajamarca, profesionales capacitados que me brindaron el apoyo y la orientación durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A los señores administrativos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por el apoyo que recibí durante mis estudios.

MIRIAM NOEMÍ



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en Cajamarca-Perú, con el objetivo de determinar la afinidad tintorial del Colorante Natural Achiote (*Bixa orellana*) al 5%, en reemplazo de la Eosina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de hígado de ovino. El colorante se obtuvo en el Laboratorio de Química y Ciencias Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca. Se utilizaron 10 muestras de hígado, las que fueron obtenidas de 10 ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca. La coloración se realizó en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Educación de la Universidad Nacional de Cajamarca. Los resultados muestran mala calidad en la tinción, no se observa contraste alguno entre las estructuras celulares; el tejido estromal, parénquima hepático y vasos sanguíneos del hígado de ovino, no tienen afinidad al colorante *Bixa orellana* (Achiote) al 5%, mostrándose en su totalidad de color azul con afinidad solamente al colorante Hematoxilina. Se concluye que el uso de la *Bixa orellana* (Achiote) al 5%, como reemplazo de la Eosina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de hígado de ovino, no muestra afinidad tintorial.

Palabras claves: Coloración, Hematoxilina, *Bixa Orellana*, Achiote, hígado, ovino.



ABSTRACT

The present research work was carried out in Cajamarca-Peru, with the objective of determining the dyeing affinity of the Natural Achiote Dye (*Bixa orellana*) at 5%, in Eosin Replacement in the Hematoxylin-Eosin Coloring Technique, in Liver Tissues Sheep. The dye was obtained in the Laboratorio de Química y Ciencias Dinámicas of the Universidad Nacional de Cajamarca. In using 10 liver samples, which obtained 10 sheep slaughtered in the Camal Municipal de Cajamarca. The coloring was done in the Biology Laboratory of the Facultad de Educación of the Universidad Nacional de Cajamarca. The results indicated poor quality in staining, no contrast is observed between cell structures; the stromal tissue, the hepatic parenchyma and the blood vessels, the sheep liver have no affinity to the 5% *Bixa orellana* (achiote) dye, showing in its entirety blue with affinity only to the Hematoxylin dye. It is concluded that the use of 5% *Bixa orellana* (Achiote), as a replacement for Eosin in the Hematoxylin-Eosin Staining Technique, in sheep liver tissues, does not show tintorial affinity.

Keywords: Coloration, Hematoxylin, *Bixa Orellana*, Achiote, liver, sheep.



ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
OBJETIVOS	02
II. MARCO TEORICO	03
2.1. Base Teórica	03
2.1.1. Colorantes Naturales	03
2.1.2. Bixa Orellana (Achiote)	04
2.1.3. Colorante Natural y su uso en tejidos animales	04
2.1.4. Fijación de tejidos de hígado	07
2.1.5. Principios de tinción	10
2.1.6. Anatomía, fisiología e histología del hígado	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Localización	16
3.2. Materiales	17
3.3. Metodología	18
3.3.1. Obtención del colorante <i>Bixa Orellana</i> (Achiote)	18
3.3.2. Selección de los hígados de ovinos, toma de muestra y fijación	18
3.3.3. Trabajo de Laboratorio	19
3.3.4. Criterios para evaluar la calidad en la tinción	20
IV. RESULTADOS	21



V.	DISCUSIÓN	25
VI.	CONCLUSIONES	27
VII.	REFERENCIAS	28
	ANEXO	30



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los Médicos Veterinarios que se dedican a la educación, han pasado los últimos años evaluando cuidadosamente los procesos de enseñanza y aprendizaje educativo del Médico Veterinario. Dicha evaluación, incluye principalmente, la investigación a través de la histología y fisiología de las estructuras microscópicas que conforman los tejidos y órganos en las diferentes especies animales. Para lograr este objetivo, el investigador Médico Veterinario, hace uso de técnicas histológicas de laboratorio que incluye también, técnicas de coloración especial para detallar constitutivos estructurales del organismo.

Casi la totalidad de colorantes usados en técnicas de estudio histológico son colorantes químicos elaborados en laboratorios modernos y con equipos de alta tecnología, muchos de ellos inocuos para quien los manipula, mientras que otros con gran toxicidad, contaminante ambiental y con un costo económico alto.

Por esta razón, y con el fin de presentar los elementos de organización microscópica de los tejidos, es necesario someterlos a colorantes específicos o combinaciones de éstos, sean colorantes de tendencia basófila o acidófila. En una gran mayoría, son colorantes químicos sin haber hecho uso hasta la actualidad de colorantes naturales de origen vegetal.

En el presente estudio, creemos conveniente utilizar la *Bixa orellana* (achiote) al 5%, como colorante natural de origen vegetal para mostrar si el tejido de hígado de ovino tiene afinidad tintorial al referido colorante.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Determinar la afinidad tintorial del Colorante Natural Achiote (*Bixa orellana*) al 5%, en reemplazo de la eosina en la técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, en Tejidos de Hígado de Ovino-Cajamarca.

1.2. Objetivo Específico

Determinar si la *Bixa orellana* (Achiote) tiene un comportamiento ácido en los tejidos de hígado de ovino.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Base Teórica

2.1.1. Colorantes naturales

Los términos colorantes naturales y tintes naturales hacen referencia a colorantes o tintes derivados de plantas, invertebrados o minerales y, otras fuentes orgánicas como, por ejemplo, los hongos y los líquenes. En China, los colorantes elaborados a partir de plantas, cortezas e insectos vienen utilizándose ya desde hace más de 5000 años en combinación con mordientes para fijar el colorante a la fibra textil, es decir su uso era netamente en la industria textil y en otros pocos casos coloraciones faciales en guerras y rituales religiosos. En la actualidad, los principales tipos de colorantes naturales utilizados en la industria textil son: animales, insecto cochinilla (rojo), orina de vaca (amarillo indio), Insecto laca (rojo, violeta), Cañadilla Murex brandaris (púrpura), Pulpo sepida (marrón sepia). Plantas: Catechu o Clutch tree (café). Para el reñido de lanas se usan plantas de la Patagonia, como el Calafate, Zampa, Vidriera, Yaoyin, Molle, etc. Los frutos, las hojas y las raíces son aquellas partes con propiedades tintóreas. (Rogers, 2005).

2.1.2. *Bixa orellana* (achiote)

a. Taxonomía

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Orden: Malvales
- Familia: Bixaceae
- Género: *Bixa*
- Especie: *B. Orellana*.

b. Origen

América Central y la amazonía

El achiote urucú u onoto (*Bixa orellana*) es una especie botánica arborescente de las regiones intertropicales de América, cultivado específicamente en México, América Central, Colombia, Ecuador, Venezuela, Bolivia, y andes del Perú, desde la época precolombina. De su fruto se obtiene la especia homónima, empleada como colorante y condimento en la comida popular. En México recibe también el nombre común de acotillo. (Cardón, 2007).

2.1.3. Colorante natural y su uso en tejidos animales

Los arqueólogos han hallado evidencia de colorantes textiles del periodo neolítico, adquiridos principalmente de vegetales. A pesar, que los procesos básicos de tención han cambiado ligeramente con el tiempo, poco se hace uso de colorantes naturales en la investigación microscópica de los tejidos de animales, a excepción de la cochinilla utilizado actualmente como colorante en la industria textil, alimenticia, cosmética, y laboratorio. La mayoría de los colorantes naturales son

colorantes vegetales provenientes de plantas (frutos, raíces, bayas, cortezas, hojas, madera), los cuales, desde la antigüedad han sido usados exclusivamente en la industria textil, pinturas corporales y faciales en rituales religiosos, propiedades medicinales, etc. Hasta la actualidad no está reportado el uso del achiote (*Bixa orellana*) como colorante natural en técnicas de tinción de tejidos animales. Por esta razón, no se conoce si los constitutivos microscópicos que forman la estructura de un órgano tienen afinidad tintorial para ser incorporado en técnicas de estudio histológico. (Arroyo, 2008).

a. Descripción y otras denominaciones

En la cultura lusófona, se le llamaba también acafroa (ya que por ser muy colorante recuerda en algo al azafrán aunque el verdadero azafrán da color amarillo) y también colorau (es decir “colorado” con el significado de rojo). Es un arbusto perenne, de 2-4 m hasta 6 m de altura, copa baja y extendida, tallo pardo, ramifica a poca altura. Hojas simples, grandes, de 6-27 x 4-19 cm, y base redondeada o subtruncada, verdosas claras, persistentes, alternas, márgenes lisos, cordadas, de largos peciolo, delgados, glabro, de 3-8 (10) cm de largo, engrosado en los extremos. Flores en ramilletes terminales de panículas, de 5-10 cm de longitud, con pelos glandulares, hermafroditas, blanquecinas a rosadas según variedades, flores de 3-6 cm de diámetro, en pedicelos de 7-16 mm de largo, y un anillo de glándulas debajo del cáliz; éste con sépalos anchos, ovalados a orbiculares, de 1-2 cm de largo, caducos; corola de pétalos muy obovados, de 1-2 cm de largo, rosados a blanco; muchos estambres, y anteras violáceas; florece escalonadamente, comenzando por los capullos terminales. El fruto tiene la forma de una cápsula roja, de 2 a 6 cm de largo, con pelos gruesos espinosos, dehiscente, verdosa oscura a morada, que al madurar pasa a pardo rojizo oscuro. En cada valva hay semillas en número variable (10-50, en relación con el tamaño capsular).

La semilla es comprimida de 5 mm de largo, con tegumento recubierto de una sustancia viscosa rojiza intensa. (Cardón, 2007).

b. Ecología

Soporta temperaturas de 20 a 35°C; y, en altitud, de 100 a 1500 msnm, aunque crece mucho mejor en zonas bajas de no más de 500 msnm, sin heladas; y lluvias anuales de 1000 a 1500 mm. (Cardón, 2007).

c. Usos

Frutos abiertos de onoto con las semillas en su interior. La superficie de su semilla tiene una cubierta resinosa y aceitosa que contiene un pigmento, conocido como annatto, formado fundamentalmente por bixina y otros apocarotenoides. Este pigmento es usado como afrodisiaco colorante y saborizante alimenticio. Se usa frecuentemente en la coloración de quesos, de margarina, mantequilla, arroz, pescado ahumado y condimento de cocina. En el Perú es el condimento principal del famoso plato llamado “pollada”, el achiote aporta el típico color rojizo al platillo. Los pueblos originarios de Centro y Sudamérica lo utilizan como pintura corporal y facial para sus rituales religiosos. El código del colorante es E160b. (Cardón, 2007).

d. Propiedades medicinales

Antiagregante plaquetario, astringente, antiséptico, emoliente, antibiótico, antiparasitario, antioxidante, expectorante, cicatrizante, febrífugo, antidisentérico, diurético, antigonorreico, purgante, desinflamatorio, hipoglucemiante e hipolipeminte, contra dolores de cabeza, neuralgias, irritación, asma, excoiaciones, disnea y pleuresía. La semilla molida es utilizada para tratar sarampión, viruela, afecciones estomacales, enfermedades del riñón, disentería, astringente y ligero purgante. La pulpa se usa en quemaduras y

ampollas. Las hojas actúan contra malestares de garganta, afecciones respiratorias, dolores renales, inflamaciones dérmicas y vaginales, fiebre, hipertensión, vómitos sanguíneos, diarrea, hemorroides, angina de pecho, abscesos, cefalalgia, infecciones de la piel y conjuntivitis. (Cardón, 2007).

2.1.4. Fijación de tejidos de hígado

En el trabajo de investigación de Regalado (2016), se realizó un estudio comparativo de las propiedades de fijación entre la formalina ácida y el alcohol etílico al 80% en tejidos de hígado de conejo-Cajamarca. Realiza su trabajo en hígado de conejo, por considerarlo un órgano parenquimatoso, cuyas estructuras estromales y parenquimatosas están bien definidas y sus elementos celulares en su mayoría son de la misma estirpe, consideraciones tomadas en cuenta para observar los detalles de fijación, y determinar la calidad de la afinidad a los colorantes básicos y ácidos, en este caso empleando la hematoxilina-Eosina, en la Técnica de Inclusión en Parafina.

a. Técnica de fijación histológica

En las técnicas histológicas, se consigue excelentes resultados si las muestras han sido fijadas correctamente. Los compuestos químicos usados en la fijación endurecen el tejido para su corte y permiten que los tejidos tengan afinidad a los colorantes sin que estos presente artefactos en los detalles microscopios.

Dentro de las técnicas de estudio histológico, las soluciones fijadoras se las emplea para conservar estáticamente los elementos celulares y componentes tisulares. Se realiza sumergiendo el tejido en una solución química o física, para obtener muestras de excelente calidad para su estudio correspondiente. Es importante señalar, que a pesar que existe fijadores de uso general, todos ellos, asemejan los mismos

resultados. Si se desea estudiar la estructura de gotas de grasa, fijará los tejidos en formaldehído u otros agentes químicos que estabilicen las grasas, y evitará el empleo de alcohol u otros productos orgánicos que extraigan los lípidos del tejido. Se emplean fijadores que estabilizan o coagulan las proteínas, para preservar la estructura general del núcleo y del citoplasma, que lógicamente contienen sustancias proteicas. Por otro lado, se obtiene mayor resolución y menor distorsión de las estructuras celulares cuando se utilizan fijadores que producen coágulos finos, eludiendo aquellos que lo hacen en forma grosera. El formaldehído, suscita una precipitación proteica, permite alta resolución sin producir distorsión aparente de las estructuras. Determina una fijación tan fina que es el fijador más usado para el estudio microscópico. Es importante destacar que la fijación es a menudo un proceso químico, con efectos de esta índole sobre el tejido. Así los fijadores que contienen metales pesados, como el líquido de Zenker, portador de bicloruro de mercurio, pueden reaccionar con grupos carboxilos de proteínas del tejido e influir en la coloración posterior. Actualmente se dispone de métodos físicos que preservan la actividad enzimática, congelando los tejidos frescos a altas temperaturas. Por lo tanto, la fijación puede ser química, por la inmersión del tejido en una solución de agentes químicos siendo esta la forma más común, o física, sometiendo a la muestra a frío extremo. (Ham, 2005).

b. Fijadores en las técnicas histológicas

Las pequeñas porciones obtenidas de un tejido animal o vegetal, deben prepararse para el estudio microscópico, en condiciones de conservación y excelentemente fijación. Esta fijación debe coagular los soles y conservarlos en su lugar dentro de un tejido, como también conservar las estructuras de su entorno. La fijación suele lograrse sumergiendo pequeñas porciones de un tejido en determinadas soluciones químicas. Una solución amortiguada de formaldehído al



10% es la más empleada. La fijación puede lograrse incluso con ebullición. Por ejemplo, la clara del huevo es una proteína sol, pero si se hierve el huevo se convierte de manera irreversible en gel suficientemente duro para poder cortar en rebanadas, lo mismo ocurre con los soles de las células si se someten a ebullición. Las propiedades más resaltantes de los fijadores son: 1) impiden la autólisis; 2) endurecen los tejidos para facilitar su corte; 3) mejora el efecto de los colorantes por su acción mordiente; 4) minimiza el filtrado de muchos elementos resultantes del procesamiento histológico; 5) estabiliza los componentes estructurales para conservarlos lo más parecidos posible a las condiciones in vivo; 6) como efecto antiséptico protege a las personas que manipulan las muestras (Bancks, 1996).

c. Fundamentación de la técnica de inclusión en parafina

Toma de la muestra. Para la toma de la muestra se debe utilizar escarpelos en buen estado de corte, con la finalidad que durante el proceso no se presentan los artefactos. El uso de cuchillos, tijeras u otros instrumentos de corte grosero, evitarlos definitivamente, son instrumentos que llevan a obtener la muestra con graderías, bordes irregulares y que también llevan artefactos. La muestra a obtener debe medir aproximadamente 1cm cúbico, suficiente para obtener rebanadas delgadas en el micrótopo. *Fijación*. Inmediatamente obtenida la muestra, debe colocarse en un frasco de vidrio transparente, y colocarlo en el tanque de inseminación artificial que contiene nitrógeno líquido hasta la homogenización total de la muestra. *Deshidratación*. Sometidas a concentraciones crecientes de alcohol etílico, con el fin de eliminar el agua de las células para que estos espacios sean reemplazados con parafina. *Aclaramiento*. Son sometidos a Xilol con la finalidad de eliminar la grasa de las células y aclarar el tejido. *Impregnación*. Llenar con parafina los espacios dejados del agua, grasa, para facilitar el corte. *Inclusión*. El tejido



incluye en parafina líquida para formar los tacos de parafina para pegarlos al micrótopo para su corte en rebanadas finas. *Microtomía*. Corte de rebanadas finas en el micrótopo entre 4-8 micras de espesor. (Cutts, 1984.).

2.1.5. Principios de tinción

Todos los componentes estructurales de las células poseen densidades ópticas parecidas, que sería imposible diferenciarlas. Las tinciones son el único modo de lograrlo. Hoy en día se cuenta con miles de colorantes y combinaciones de las mismas. Su reacción con las células y los tejidos varía mucho. Algunos colorantes son muy selectivos para ciertos componentes celulares o titulares. El rojo S de alizarina y la oxitetraciclina tiene capacidad para los sitios de formación de la matriz ósea. Hay otras especiales para algunos materiales celulares (mitocondrias, aparato de Golgi, núcleo) y extracelulares (fibras reticulares, elásticas, colágenas). Algunas no son selectivas y tiñen los componentes de los componentes celulares y extracelulares. La hematoxilina (H) y eosina (E) se usan con mucha frecuencia en histología, los ácidos nucleicos del núcleo tienen apetencia por los colorantes básicos, de esta manera los núcleos se observan de un color azul, los componentes citoplasmáticos de la célula tienen apetencia por la eosina, de tal modo sus estructuras se muestran de un color rosado. La eficacia de una coloración ácida o básica radica en la distribución de las cargas aniónicas y catiónicas relacionadas con las proteínas y complejos proteínicos (lipoproteínas, glicoproteínas) en las células y en los tejidos. La carga neta sobre estas sustancias está en función del número total y la naturaleza de sus radicales ionizables y del pH de su medio. (Hib, 2001).

2.1.5.1. Coloraciones especiales

La particularidad tintorial para observar al microscopio los elementos biológicos que conforman los tejidos de un órgano, (células, fibras, sustancias proteicas, grasa, glucógeno, etc.), es que cada componente estructural del tejido, capta diversamente un determinado colorante. Los componentes celulares y tisulares necesitan de un colorante específico, basado en la composición química de lo cual están constituidos. La cápsula del hígado, el colectivo interlobulares, los límites celulares, tienen afinidad a la Hematoxilina y Eosina, la hematoxilina colorea sustancias basófilas de un color azul-púrpura, y a las células y tejido conectivo de un color rosa. La hematoxilina férrica, colorea de marrón sangre a la cápsula de Glisson, espacios interlobulares. El colorante Hemalumbre-eosina, muestra a las fibras elásticas y límites de los vasos sanguíneos y del espacio portal de un color azul claro. El colorante Impregnación Argéntica de Golgi, colorea al estroma (fibras reticulares del conectivo) y límites celulares de los cordones hepáticos de un color marrón oscuro. (Prieto, 1998).

2.1.5.2. Afinidad a los colorantes

La selección de un corte adecuado, para observar detalles estructurales de las células y de los tejidos cuando están trabajados con colorantes ácidos y básicos, se recomienda, en este caso, probar determinado colorante, en órganos que, dentro de su estructura orgánica, los elementos celulares se encuentren juntos y ordenadamente. El hígado es el órgano de elección. La mayor parte de las células son similares, y poseen una distribución también similar. Esto se logra en un corte de hígado, pues en este órgano el 60% de las células son del mismo tipo y se hallan dispuestas en forma similar. La mayor parte de los colorantes utilizados en histología se clasifican en ácidos y básicos. Sin embargo, no son netamente ácidos o bases, sino sales neutras que se disuelven en agua, en la que se

disocian dando aniones y cationes. Un colorante se denomina ácido o básico cuando el componente que proporcione color este en el anión o en el catión de la sal disociada. Si está en el anión (el radical ácido), el colorante se denomina ácido o aniónico; si está asociado con el catión se denomina básico o catiónico. Cualquier sustancia observada en un corte se llama basófila si tiene afinidad por un colorante básico (hematoxilina) y su afinidad se muestra de un color azul o púrpura. De manera análoga, una sustancia se llama acidófila si capta un colorante ácido (eosina) y su afinidad se muestra de un color rosa; por lo tanto, las sustancias basófilas son de color azul o púrpura. Se ha comprobado que utilizando dos tinciones, primero de un color y luego otro diferente, se logra aún más contraste, porque un colorante se combina con ciertos componentes celulares, los colorantes ácidos tienen particular efecto con los ácidos nucleicos que se encuentren en el núcleo, pared celular y algunos componentes dentro del citoplasma, consiguiendo una apariencia azulada o púrpura; por otro lado, los demás componentes proteicos, glucógeno, tienen particular efecto de tinción con los colorantes ácidos, determinando un color rosa o rojo, por lo tanto el motivo por el que algunos componentes capten un colorante y otros capten otro, nos brinda información sobre la naturaleza química del material (Alvarado, 2000).

2.1.6. Anatomía, fisiología e histología del hígado

El hígado es la más voluminosa de las vísceras y desempeña la doble función de secretar bilis y de elaborar glucógeno. Está situado en la parte superior del abdomen, debajo del diafragma, encima del estómago y de la masa intestinal. Su coloración es rojo pardo, su consistencia es bastante dura; sin embargo, se amolda a los órganos vecinos y presenta una friabilidad muy notable. Determina 2 a 5 % del peso corporal. El hígado es un tejido parenquimatoso, rodeado de una cápsula conectiva o peritoneal visceral, compuesta por tejido fibroso blanco denso, lo cubre la membrana serosa o capsula de Glisson, el

tejido capsular es rico en fibras elásticas. Es una glándula tubular compuesta con diversas funciones metabólicas. Es un órgano complejo, estructural y funcionalmente, estas funciones o realiza a través de dos células, el hepatocito y las células de Kupffer, el hepatocito retiene un alto potencial mitótico. Sintetiza (azúcares, proteínas plasmáticas, factores de coagulación, lípidos urea, cuerpos cetónicos) secreción (sales biliares), excreción (pigmentos biliares), almacenamiento (lípidos, vitaminas, glucógeno) biotransformación (tóxicos, fármacos, drogas hormonas) y metabolismo (lípidos proteínas, carbohidratos). La célula de Kupffer, elemento del sistema de macrófagos, revisten las sinusoides hepáticas y está íntimamente relacionado con el hepatocito, auxilian la actividad fagocitaria del hígado. El potencial mitótico del hígado por los hepatocitos se retiene toda la vida. La actividad mitótica y la hipertrofia celular determinan el potencial de restauración de la masa hepática. (Bartolo, 2004).

2.1.6.1. Unidad Funcional del Hígado

El hígado como unidad funcional se puede estudiar desde tres aspectos: morfológica, secretora y vascular. La unidad morfológica o anatómica está representada por el lobulillo hepático, la secretora o funcional es el lobulillo portal; y la vascular es el acino hepático. El lobulillo hepático posee una vena central alrededor de ella se irradian los cordones hepáticos que contienen a los hepatocitos rodeados de cantidades variables de tejido conectivo interlobulillar. El lobulillo portal o unidad secretora o funcional exocrina formada por los canalículos biliares que drenan a los conductos biliares interlobulillares dentro del espacio porta. Los acinos hepáticos representan el aporte vascular a los lobulillos hepáticos. Las ramificaciones de la vena porta hepática se extienden entro los lobulillos hepáticos. Las ramificaciones terminales de estos vasos se abren en los sinusoides hepáticos (Arévalo, 1998).

2.1.6.2. Histología del hígado

El hígado es un órgano parenquimatoso, rodeado de una cápsula conectiva o peritoneo. El tejido conectivo capsular se continúa con el intersticial que sirve como estroma de soporte para el parénquima.

El tejido conjuntivo (interlobulillar) intersticial, aunque escaso en casi todas las especies, es muy prominente en las regiones interlobulillares llamadas áreas portales y consta de tejidos conjuntivo laxo. El tejido intralobulillar es escaso en todas las especies, es reticular, y se limita a partes del espacio de Dissel. Los lobulillos hepáticos delineados por tejido conjuntivo interlobulillares, y constituyen las unidades morfológicas y fisiológicas del hígado, estas masas prismáticas poligonales de tejido, están formados por placas o láminas de hepatocitos interdigitados entre sinusoides anastomosados. Las placas de células y los sinusoides parecen radiar desde un vaso de posición central. Los hepatocitos forman el parénquima del órgano, son poliédricos y tienen límites distintivos, su núcleo vesicular tiene un núcleo prominente. El núcleo es central a la observación microscópica muestra un color oscuro por su contenido de gran cantidad de ácidos nucleicos, rodeado por un citoplasma acidófilo. Puede observarse células binucleadas. El aspecto del hepatocito depende del estado fisiológico del organismo al tomar la muestra. En animales en ayunas, los hepatocitos se observan pequeños, turbios e indistintamente delineados. Después del alimento, los hepatocitos se agrandan, se delinean en forma distintiva y se llenan con numerosas inclusiones glucogénicas y lipídicas, que le confiere un aspecto espumoso o de panal de abejas. Los sinusoides hepáticos forman la irrigación vascular intralobulillar, la sangre proviene de los vasos interlobulillares se transporta a través de los sinusoides hacia las venas centrales, los sinusoides están revestidos de células endoteliales típicas y por un fagocito, miembro del sistema de macrófagos (la célula de Kupffer) sobre las células endoteliales. El

sistema biliar del hígado consta de canaliculos biliares y conductos intrahepáticos y extrahepáticos para conducir la bilis de los hepatocitos al duodeno. El sistema de células excretoras y túmulos de conducción constituyen los componentes glandulares exocrinos del hígado. Los canaliculos biliares son los componentes más pequeños del sistema biliar y se forman entre hepatocitos adyacentes. (Sifuentes, 1997).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Cajamarca. Las muestras de hígado fueron tomadas de ovinos que llegan al sacrificio al Camal Municipal de Cajamarca y procesadas en el Laboratorio de Biología de la Facultad de Educación de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Datos Meteorológicos (*)

➤ Altitud	: 2750 msnm
➤ Latitud sur	: 7° 10' 36"
➤ Latitud oeste	: 78° 30'
➤ Clima	: Templado seco
➤ Temperatura media anual	: 14.6°C
➤ Temperatura mínima media anual	: 7.8 °C
➤ Temperatura máxima media anual	: 21,03°C
➤ Humedad relativa media anual	: 65,5%
➤ Precipitación pluvial anual	: 528.5 mm
➤ Brillo solar media anual	: 5,5 horas/día.
➤ Presión barométrica	: 742,4 milibares

(*) Fuente: SENAMHI – Cajamarca 2017



3.2. Materiales

a. Biológicos

Achiote (*Bixa orellana*).
Hígados de ovino sanos.

b. De vidrio

Vasos Coplin
Probetas de vidrio
Pipetas de vidrio
Láminas porta y cubre objetos

c. De protección

Mandil
Guantes de latex

d. De escritorio

Papel bond
Libreta de apuntes

e. Equipos de laboratorio

Microscopio Compuesto con cámara Incorporada
Micrótomo de rotación
Baño maría.
Estufa
Refrigeradora

f. Reactivos

Alcohol Absoluto
Xilol
Bálsamo de Canadá

3.3. Metodología

3.3.1. Obtención del Colorante *Bixa Orellana* (Achiote)

Según el protocolo de Manosalva (2016):

1. En balanza analítica se pesó 12 g de la semilla del achiote de (*Bixa orellana*)
2. Se deshidrató y secó en una estufa a 20°C por 15 días.
3. Se molió en mortero hasta obtener un polvo homogéneo bien triturado.
4. Luego, se realiza el tamizado en mallas metálicas de 1/16 pulgadas, hasta obtener una uniformidad del producto (achiote en polvo).
5. Se pesó 5 g de *Bixa orellana* en polvo, se deposita en un beaker con capacidad para 150 ml, añadir 100 ml de alcohol etanol absoluto.
6. Mezclar hasta disolver el colorante con alcohol etanol absoluto, (puede ayudarse con calor de mechero a gas).
7. Una vez obtenido el colorante, se le añadió 5 ml de una solución de alumbre como mordiente. (Solución de alumbre al 5%).
8. Las dos soluciones se mezclan hasta su homogenización total.
9. Se dejar reposar el colorante hasta su uso. (2 meses).
10. El producto final, es una solución de un color rojizo.

3.3.2. Selección de los 10 hígados de ovinos, toma de la muestra y fijación.

Se eligieron 10 hígados de ovino aparentemente sanos del Camal Municipal de Cajamarca.

- a. Una vez sacrificados los animales, se inspeccionaron los hígados y se seleccionaron 10 aparentemente sanos. La toma de las muestras fue de 1 cm³ por órgano, inmediatamente las muestras fueron

depositadas en frascos de vidrio que contenían el fijador a base de formaldehído bufferado al 10%.

b. Luego las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de Cajamarca, para proseguir con la técnica inclusión en parafina.

3.3.3. Trabajo de Laboratorio

a. Método de Inclusión en Parafina

- **Fijación:** Luego de la fijación de las muestras en una solución de formaldehído bufferado al 10%, los bloques de tejido hepático fueron lavados en agua corriente de 5 a 10 minutos, tiempo necesario para eliminar con agua el exceso del fijador.
- **Deshidratación:** Las muestras fueron sometidas a cinco baños de concentraciones crecientes de alcohol etílico; en soluciones de 80%, 95%, 95% y 100%
- **Aclaramiento.** Se llevó a cabo con xileno, en tres baños en vasos Coplin.
- **Inclusión.** Las muestras fueron incluidas en bloques de parafina diluida, obteniendo tacos con las muestras correspondientes. Se las dejó enfriar al aire libre por 24 horas, luego permanecieron por 72 horas en la refrigeradora.
- **Microtomía.** Posterior al endurecimiento y enfriamiento de los tacos de parafina, fueron montados en el micrótopo de rotación, para obtener rebanadas de tejido a 5-8 micras de grosor. Estos cortes se colocaron en baño María (37°C-40°C), al que previamente se le agregó gelatina adhesiva, se recuperó el corte con una lámina porta objetos, y luego fueron secadas al aire libre hasta el momento de colorearlas.
- **Coloración.** Una vez que la muestra estuvo seca, se llevó a cabo la coloración, realizada en el Laboratorio de Biología de

la Facultad de Educación de la Universidad Nacional de Cajamarca.

•

3.3.4. Criterios para evaluar la calidad en la tinción

(Velázquez 2015)

a. Buena

- Buena afinidad de los tejidos de hígado a los colorantes ácidos y básicos (Hematoxilina-*Bixa orellana*).
- Distribución de los colorantes en forma homogénea.
- Sin presencia de precipitados de los colorantes.
- Nitidez considerable, lo que permite la identificación de las estructuras parenquimatosas y tejido estromal.
- Sin presencia de artefactos que alteren la coloración.

b. Regular

- Moderada afinidad de los tejidos a los colorantes.
- Estructuras histológicas poco coloreadas lo que permite poca visibilidad.
- Coloración opaca en zonas importantes de tejido.
- Presencia de artefactos que altera la coloración.

c. Mala

- Elementos celulares y estromales no identificables.
- Afinidad de los tejidos a un solo colorante.
- Presencia de artefactos diseminados por gran parte del tejido del hígado.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Tabla 1. Afinidad tintorial de los tejidos del hígado de ovino al colorante Hematoxilina *Bixa orellana* (Achiote) al 5%.

Tejidos del Hígado	Calidad de Tinción	Descripción	N° de muestras
ESTROMA Cápsula	Mala	Cápsula de Glisson gruesa, conformada por elementos fibrilares conectivos con afinidad a la hematoxilina de un color azul. No existe contraste de coloración con el colorante acidófilo <i>Bixa orellana</i> (Achiote) (Fig.1).	100%
Espacio Porta	Mala	Espacio porta en el tejido interlobulillar de color azul (Basofilia). Observamos dos conductillos biliares revestidos de células cúbicas de color oscuro con afinidad a la hematoxilina. Los vasos sanguíneos revestidos de células endoteliales oscuras con afinidad a la hematoxilina. No existe contraste de coloración. (Fig. 2)	100%
Vasos Sanguíneos	Mala	Pared basófila, revestidos de células endoteliales de color azul oscuro. No existe contraste de coloración. (Fig. 3)	100%

n=10

4.1. Detalles histológicos del hígado de ovino sometidos a la técnica de inclusión en parafina: coloración hematoxilina-*Bixa orellana* (*achiote*) al 5%.



Fig. 1. Tejidos del hígado de ovino sometidos a la Técnica de Inclusión en parafina: Coloración Hematoxilina- *Bixa orellana* (*Achiote*) (**a**) Cápsula de Glisson gruesa conformada por fibras conectivas (colágenas) (100 X).

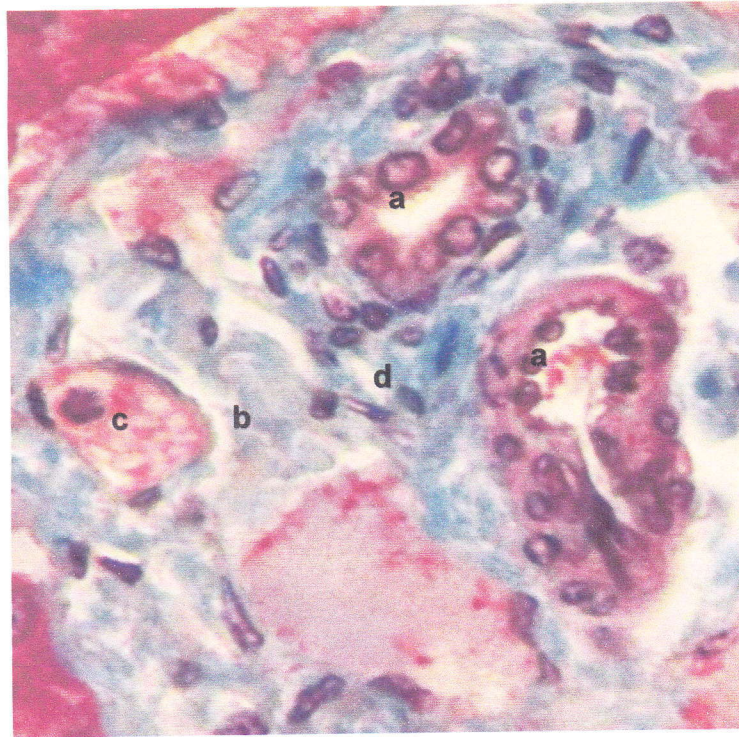


Fig. 2. Espacio porta. (a) dos conductillos biliares revestidos de células epiteliales simples de color oscuro con afinidad a la hematoxilina, sin contraste de coloración, (b) el tejido conectivo laxo de color azul con afinidad a la hematoxilina (basofilia), (c) vasos sanguíneos revestidos de células endoteliales con núcleos basófilos, (d) células conectivas (100 X).

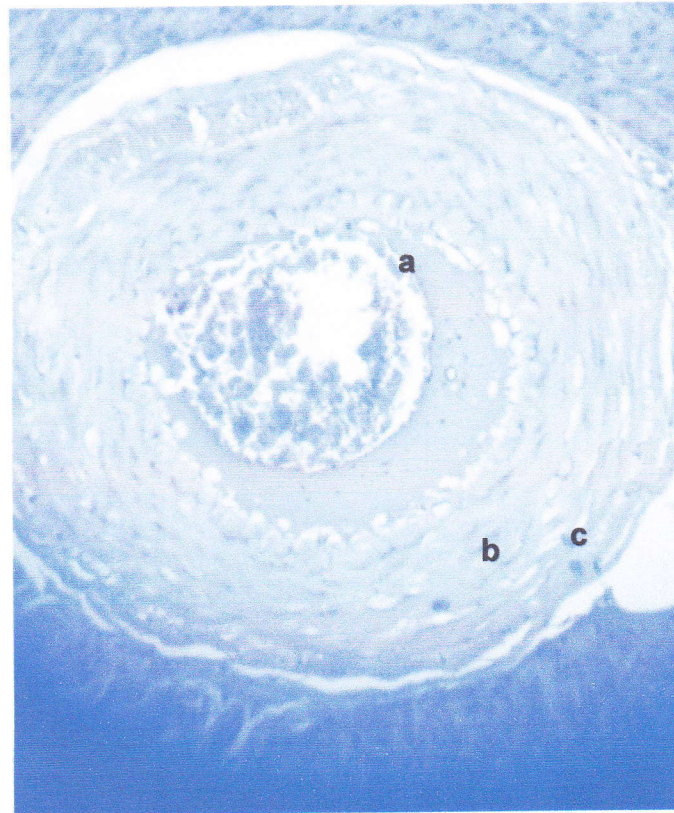


Fig. 3. Vaso sanguíneo (Arteria mediana). Coloración Hematoxilina-*Bixa orellana*. (a) el revestimiento endotelial, (b) la pared muscular basófilos, no existe afinidad al colorante *Bixa Orellana*, (c) fibras conectivas colágenas (100 X).



CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En el presente estudio, con el fin de mostrar la afinidad de los elementos estructurales del hígado de ovino con la técnica de coloración hematoxilina - *Bixa Orellana* al 5%, se eligió el hígado de ovino por ser un órgano parenquimatoso, macizo y compacto, además de tener una constitución organizada; razones que compartimos con Alvarado (2000), el que refiere que para probar una técnica de coloración acida- básica, ésta debe realizarse preferentemente en órganos compactos (hígado o riñón), los mismos que presentan estructuras ordenadas y uniformes; y en los que la mayor parte de sus elementos celulares y tejido conectivos poseen una distribución homogénea.

La tabla 1, muestra los hallazgos encontrados con respecto a la afinidad tintorial que presentaron los diferentes tejidos del hígado de ovino (cápsula, parénquima, lobulillo hepático, espacio porta y vasos sanguíneos) a la coloración Hematoxilina - *Bixa Orellana* (Achiote) al 5%; en la totalidad de las muestras se observó una mala calidad de tinción, en ninguno de los diferentes tejidos se puede observar contraste alguno que permita diferenciar correcta y claramente las diferentes estructuras. Al respecto, Alvarado (2000) menciona que los elementos observados en un corte histológico presentan dos propiedades: Basofilia, cuando existe afinidad por un colorante básico, como la hematoxilina, la misma que se muestra de un color azul o púrpura; y acidofilia, cuando existe afinidad por colorantes ácidos como la eosina, la que se muestra de un color rosa sobre las estructuras celulares. Así mismo, Prieto Motta (1998), determina que cada componente estructural de un tejido necesita un colorante específico, ácido o básico, basada en la composición química del tejido. En el presente estudio

podemos observar que el colorante obtenido a partir de la *Bixa orellana* (Achiote) al 5% no se comporta como un colorante ácido, al no observar en el tejido el color rosa deseado para lograr un contraste óptimo, esto es observable claramente en las Fig. 1 y 4, en donde se observa a los tejidos capsulares, parenquimatosos y vasos sanguíneos del hígado de ovino, de color azul, con afinidad solamente a la hematoxilina (Basofilia); por lo tanto, se puede inferir que los elementos estructurales del hígado de ovino no son afines a tal colorante. Los resultados obtenidos se pueden deber a la baja concentración del colorante (5%), o a que los tejidos del hígado de ovino no tienen afinidad al colorante de *Bixa Orellana* (Achiote).



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- 6.1. El uso de la *Bixa orellana* (Achiote) al 5%, como reemplazo de la Eosina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de hígado de ovino, no muestra afinidad tintorial.
- 6.2. La Bixa Orellana (Achiote), no se comporta como colorante ácido en los tejidos de hígado de ovino, por lo tanto, no existe contraste de coloración con la hematoxilina.



CAPÍTULO VII

LISTA DE REFERENCIAS

- Alvarado, I. 2000. Histología Veterinaria 23ava Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. p.p 274-280. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos/estorago-cerdo>.
- Arévalo, J. 1998. Sembrío e industrialización de la cochinilla. Ministerio de Agricultura. Segunda Edición. Perú.
- Arroyo, O.L. 2008. Tintes Naturales Mexicanos: Su aplicación Resumen científico. Escuela Nacional de Artes Plásticas. ISBN 978-607-2-00179-4. México.
- Bancks, R. 1996. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda Edición. Editorial Manual Moderno México. p. p. 480. <http://ciartsbijengronen.nl/histología-veterinaria-aplicada-Bancks.htm>
- Bartolo, R. 2004. Histología. Primera Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Cardón, D. 2007. Natural Dyes: Sources, Tradition, Technology and Science. Archetype Publications. ISBN 1-904982-00X. Nueva York EEUU.
- Cutts, J.H. 1984. La Práctica de la Criogenización. Consideraciones Universales del Futuro. Comienzo de una nueva vida. Congreso Anual de los Avances de la criogenización Los Angeles EEUU. <http://www.cronica.org/sec/articul/reflex.htm>

- Ham, A. 2013. Tratado de Histología. Novena Edición. Editorial Interamericana. Caracas Venezuela pp. 935. (Consultado 03.12.2018) (Disponible) <http://listado.Libros-ciencias-médicas-naturales/tratado-de-histología-Artur-w-ham>
- Hib, M., 2001. Histología. Primera Edición. Editorial El Ateneo. Madrid España. p.p. 427. (Disponible) <http://www.laleo.com/histologia-de-di-fiore-texto-atlas-p-8168.html>
- Manosalva, N. 2017. Uso del colorante natural Acido Carmico al 10% obtenido de *Dactyloplus Cocus* (cochinilla), en remplazo de la hematoxilina en la técnica de la coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovino, Cajamarca. Tesis para obtener el Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Regalado, N. 2016. Estudio comparativo de las propiedades de fijación entre la formalina ácida y el alcohol etílico al 80% en tejidos de hígado de conejo-Cajamarca. Tesis para obtener el Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Prieto, M. 1998. Histología. Quinta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Rogers, P. 2003. Tintes and teñido. In Jenkins. Resumen Científico. Estados Unidos de Norte América p.p 25-29
- Sifuentes, G. 1997. Principios de tinción. Colorantes en Histología. Primera edición. Editorial Interamericana Chile.

ANEXO

ACTIVIDADES DE LA METODOLOGÍA REALIZADAS EN EL CAMAL MUNICIPAL DE CAJAMARCA



Fig. 4. Disección y limpieza del hígado de ovino. Mesa de inspección veterinaria. Camal Municipal de Cajamarca.



Fig. 5. Toma de la muestra y fijación en formaldehído bufferado al 10%. Mesa de inspección veterinaria. Camal Municipal de Cajamarca.

ACTIVIDADES DE LA METODOLOGÍA EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA Y DINÁMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Preparación del colorante de Achiote (*Bixia orellana*)



Fig. 6. Selección y pesado de La *Bixia Orellana* (Achiote) en grano (10-12 g aproximadamente). Laboratorio de Química y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.



Fig. 7. Trituración y molido de la *Bixia Orellana* (Achiote) en grano en un mortero pequeño de laboratorio. Laboratorio de Química y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.



Fig. 8. Pesar 5 g de Achiote (*Bixa Orellana*) molido, fueron disueltos en 100 ml de alcohol absoluto (etanol). Laboratorio de Química y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.



Fig. 9. Filtrar el colorante Achiote (*Bixa Orellana*). Laboratorio de Química y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca.

ACTIVIDADES DE LA METODOLOGÍA - TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA



Fig. 10. Deshidratación. (Alcohol 80%; 90%; 95% y 100%); Aclaramiento (3 baños en xilol por tres horas).



Fig. 11. Inclusión en Parafina: Método de Inclusión en Parafina. Impregnación 3 baños en parafina a 60°.



Fig. 12. Método de Inclusión en Parafina. Confección de tacos en parafina.

**ACTIVIDADES DE LA METODOLOGÍA TÉCNICA COLORACIÓN
HEMATOXILINA - ACHIOTE (*Bixa Orellana*), LABORATORIO
EMBRIOLÓGICA. FACULTAD DE EDUCACION.**



Fig. 13. Técnica de coloración con Hematoxilina. Laboratorio de Biología. Facultad de Educación.



Fig. 14. Técnica de coloración con Achiote (*Bixa Orellana*). Laboratorio de Biología. Facultad de Educación.



Fig. 15. Diagnóstico histológico. Observación microscópica de los detalles estructurales referente a la calidad de la tinción del colorante Achiote (*Bixa Orellana*) en los tejidos de hígado de ovino.



Fig. 16. Microfotografía. Toma de microfotografías de la arquitectura y afinidad tintorial e los tejidos del hígado de ovino con la técnica de coloración con el Achiote (*Bixa Orellana*).

TÉCNICA DESHIDRATACIÓN, ACLARAMIENTO, IMPREGNACIÓN E INCLUSIÓN.

DESHIDRATACIÓN

- 1.- Lavado en aguas corrientes 5'-10'
- 2.- Alcohol 80° 1 hora.
- 3.- Alcohol 95° 2 horas.
- 4.- Alcohol 95° 1 hora.
- 5.- Alcohol 100° 1 hora.
- 6.- Alcohol 100° 1 hora.
- 7.- Alcohol 100° 1 hora.

ACLARAMIENTO

- 8.- Xilol 1 hora.
- 9.- Xilol 1 hora.
- 10.- Xilol 1 hora.

IMPREGNACIÓN

- 11.- Parafina 56° -58° 2 horas.
- 12.- Parafina 56° -58° 2 horas.
- 13.- Parafina 56° -58° 2 horas.

INCLUSIÓN

- 14.- Confección de tacos.

**TÉCNICA DE COLORACIÓN DE HEMATOXILINA-BIXA ORELLANA 5%.
TIEMPO DE DURACIÓN**

- 1.-Xilol..... 5 minutos.
- 2.-Xilol..... 5 minutos.
- 3.-Alcohol absoluto al 100% 3 minutos.
- 4.- Alcohol absoluto al 100% 3 minutos.
- 5.- Alcohol absoluto al 95% 3 minutos.
- 6.- Alcohol absoluto al 95% 3 minutos.
- 7.- Alcohol absoluto al 70% 3 minutos.
- 8.- Agua destilada..... 3 -5'
- 9.- Hematoxilina..... 5 -10'
- 10.- Agua destilada..... 3 -5'
- 11.- Alcohol ácido- enjuagar
- 12.- Agua destilada- enjuagar
- 13.- Alumbre (mordiente)..... 2 minutos.
- 14.- Lavado con agua corriente 10 minutos.
- 15.- Lavado con agua destilada..... 5 minutos.
- 16.- Alcohol absoluto al 70% 3 minutos.
- 17.- Bixa Orellana 1- 5 minutos.
- 18.- Alcohol absoluto al 70% 3 minutos.
- 19.- Alcohol absoluto al 95 % 2 minutos.
- 20.- Alcohol absoluto al 95 % 2 minutos.
- 21.- Alcohol absoluto al 100% 2 minutos.
- 22.- Alcohol absoluto al 100% 2 minutos.
- 23.- Xilol..... 3 minutos.
- 24.- Xilol..... 3 minutos.
- 25.- Xilol..... 3 minutos.
- 26.- Colocar una gota de Bálsamo de Canadá sobre la lámina portaobjeto y cubrir con la lámina cubreobjetos.