

SECRETARIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCION GENERAL DE PESCA

DESDE 1970

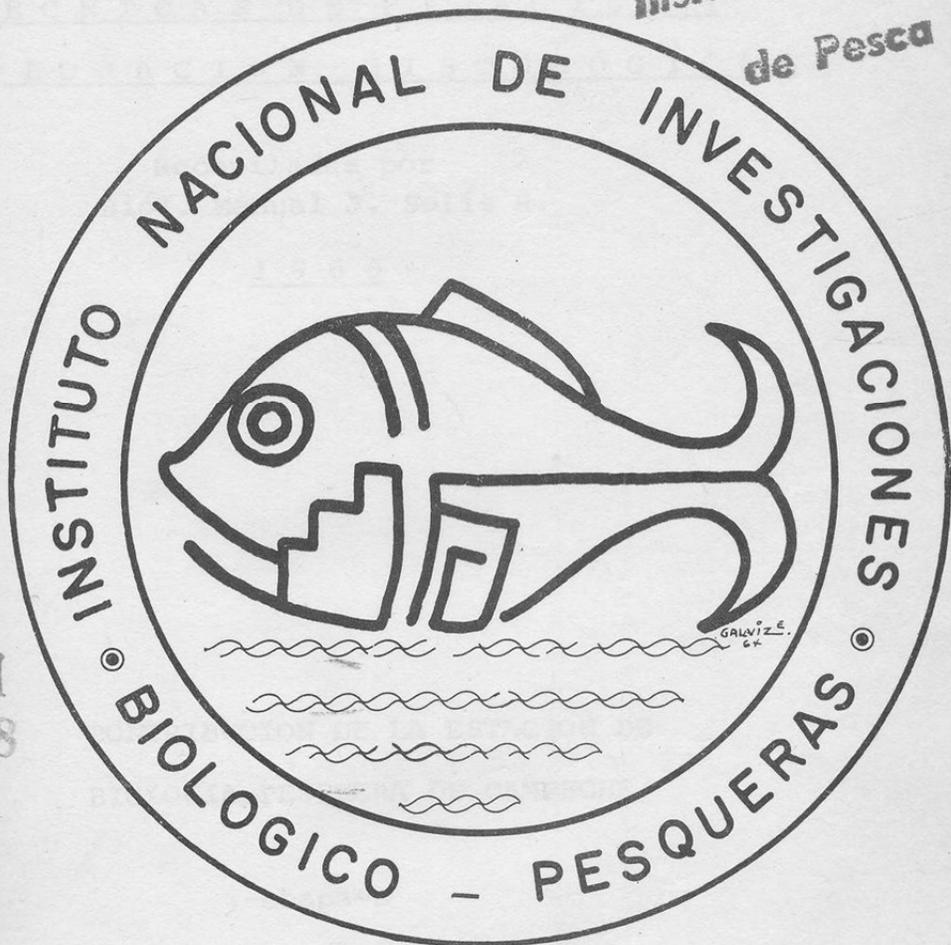
Instituto Nacional
de Pesca

TRABAJOS
DE
DIFUSION

VOLUMEN

XI

NUMERO: 108



MEXICO D. F.

1966

Serie:

TRABAJOS DE DIVULGACION

Núm. 108

VOLUMEN XI

DESDE 1971
Instituto Nacio
de Pesca

TECNICAS DE FIJACION Y
COLORACION HISTOLOGICAS

Recopiladas por
Biól. Manuel J. Solís R.

1 9 6 6

CONTRIBUCION DE LA ESTACION DE
BIOLOGIA PESQUERA DE CAMPECHE.

j-chapa-s

C O N T E N I D O

CAPITULO I.

FIJACION.

Fijadores simples.

Mezclas fijadoras.

CAPITULO II.

Métodos de inclusión.

CAPITULO III.

Colorantes y técnicas de coloración.

CAPITULO IV.

Fijación y tinción de protozoarios.

CAPITULO V.

Técnicas de fijación y tinción para algas marinas.

CAPITULO VI.

Disoluciones.

CAPITULO VII.

Preservación de material Hidrobiológico en el campo.

I N T R O D U C C I O N

EL PRESENTE TRABAJO ES RESULTADO DE LA REUNION DE DIVERSOS APUNTES SOBRE TECNICAS MICROBIOLÓGICAS, RECOPIADAS DE SENDOS CURSOS RELACIONADOS CON EL TEMA, IMPARTIDOS EN LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. A -- FIN DE COMPLETAR ESTOS APUNTES SE HAN ADICIONADO ALGUNAS OTRAS TECNICAS BASICAS OBTENIDAS DE CONSULTAS DE DIVERSAS OBRAS NACIONALES Y EXTRANJERAS. ASI ES COMO SE INCLUYE UN CAPITULO RELATIVO EXCLUSIVAMENTE A ALGAS MARINAS (VER TAMBIEN INSTRUCTIVO PARA EL -- USO DE FIJADORES Y ENVIO DE MATERIAL BOTANICO AL I. N. I. B. P., SERIE TRABAJOS DE DIVULGACION V (45) -- PP. 1 - 3, ETC.) SE INCLUYE TAMBIEN UN ARTICULO SOBRE "PRESERVACION DE MATERIAL HIDROBIOLOGICO", DIRIGIDO A LOS ESTUDIANTES DE CIENCIAS NATURALES.

SE HACE CONSTAR QUE LA REVISION DEL PRESENTE TRABAJO, ESTUVO A CARGO DE LA DRA. IRMA DELEON, CA--TEDRATICA DE HISTOLOGIA EN LA ESCUELA NACIONAL DE -- CIENCIAS BIOLOGICAS, DEL INSTITUTO POLITECNICO NA--CIONAL, A QUIEN SE AGRADECE SU COLABORACION.

TAMBIEN SE AGRADECE A LA BIOL. ESPERANZA HIDALGO E., LA TRADUCCION DE LAS NOTAS TOMADAS DE LA OBRA DE LANGERON (EN BIBLIOGRAFIA).

C A P I T U L O I.

APUNTES DE TECNICAS DE FIJACION E HISTOLOGICAS

FIJACION. Es una operación destinada a conservar los tejidos; incluye la muerte de las células.

CUALIDADES: Un buen fijador debe penetrar rápidamente través del tejido, de manera que el líquido pase a fijar las zonas profundas y la capa superficial.

El fijador debe producir una coagulación total de albuminoides, pero ésta no debe ser violenta ni lenta para evitar contracciones.

AGENTES FIJADORES.

Dicromato de potasio: Fija bien el citoplasma pero destruye los núcleos, al contrario de los dicromatos de Ca, Cr, y Ba, que fijan bien las mitosis pero no el citoplasma. Esto puede corregirse adicionando ácido acético.

Bicloruro de mercurio: Penetra rápidamente a muy baja profundidad, por lo que es necesario tratar pequeños cortes. La solución acuosa es oxidante ácida y precipita energicamente los albuminoides, sobre todo los del núcleo. Estas propiedades son mejoradas por la adición de ácido acético, que es el fijador más penetrante.

Acido acético: Forma parte de casi todas las mezclas fijadoras. Es fijador de la cromatina y es elemento ácido -- muy penetrante. Aumenta los contrastes entre el núcleo y el citoplasma, modificando su refringencia y acentuando su contorno. Mezclado con ácidos oxidantes aumenta la coloreabilidad de los tejidos.

Acido pícrico: En citología animal es muy penetrante, fija con una intensidad particular los citoplasmas reductores y los neutraliza, facilitando las coloraciones. Forma parte del líquido de Bouin.

Formol: Es el fijador universal por lo económico y penetrante que es. Comercialmente se vende en solución acuosa -- al 40%. Para eliminar su molesto olor se deben lavar los organismos fijados, en agua ligeramente amoniacal. Todo el olor se suprime así.

Para quitar el exceso de ácido fórmico presente normalmente en el formol comercial, se emplea como neutralizador el carbonato de sodio al 1% (bórax).

Se deben emplear preferentemente soluciones al 5%.

Forma parte de gran número de fijadores y es uno de los mejores fijadores para el sistema nervioso.

MEZCLAS FIJADORAS

Dicromato de potasio de von Tellyesniczky.

Dicromato de potasio	3 g.
Acido acético glacial	5 g.
Agua	100 g.

Constituye un excelente fijador que conserva al citoplasma (el dicromato) a los núcleos (ácido acético). Se pueden fijar objetos de tamaño mediano, que no pasen de 5 mm. de espesor. Se dejan uno o dos días según su volumen y se lavan en agua corriente durante 24 horas.

BOUIN.

Formol al 40%	1 parte
Agua	3 partes
Acido pícrico	a saturación

En el momento de usarlo se agrega 5% de ácido acético -- glacial.

El líquido de Bouin es muy penetrante y puede considerarse como un fijador universal. Su empleo es muy sencillo y se puede fijar cualquier objeto, aunque sea muy voluminoso en 3 u 8 días. No necesita ser lavado después de la fijación. Es suficiente transportarlo a alcohol de 96° y cambiarlo 2 a 3 veces.

BOUIN-HOLLANDE

Agua destilada	100 g.
Acetato neutro de cobre	2.5 g.
Acido pícrico	4 g.
Formol 40%	10 g.
Acido acético glacial	1 g.

Disolver en frío, en un mortero, el acetato. Después añadir el ácido pícrico poco a poco. Añadir el formol y el acético cuando se haya disuelto el pícrico.

Preparación de fijador de Bouin.

Formalina	25 ml.
Acido pícrico	75 ml.
Acido cético glacial	5 ml.

Formalina:

Formaldehído	10 g.
Agua	<u>15 g.</u>
	25 g. (ml.)

Acido pícrico:

El agua en la solución de ácido pícrico es casi de 75 g. Es soluble aproximadamente 1.4% en agua. Así se tiene 1.05 g. de ácido pícrico en 75 ml. de solución saturada.

Cantidad de agua 15 + 75 = 90 g.

Fórmula definitiva:

Formaldehído	10 g.
Acido pícrico	1.05 g.
Acido acético glacial	5 ml.
Agua	90 g.

Si cada una de esas cantidades se multiplica por 1/9, - tenemos la composición de la mezcla expresa como porcentaje del peso en agua:

Formaldehído	11 g.
Acido pícrico	1.2 g.
Acido acético glacial	5.6 ml.

Las concentraciones de los solutos se dan así:

Formaldehído	11% W/W
Acido pícrico	1.2% W/W.
Acido acético	5.6% V/W.

LANG.

Fija el citoplasma.

Bicloruro de mercurio en solución saturada y caliente	95 cc.
Acido acético glacial	5 cc.

Fijar durante 24 horas. Sumergir en alcohol iodado 2 horas.

Tintura de iodo al 10%	5 cc.
Alcohol al 70%	45 cc.

El uso de esta solución tiene por objeto eliminar el exceso de bicloruro de mercurio que pueda quedar cristalizado. Lavar en alcohol al 70% hasta decolorar.

CAPITULO II

METODOS DE INCLUSION

Tiene por objeto incluir el trozo de un órgano u organismo en una substancia plástica que penetra hasta las partes más profundas de las células. Permite hacer cortes más delgados, sin modificar la forma de los elementos celulares.

Las sustancias deben estar en estado de fusión.

Las sustancias anhidras necesitan la deshidratación de los cortes. Hay dos: parafina y colodión. La primera permite hacer cortes finos. El colodión permite ejecutar cortes de gran diámetro, sin ningún riesgo, sin romperse (caso parafina).

PARAFINA.

Es un hidrocarburo saturado obtenido como uno de los productos del petróleo.

P a s o s:

- 1.- Deshidratación de las piezas por ROH de diferente graduación.
- 2.- Impregnación por un disolvente de la parafina.
- 3.- Impregnación por parafina.
- 4.- Inclusión definitiva.

DESHIDRATACION.

El trocito fijado se lava en ROH de 90 a 95% y después se lleva a alcohol absoluto.

Las piezas fijadas en Bouin se lavan rápidamente en ROH de 90% cambiando 2 a 3 veces, después se introducen en ROH absoluto.

El material conservado en ROH de 70 a 90% puede directamente pasar a absoluto.

La duración de deshidratación varía de acuerdo con el tamaño.

De 1 cm² x 5 cm. de espesor dura 20 minutos cada baño, o sea 2 horas 30 minutos toda la deshidratación.

Se conoce que la pieza está deshidratada cuando no existen cambios con el xilol. Si no está bien deshidratada se debe volver a alcohol absoluto.

Impregnación en un disolvente de la parafina.

Consiste en pasar por un disolvente de la parafina, después de haber sido deshidratado el corte por el ROH.

Los disolventes de la parafina mas utilizados son: tolueno, benceno o xilol, o esencia de aceite de cedro.

Los mejores son aquéllos que disuelven la parafina en frío

TECNICA DE IMPREGNACION.

Consiste en eliminar completamente los restos del alcohol absoluto. Es necesario cambiar el líquido tres o cuatro veces, hasta que no se observa cambios en el líquido.

BAÑO EN PARAFINA.

La mejor parafina es aquella que funde a 55 grados. Presenta diversas cualidades. La parafina es muy blanda no permite hacer cortes finos y la muy dura quiebra los cortes.

Durante el baño, la parafina debe mantenerse en un punto vecino al P. F. Para asegurarlo no se debe calentar la parafina a fuego directo; es necesario tenerla sobre una placa metálica.

DURACION.

Debe asegurarse que en los cortes penetre perfectamente la parafina. Se puede prolongar la duración del baño, según la permeabilidad de los tejidos. Puede durar de 1 a 2 horas según el volumen de los objetos.

ELIMINACION DEL DISOLVENTE.

Para asegurar la eliminación del disolvente, es necesario emplear 3 baños sucesivos, cuya duración debe estar repartida durante 24 horas.

INCLUSION DEFINITIVA.

Se debe usar parafina limpia, nueva. Debe estar fundida en el momento de efectuar la inclusión para hacer las placas.

Se saca el objeto incluido en el último baño y se introduce en la parafina definitiva, orientándolo para su corte. En el momento en que se advierte una película de solidificación se introduce en un recipiente de agua fría, sin que el agua cubra la película, hasta que está un poco gruesa, dejándola sumergir completamente para evitar la formación de burbujas.

Los bloques se hacen en Barras de Leuckart (fig. 1), que permite bloques cuadrangulares, fáciles de conservar. Se debe marcar sobre la parafina con una clave, para tener control de las piezas. Se envuelven en papel Bond y se señala la misma clave (fig. 2).

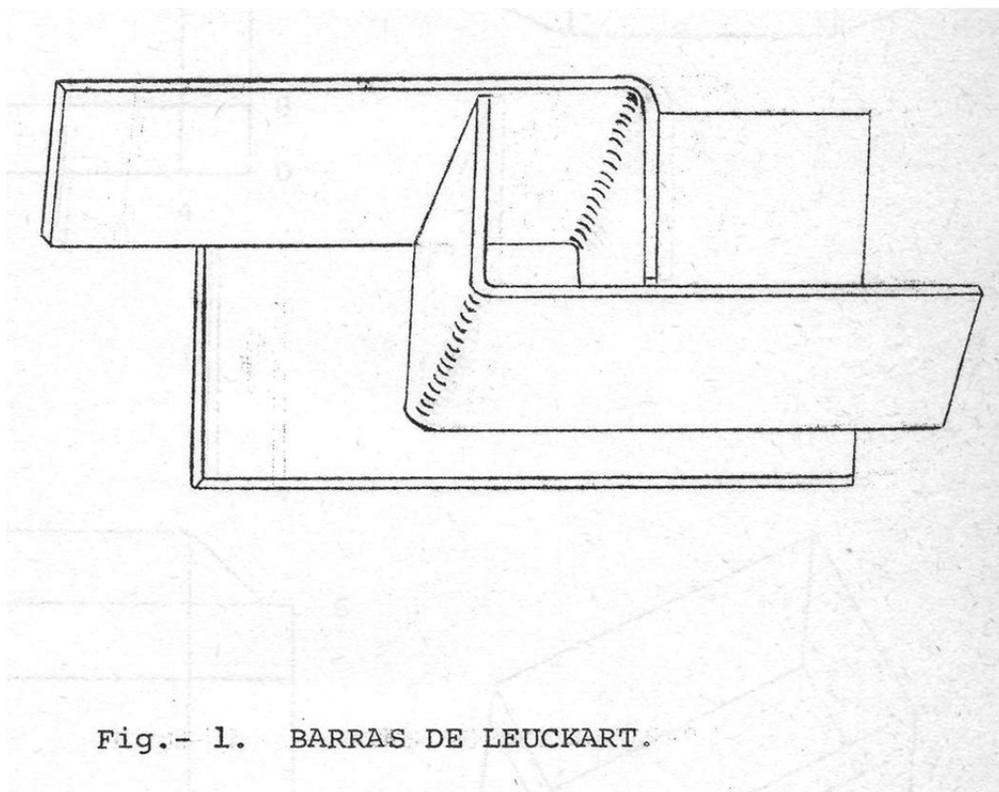


Fig.- 1. BARRAS DE LEUCKART.

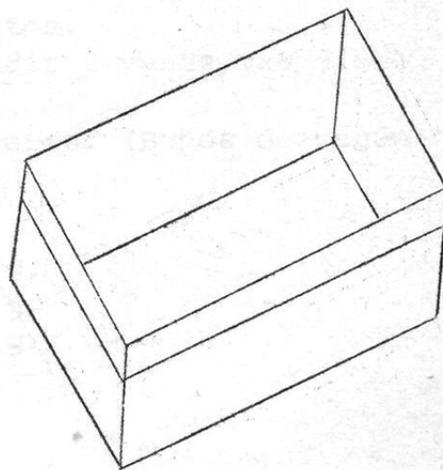
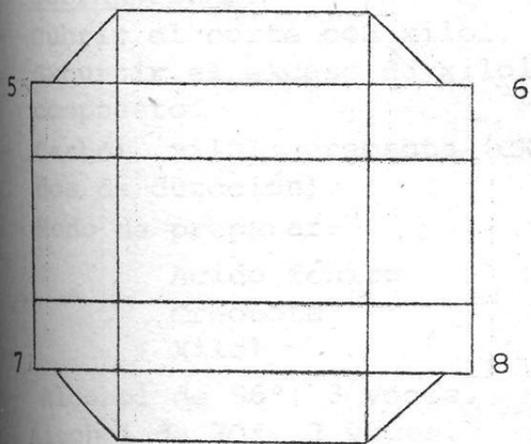
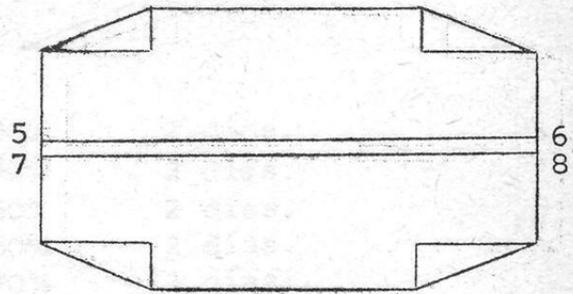
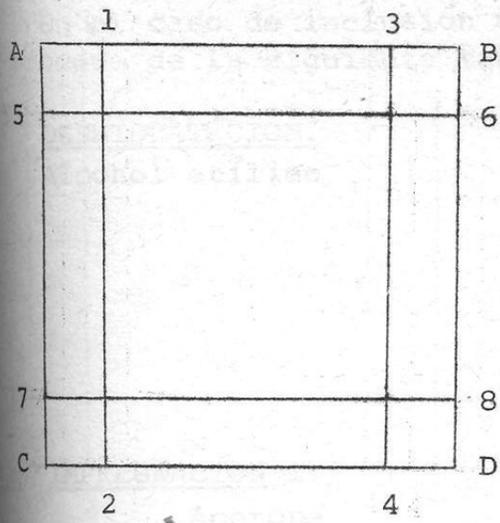


Fig.- 2. MANERA DE HACER ENVOLTURAS PARA CORTES INCLUIDOS EN PARAFINA.

En el caso de inclusión de gonadas (ostión, por ejemplo), se procede de la siguiente manera:

DESHIDRATAACION.

Alcohol etílico	30%	2 días.
	40%	2 días.
	50%	2 días.
	60%	2 días.
	70%	2 días.
	80%	2 días.
	96%	2 días.

IMPREGNACION I.

Acetona	1 día.
Xilol	1 minuto o menos.

IMPREGNACION II.

Parafina I	1 a 2 horas.
Parafina II	1 a 2 horas.
Parafina III	1 a 2 horas.

DESPARAFINAR.

- 1.- Cubrir el corte con xilol, 2 minutos.
Ecurrir el exceso de xilol y añadir 2 veces más dicho compuesto.
- 2.- Carbol, xilol, creosota (CXC) 3 veces. (Baños de segundos de duración).

Modo de preparar:

Acido fénico	10 g.
Creosota	10 g.
Xilol	80 g.

- 3.- Alcohol de 96°, 3 veces.
- 4.- Alcohol de 70°, 3 veces.
- 5.- Agua corriente durante 5 minutos.

CAPITULO III

C O L O R A N T E S

Y TECNICAS DE TINCION

El uso de colorantes en histología tiene por objeto diferenciar las diversas estructuras existentes en la célula, o bien conjuntos de células formadoras de tejidos.

CLASIFICACION.

Los colorantes se clasifican en naturales y artificiales. Ejemplos de los naturales son:

Hematoxilina. Se extrae del Haematoxylum campechanus.

No tiñe directamente sino que necesita del concurso de un mordente.

Casi todas las técnicas llevan un mordente y un colorante. Dan muchos detalles intracelulares.

Carmín. Se extrae de la cochinilla. Se usa la cochinilla - entera, disecada. Es colorante no tóxico.

Hematoxilina-Eosina.

1. Fijación en formol al 10% durante 24 horas o más
2. Cortes por congelación.
3. Lavado y selección de cortes.
4. Coloración con hematoxilina durante 6 minutos.
5. Lavar en agua de la llave (2 veces).
6. Coloración con Eosina, durante 4 minutos.
7. Alcohol de 70, dos veces.
8. Alcohol de 96, dos veces.
9. C-X-C, dos veces.
10. Xilol, dos veces.
11. Montar un bálsamo de Canadá o en resina sintética.

Nota: Esta técnica puede hacerse en cortes realizados después de haber sido incluidos en parafina.

Variación de la técnica.

Hematoxilina-Eosina.

Pasos 1, 2 y 3 iguales que en la anterior.

4. Coloración hematoxilina, 6 minutos.
5. Lavar en agua de la llave hasta que los cortes se pongan azules.
6. Lavar en agua destilada.
7. Coloración con Eosina, 4 minutos.
8. Deshidratar en alcohol de 96, 2 minutos.
9. Creosota, 10 ó 15 minutos.
10. Montar en bálsamo o resina.

TINCION DE TEJIDO ADIPOSO.

1. Fijación en formol al 10%, 24 hs.
2. Cortes por congelación.
3. Lavado y selección de los cortes.

4. Coloración con hematoxilina, 1 minuto.
5. Lavar con agua destilada.
6. Lavar en agua de la llave hasta que los cortes cambien a azul.
7. Lavar con agua destilada.
8. Agua alcoholizada (3 a 1), un minuto.
9. Inmersión de los cortes en solución alcohólica saturada de Sudán III, 15 minutos.
10. Lavado rápido en agua alcoholizada (4-1).
11. Lavado rápido abundante en agua destilada.
12. Montar sin deshidratar en gelatina glicerizada de la siguiente manera:
Los cortes se colocan en el porta directamente del agua y se dejan escurrir, sin dejarlos secar del todo, se les pone el cubre que tiene una gota de gelatina glicerizada caliente.
La grasa queda teñida de color anaranjado.

DOBLE IMPREGNACION ARGENTICA DE RIO HORTEGA.

1. Fijación en formol al 10%, 24 hs. o más.
- 2 Cortes por congelación.
3. Lavado y selección de los cortes.
4. Impregnación en nitrato de plata al 2% durante 24 hs. a la temperatura ordinaria o calentada a 40 ó 45° C. hasta que los cortes se pongan ligeramente amarillentos.
5. Lavar en agua destilada.
6. Impregnación en carbonato de plata amoniacal piridinado. 24 hs. a la temperatura normal o calentado a 40 ó 45° C. hasta que los cortes tomen color café oscuro.
7. Lavar en agua piridinada.
8. Lavar en agua destilada.
9. Reducción en formol al 10%
10. Lavar en agua destilada.
11. Impregnación en cloruro de oro al 1% por 500 a la temperatura ordinaria, hasta que los cortes adquieran color gris uniforme, calentando después hasta que los cortes adquieran color violeta intenso.
12. Hiposulfito de sodio al 5%, 30 segundos.
13. Lavar en agua destilada.
14. Deshidratar en alcohol de 96°.
15. Creosota.
16. Montar en bálsamo de Canadá.

TECNICAS PARA FROTIS DE SANGRE.

GIEMSA.

1. Fijación del frotis con alcohol metílico durante 3 minutos.
2. Tinción durante 10 a 15 minutos en solución diluída de Giemsa recién preparada.
3. Lavado en agua abundante.

WRIGHT.

1. Cubrir el frotis con número conocido de gotas de colorante de Wright, dejándolo actuar durante dos minutos.
2. Añadir el mismo número de gotas de agua destilada, dejándolo actuar durante 8 minutos.
3. Lavar en agua corriente.

PAPPENHEIM.

1. Cubrir el frotis con un número conocido de gotas de colorante de May-Greenwald, 3 minutos.
2. Añadir la misma cantidad de agua destilada y mezclar y dejar actuar durante 1 minuto.
3. Escurrir el líquido y si n previo lavado, añadir solución diluída de Giemsa, dejando actuar durante 15 minutos.
4. Lavar en agua corriente.

CELULAS DESCAMADAS DEL TEJIDO EPITELIAL DE LENGUA.

1. Con un porta objetos limpio raspar el borde de la lengua y hacer un frotis con el material obtenido.
2. Fijar al calor.
3. Teñir con azul de metileno, 6 minutos.
4. Lavar en agua corriente.

TECNICA DE GALLEGO PARA FIBRAS ELASTICAS.

1. Fijación en formol al 3% durante 24 hs.
2. Cortes por congelación.
3. Selección de los cortes.
4. Solución I, 5 minutos.

Agua destilada	10 cc.
Percloruro de fierro	3 gotas.
Formol	1 gota.
5. Pasar directamente a Sol. II, 10 minutos.

Agua destilada	10 cc.
Fucsina Ziehl	25 gotas.

- En el momento de usar añadir una gota de ácido nítrico.
6. Volver a la solución I, durante 5 minutos.
 7. Lavar en agua destilada.
 8. Alcohol de 96, 3 veces.

9. C-X-C, 2 veces.
10. Xilol, 2 veces.
11. Montar en bálsamo de Canadá.

TECNICA PARA EL ANCTON.

Preservado en formol. (4%)

Se monta en gelatina glicerizada calentada a baño maría.

Preparación de la gelatina.

Gelatina	7 g.
Agua	45 ml.
Glicerina	55 ml.
Fenol	1 ml.

Se mezcla todo a baño maría. Es menester usarla caliente, cuidando no lleve burbujas.

TECNICA DE TINCIÓN DE GONADAS DE OSTION.

1. Fijar el órgano en formol.
2. Lavar en agua corriente.
3. Inclusión en parafina. (Ver Cap. II.)
4. Cortar y colocar los cortes en porta-objetos y cubrirlos con albúmina de Mayer. Este se prepara de la siguiente manera:

Clara de huevo de gallina 1.
Glicerina.

Se mezclan en partes iguales la clara y la glicerina y se le añade un granito de hidrato de cloral, fenol o timol. Con un palillo de dientes se toma una gota de dicha mezcla, se coloca ésta en el centro del porta-objetos, quitando el excedente con la mano.

5. Agua corriente.
6. Hematoxilina, 3 minutos.
7. Agua destilada.
8. Agua de la llave.
9. Agua destilada.
10. Eosina, 24 horas.
11. Alcohol de 70% una vez.

TECNICA DE TINCIÓN DE GONADAS DE OSTION. (Finaliza)

12. Alcohol de 96%, dos veces.
13. Carbol-Xilol-Creosota, dos veces.
14. Xilol, dos veces.
15. Montar en bálsamo de Canadá.

TECNICA GENERAL DE RIO HORTEGA.

1. Fijación en formol al 10% durante 24 horas.
2. Cortes por congelación.
3. Lavado y selección de los cortes.
4. Impregnación en carbonato de plata amoniaco piridinado calentado a 40 ó 45° hasta que los cortes se -- tornen color café obscuro.
5. Lavado abundante en agua destilada.
6. Reducción en formol al 10%
7. Lavar en agua destilada.
8. Deshidratar en alcohol de 96.
9. Creosota.
10. Montar en bálsamo de Canadá.

CAPITULO IV

FIJADORES BASICOS PARA PROTOZOARIOS

El estudio estructural de los protozoarios, se efectúa a partir de ejemplares vivos preferentemente. Sin embargo, como complemento para la definición más fina de sus diversas estructuras, se emplean dos métodos básicos para hacer -- preparaciones fijas de los mismos; éstos son: a) Preparaciones viscosas o untadas y los llamados b) frotis sanguíneos.

En el caso de las primeras, éstas pueden hacerse sobre -- porta o cubre-objetos, prefiriéndose los segundos por ser más propiamente fijados y requerir menor cantidad de reactivos.

Cuando se trata de grandes Protozoa de vida libre, se recomienda para adherirlo al cubreobjeto, colocar en éste una -- pequeña gota de albúmina de huevo emulsionada con agua destilada estéril con un palillo de dientes; antes de montar este material se procurará que la mayoría de los especímenes colocados en el cubre permanezcan en él hasta finiquitar la preparación. Deje descansar horizontalmente durante 5 a 10 minutos o más.

Los protozoarios parásitos que viven en medios ricos en -- sustancias albuminoides y afines, fácilmente se adhieren a -- los cubreobjetos. Se hacen uniformemente finos sobre el cubre.

Si este tipo de preparaciones son efectuadas a partir de muestras de material disintérico o líquidos excrementales, éstas podrán ser fijadas casi inmediatamente.

Preparaciones de esta clase hechas de materiales diarreicos o excremento formado por emulsión en solución de agua caliente, podrán ser fijadas por unos cuantos minutos.

Después de adherir los organismos a estudiar de acuerdo con lo dicho, se procede a fijarlos. Para ello existen diversos fijadores, entre ellos:

LIQUIDO DE SCHAUDINN.

Solución saturada en frío o de cloruro mercúrico (6-7%)	66 cc.
Alcohol absoluto de 95%	33 cc.
Acido acético glacial	<u>1 cc.</u>
	100 cc.
	=====

Las primeras dos soluciones pueden guardarse mezcladas -- sin deterioro, pero el ácido debe ser adicionado momentos antes de ser usado el fijador. Fijar a la temperatura ambiente del laboratorio o calentando a 50° C.

Se coloca el fijador en una caja de Petri y el cubreobjetos con los organismos adheridos es introducido suavemente en él con la superficie de adherencia mirando hacia abajo o inclinada. Con poca experiencia, las burbujas de aire pueden -- ser eliminadas y hacer que el cubreobjetos flote en la superficie del fijador. Después de 1 minuto aproximadamente, vuelva a hundir el cubre en el fijador y manténgalo así por 5 ó 10 minutos, o más. En caso que la preparación sea también --- gruesa, una capa fina de vaselina en el lado superior del cubre la hará flotar. Aproximadamente 6 cubres pueden ser fijados en la caja de Petri simultáneamente.

En seguida, las preparaciones se transfieren a un recipiente con colorante de Columbia para cubreobjetos, conteniendo alcohol de 50% durante 10 minutos, seguido por dos cambios de igual duración. Transfiera las preparaciones en seguida al alcohol al 30% durante 5 minutos, y luego a un recipiente con agua, el cual es colocado bajo un tubo de agua que corra suavemente durante 15 minutos. Lave después en agua destilada y tina.

LIQUIDO DE BOUIN. (Ver capítulo I.)

Se introduce en el fijador la muestra a estudiar, duran-

te 5 a 30 minutos, se lava en alcohol de 70%, hasta que el ácido pícrico sea arrastrado completamente de la preparación.

ACIDO ACETICO SUBLIMADO.

Solución saturada sublimada	100 cc.
Acido acético glacial	2 cc.

Este es el fijador original de la reacción nuclear de Feulgen. Fijación y tratamiento posterior semejante al del líquido de Schaudinn.

LIQUIDO DE CARNOY.

Alcohol absoluto	30 cc.
Acido acético glacial	10 cc.

Fijar durante 5 ó 30 minutos; lavar en alcohol de 95%.

TETROXIDO DE OSMIO.

Pueden usarse los propios vapores de la solución de Tetróxido de Osmio al 1%. Fijar 2 ó 5 minutos; lavar en agua corriente.

LIQUIDO DE FLEMMING.

Acido crómico al 1%	30 cc.
Tetróxido de Osmio al 2%	8 cc.
Acido acético glacial	2 cc.
	<hr/>
	40 cc.
	=====

Fijar durante 10 a 15 minutos; lavar en agua corriente - durante 1 hora o más.

b) Para el caso de Frotis Sanguíneos, éstos consisten en tomar muestras de la yema o punta de un dedo de las manos, o del lóbulo de las orejas, limpiando dichas partes previamente con alcohol al 70% y enseguida con una lanceta o un alfiler esterilizado hacer un piquete y se limpia la primera gota con gasa y se recibe la segunda en un portaobjetos limpio, gota que con la ayuda de otro portaobjeto colocado en plano inclinado, a 45°, se corre sobre la superficie del porta receptor. Ver figura 3.

Coloque el porta horizontalmente y séquelo, bajo una cubierta para evitar que partículas de polvo caigan sobre él o que algunos insectos como las moscas se posen sobre la preparación. Si está debidamente hecha, la película debe ser de una sola capa de células sanguíneas.

Existen tres tipos de frotis, a saber:

a) Película o gota fina. (Como el caso del ejemplo dado).

b) Película o gota gruesa. Se utilizan dos o cuatro gotas de sangre, las cuales se colocan en el centro de un área de 1 pulgada cuadrada, haciéndolas correr en una capa rasa con una aguja o con un porta objeto cortado. Observar después de secado. Si el frotis es bien hecho, el secado tomará dos horas o más. No seque al calor, pero sí puede colocar el frotis en una estufa a 37° C. Hasta lograr dicho propósito. Inmediatamente introduzca el frotis en agua y deshemoglobínice. Seque al aire de nuevo.

c) Gota fina y gruesa. Es una combinación de las anteriores y como tal se procede.

TINCION DE PROTOZOARIOS.

Este caso se trata a continuación, en parte, (coloración de protozoarios parásitos), no obstante, únicamente se dirá que los colorantes a base de Hematoxilina son los más empleados (Hematoxilina de Heidenhain, Delafield, Mayer, etc.,) utilizando otros tales como el Giemsa, Feulgen (3 soluciones: a) Hcl y b) Fucsínabisulfito de sodio y c) agua sulfurosa, método de impregnación de plata (para diferenciar organelos de cilios), existiendo dos tipos: el de Klein (1926) y el modificado de Gelei y Hórvarth, 1931; método de Fontana (para diferenciar filamentos polares de esporas de microsporidios) que emplea ácido tánico al 5% y ácido carbólico al 1% en partes iguales.

METODOS PARA LA COLORACION DE HEMATOZOARIOS PARASITOS

Hay varios colorantes a base de azul de metileno y eosina o de compuestos de estos productos. Todos derivan del primitivo método de Romanovsky y con ellos se tiñen los núcleos, flagelos, blefaroplastos, etc., de los parásitos en distintos tonos de rojo púrpura, mientras el citoplasma toma un color azul típicamente. Se emplean ampliamente para estudios hematólogicos, con técnicas semejantes a la que aquí describimos.

De ellos puede hacerse la siguiente división:

ALCOHOLICOS ...	Wright Leishman May-Grünwald
ACUOSOS	Giemsa Field J. S. B. Pancromo
MIXTOS	Panóptico

METODO DE WRIGHT (Wright, 1902)

Preparación de la solución madre:

Colorante en polvo	0.3 g.
Glicerina Q. P.	3 ml.
Alcohol metílico (sin acetona) 97	ml.

Mezclar bien el polvo con la glicerina, añadir el alcohol metílico y agitar perfectamente. El producto se guarda en frasco ámbar durante 2 a 3 semanas para que madure. Después se filtra y se conserva bien tapado.

Técnica para la tinción.

1. Cubrir el frotis o extensión de sangre con el colorante por 1.1/2 a 3 minutos.
2. Añadir sobre la preparación (sin quitar el colorante) una cantidad igual de agua con pH 6.8 - 7.0, y dejar que actúe durante 3 a 10 minutos.
3. Lavar con agua de la llave, preferiblemente a un chorro suave, y dejar secar la preparación.

Si se trata de una gota gruesa, como el colorante es a la vez fijador, hay que deshemoglobinizarla antes de comenzar la tinción, lo cual se consigue por inmersión en agua destilada.

Notas: Conviene hacer la coloración en el interior de una caja de Petri, sobre todo en lugares de clima tropical o muy seco, porque el líquido de Wright se hidrata con facilidad o pierde alcohol rápidamente por evaporación. Los tiempos óptimos para la tinción se obtienen ensayando cada solución colorante después de prepararla, pues no son iguales en todas. -- Las tinciones son menos consistentes que con otros métodos, pero es más rápido.

METODO DE LEISHMAN (Leishman, 1901.)

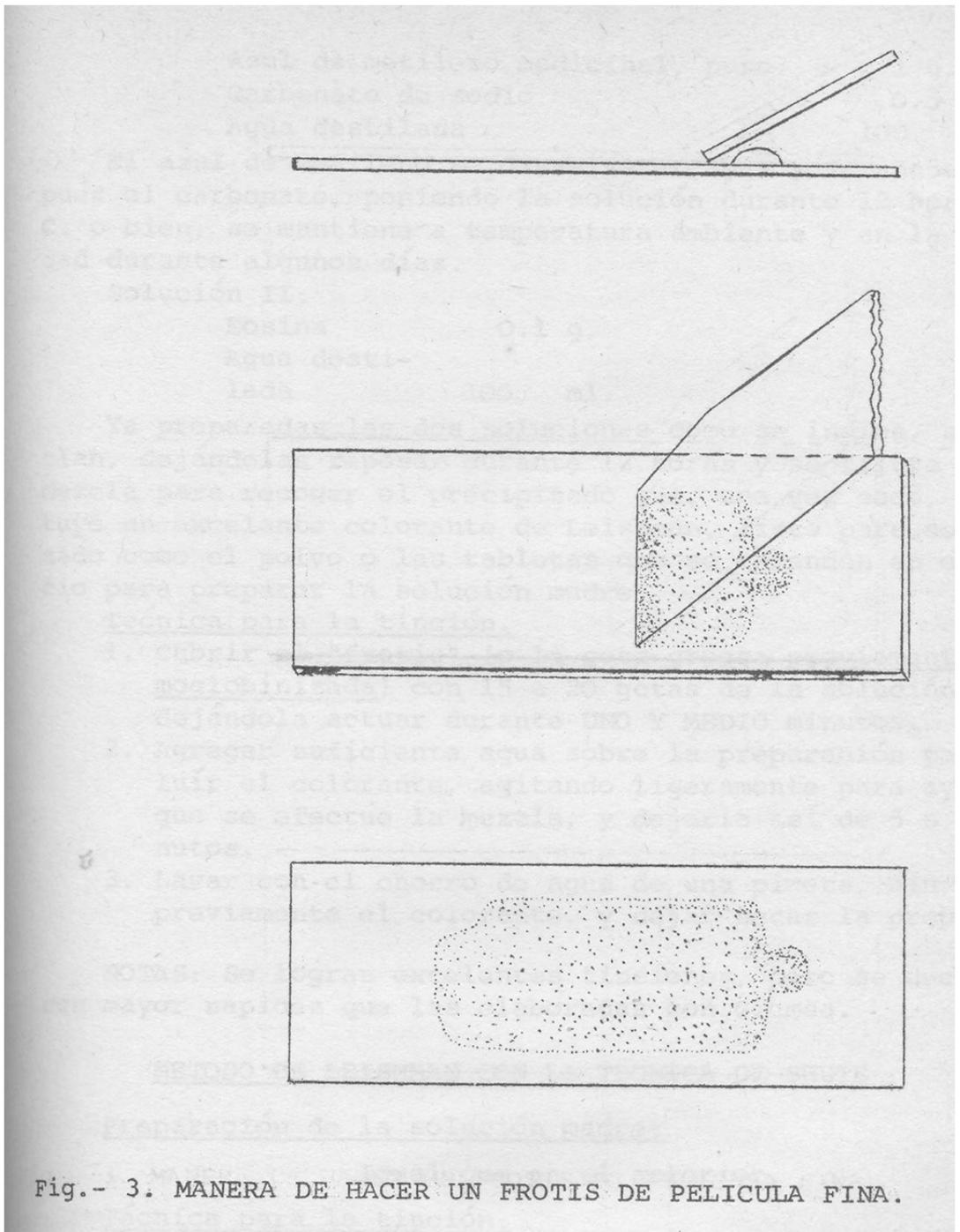
Preparación de la solución madre:

Polvo o tabletas de "Leishman"	0.15 g.
Alcohol metílico absoluto q. p.	100 ml.

Se deja madurar por lo menos 24 horas (o mejor de 2 a 3 semanas) y después se filtra.

Cuando no se dispone del polvo o las tabletas del colorante, éste se puede preparar de la siguiente manera:

Solución I:



Azul de metileno medicinal, puro	1 g.
Carbonato de sodio	0.5 g.
Agua destilada	100 ml.

El azul de metileno se disuelve en agua y se añade después el carbonato, poniendo la solución durante 12 horas a 65° C. o bien, se mantiene a temperatura ambiente y en la oscuridad durante algunos días.

Solución II:

Eosina	0.1 g.
Agua destilada	100 ml.

Ya preparadas las dos soluciones como se indica, se mezclan, dejándolas reposar durante 12 horas y se filtra esta mezcla para recoger el precipitado que, una vez seco, constituye un excelente colorante de Leishman, listo para ser utilizado como el polvo o las tabletas que se expenden en el comercio para preparar la solución madre.

Técnica para la tinción.

1. Cubrir el "frotis" (o la gota gruesa previamente deshemoglobinizada) con 15 a 20 gotas de la solución madre, dejándola actuar durante UNO Y MEDIO minutos.
2. Agregar suficiente agua sobre la preparación para diluir el colorante, agitando ligeramente para ayudar a que se efectúe la mezcla, y dejarla así de 5 a 10 minutos.
3. Lavar con el chorro de agua de una pizeta, sin quitar previamente el colorante, y dejar secar la preparación.

NOTAS: Se logran excelentes tinciones, pero se decoloran con mayor rapidez que las elaboradas con Giemsa.

METODO DE LEISHMAN CON LA TECNICA DE SHUTE

Preparación de la solución madre:

Igual que en el anterior.

Técnica para la tinción:

1. Poner 4 gotas del colorante sobre el "frotis" y moverle durante 10 segundos con un balanceo suave.
2. Añadir 12 gotas de agua destilada con Rojo Fenol, cuyo pH se ajusta a 7.2 mediante una solución saturada de carbonato de litio, y mezclar bien con el colorante, dejando actuar 10 minutos si se intenta teñir Plasmodium vivax, ó 30 - 45 minutos en el caso de P. malariae.

3. Lavar con el chorro de agua de una pipeta, sin tirar previamente el colorante, durante 15 segundos por lo menos, y dejar que se seque la preparación.

NOTAS: Esta técnica se emplea especialmente cuando se quiere obtener una buena coloración de las granulaciones de Schüffner o de Ziemann y de las manchas de Maurer que tanta importancia tienen en el estudio diferencial de los Plasmodium del hombre.

METODO DE MAY - GRUNWALD (1902)

Preparación de la solución madre:

polvo del colorante de May-Grunwald	0.30 g.
Alcohol metílico puro y neutro	100 ml.

Técnica para la tinción.

Para la coloración de protozoos parásitos no se utiliza normalmente sólo este producto, sino asociado a otro (Ver: - Panóptico), ya que no tiñe los núcleos de los parásitos, aunque colorea muy bien en azul los elementos basófilos y en rojo los acidófilos de la sangre.

Es un eosinato de azul de metileno no transformado en azur.

COLORANTES ACUOSOS

METODO DE GIEMSA

Preparación de la solución madre:

Se puede obtener esta solución ya hecha en el comercio; pero se prepara fácilmente con la siguiente fórmula e indicaciones:

Azur II eosina	3.0 g.
Azur II	0.8 g.
Glicerina Q. P. (200 ml)	250 g.
Alcohol metílico absoluto (312 ml)	250. g.

- En un matraz Erlenmeyer, disolver el Azur II eosina y el Azur II en la glicerina caliente a 60° C. agitando bien durante 15 minutos.
 - Agregar el alcohol metílico y agitar otros 10 minutos, dejando la solución después en reposo durante 24 horas en el matraz perfectamente tapado, poniendo papel de estaño o encerado en la boca del recipiente.
 - Filtrar a través de papel de grado medio, descartando el residuo que queda en el filtro y conservar el filtrado - (SOL. MADRE) en frasco bien tapado.
- NOTAS:- Conviene calentar previamente la glicerina hasta

60° C. antes de agregarle las sustancias colorantes, dejando reposar la solución durante dos horas después de que se hayan disuelto antes de adicionar el alcohol metílico.

Esta solución es bastante estable, pero debe conservarse en lugar no caliente y, preferiblemente, en frasco ámbar de cierre hermético.

Preparación del colorante diluido:

Conviene utilizar una solución reguladora (buffer) para que el colorante con el que se vaya a hacer la tinción tenga un pH de 7.2.

Excelentes resultados se logran con cualquiera de estas dos diluciones:

Solución madre .. 2 gotas ó 3 gotas (teñir durante 45 - 60')

Agua buffer pH. 7.2, 1 ml ó 2 ml.

A veces, para destacar particularmente ciertas estructuras de los parásitos, conviene diluir el colorante en agua - buffer de distintos pH. Para facilitar la preparación de estas aguas reguladoras es útil disponer de soluciones de los dos fosfatos que se indican a continuación en las proporciones anotadas en las fórmulas correspondientes, pues, a partir de ellas, se prepara el agua con el pH necesario según el cuadro adjunto:

Soluciones buffer (reguladoras):

"1"	Fosfato disódico anhidro	9.5 g
	Agua destilada	1000 ml
"2"	Fosfato de ácido de potasio	9.07 g
	Agua destilada	1000 ml

Preparación de un litro de agua buffer con el pH que se indica. Las cantidades de las soluciones "1" y "2" y de agua destilada se dan en ml.

pH	"1"	+	"2"	+	agua destilada
6.6	37		63		900
6.8	49		51		900
7.0	63		37		900
7.2	73		27		900
7.4	81		19		900

Técnica para la tinción:

1.- Fijar las extensiones (frotis) de sangre con alcohol metílico absoluto durante un minuto. Si se trata de

"gotas gruesas" no es preciso deshemoglobinizarse.

- 2.- Cubrir la totalidad de la preparación con la suficiente cantidad del colorante diluido para que éste forme un menisco sobre ella, y dejarle actuar durante 45 a 60 minutos, según la dilución empleada o la intensidad que se le quiera dar a la tinción.
- 3.- Tirar el colorante y lavar durante dos minutos la preparación en agua corriente, al chorro de la llave.
- 4.- Dejar secar la preparación, sin ponerla al calor o al sol, y observarla con objetivo de inmersión de aceite. No es necesario cubrir previamente la extensión o la gota de sangre coloreadas para su estudio.

NOTAS:- como es muy frecuente que en el mismo portaobjetos se tomen a la vez el frotis y la gota gruesa, conviene tener en cuenta lo siguiente al proceder a su coloración:

Cuando sólo se va a colorear la gota gruesa, debe fijarse previamente el "frotis" con alcohol metílico absoluto para evitar que pueda hemolizarse si se corre sobre él el colorante.

También puede dejarse el frotis sin fijar si se toma la precaución de separarle de la gota gruesa mediante una línea trazada con parafina o lápiz graso, lo cual permite cierta seguridad para el frotis no fijado, siempre que se mantenga bien horizontal la lámina al teñirla y que, al lavarla después, no se moje el frotis.

Otro procedimiento para colorear únicamente las gotas sin peligro de estropear la extensión de sangre que se ha hecho en el mismo portaobjetos consiste en introducir las láminas verticalmente en vasos de Coplin en los que se ha puesto previamente la solución de Giemsa hasta una altura adecuada para que no cubra más que las gotas por teñir.

El colorante preparado para una tinción (diluido) no debe guardarse más de 12 horas, puesto que suele precipitarse si se conserva un tiempo mayor. Por ello es preferible preparar sólo la cantidad que se vaya a utilizar cada vez, calculando aproximadamente que para cada lámina son precisos 1.5 ml.

Tampoco se empleará nunca para una segunda tinción el colorante ya utilizado sobre el portaobjetos.

La solución madre de Giemsa se puede preparar también a partir del polvo del colorante ya mezclado que se obtiene en el comercio. La Fórmula para su preparación es la siguiente:

Colorante en polvo 1 g.
Glicerina Q. P. 66 ml
Alcohol metílico absoluto (sin acetona) . . . 66 ml

Se mezcla el polvo con la glicerina, disolviéndole lentamente en baño maría a 55° - 60° C. Se deja enfriar y se le añade el alcohol metílico, dejando madurar la solución después de 2 a 3 semanas, al cabo de las cuales se filtra y se guarda, bien tapada, como "solución madre".

Cuando se tiñen tripanosomas, es frecuente que los protozoarios se deformen o se destruyan sus estructuras internas al colorearlos con Giemsa por el método usual. Para evitar esto se puede recurrir al siguiente procedimiento que da muy buenos resultados:

"Frotis".- Sobre un portaobjetos y cerca de uno de sus extremos se pone una pequeña gota de Azul Cresil Brillante - (solución 1% en alcohol absoluto). Con el extremo de otro porta se toma una gota de la sangre infectada; se mezclan rápidamente sobre el primero y se extiende el frotis. Se fija con alcohol metílico absoluto (un minuto) y se tiñe con Giemsa en la forma habitual.

"Gota gruesa".- Para colorear este tipo de preparaciones de sangre es preferible usar la siguiente solución:

Azul de Cresil Brillante	1 g.
Formalina de 40%	1 ml
Oxalato de potasio en Sol. salina	100 ml
Acido acético	0.2 ml

Se coloca una gota de la solución y al lado de una de sangre; se mezclan y se extienden sobre una superficie de unos 2 cm. de diámetro; se deja secar y se tiñe con Giemsa en la forma normal.

METODO DE GIEMSA RAPIDO R. A. L.

Esta técnica es recomendable por su sencillez aunque no da resultados tan buenos como otras en las que el tiempo de coloración es más largo. Se usa el colorante puro; Giemsa R. marca R. A. L., y se usa para la tinción de "frotis" de sangre o para colorear parásitos tisulares en cortes histológicos.

Técnica para la tinción de "frotis":

1.- Sobre el frotis seco, que se coloca en el fondo de una caja de Petri, verter 10 gotas del colorante puro y dejar que actúe durante 30 segundos.

- 2.- Poner sobre la preparación tantos ml de agua de pH - neutro como gotas del colorante se vertieron antes en ella, mezclándolas con él y dejando que se tiña la preparación durante 30 minutos.
- 3.- Lavar con agua destilada y dejar secar la lámina que queda lista para su observación.

Técnica para la tinción de cortes histológicos:

- 1.- Tratar los cortes con agua neutra, dos veces sucesivas, 5 minutos cada una.
- 2.- Colorearlos como si fueran frotis (1 y 2 de la técnica anterior).
- 3.- Sumergirlos en agua neutra durante 5 minutos.
- 4.- Diferenciar y deshidratar rápidamente, con dos pasos por acetona neutra.
- 5.- Pasarlos a Xilol y, después, montarlos en bálsamo de Canadá.

METODO DE SHORTT Y COOPER (MODIFICACION DEL DE MCNAMARA, 1933) PARA TEÑIR CON GIEMSA PARASITOS EN CORTES HISTOLOGICOS (1947)

Tiene la ventaja de teñir células y protozoos parásitos en cortes de tejidos, con efectos de color que se asemejan a los que exhiben las preparaciones de sangre coloreadas con GEIMSA.

Preparación del colorante:

Colorante de Giemsa (Sol. madre),	10 ml
Acetona	10 ml
Alcohol metílico absoluto	10 ml
Agua buffer pH 7.2 - 7.4 (destilada)	100 ml

Técnica para la tinción:

- 1.- Fijar en líquido de Zenker formol salino u otro fijador apropiado.
- 2.- Incluir en parafina y cortar.
- 3.- Quitar la parafina con Xilol.
- 4.- Eliminar el Xilol con alcohol.
- 5.- Sumergir en agua corriente, de la llave.
- 6.- Tratar los cortes con 5 ml de Lugol en 30 ml. de agua destilada (#)
- 7.- Transferir a alcohol de 95%.
- 8.- Llevarlos a agua corriente, de la llave.
- 9.- Tratarlos con solución acuosa de hiposulfito de sodio al 0.5% durante 10 minutos.
- 10.- Lavar en agua corriente durante 5 minutos.

- 11.- Teñir durante una hora o más con el colorante arriba mencionado.
- 12.- Lavar rápidamente con agua corriente.
- 13.- Diferenciar con una solución de 15 g de Colofonia en 100 ml de acetona, durante 15 segundos o más utilizando el objetivo débil del microscopio. Renovar la solución cuando se forme una "película".
- 14.- Lavar en una mezcla de 70 ml de acetona y 30 ml de Xilol con varios cambios.
- 15.- Aplicar Xilol sobre los cortes sin lavar la lámina, y después poner varias veces más Xilol hasta que se aclare la preparación.
- 16.- Montar en Euparal Verde.

NOTAS.- Para el estudio de formas exo-eritrocíticas de Plasmodios los autores del método emplean como el mejor fijador - el Carnoy (fórmula con Cloroformo).

En el caso de tejidos fijados en líquidos no mercuriales, deben omitirse los pasos 6 a 10.

La técnica original de McNamara (1933) se halla publicada en:

J. Lab. Clin. Med., XVIII, 752.

METODO DE FIELD (1941)

Es una de las técnicas de coloración que requieren menor cantidad de tiempo para obtener una preparación coloreada correctamente. De gran utilidad para el diagnóstico, se emplea fundamentalmente para investigar hematozoarios en gota gruesa.

Preparación del colorante:

Solución 1.-

Azul de metileno	0.8 g
Azur B	0.5 g
Fosfato disódico (anhidro)	5.0 g
Fosfato potásico ácido (anhidro)	6.25 g.
Agua destilada	500 ml.

Solución 2.-

Eosina	1.0 g.
Fosfato disódico (anhidro)	5.0 g.
Fosfato ácido de potasio (anhidro)	6.25 g.
Agua destilada	500 ml

Primero se disuelven las sales (en las dos soluciones) y después se añaden los colorantes, cuidando de triturar bien el Azur B. en un mortero con un poco de la solución de fosfatos. Deben dejarse en reposo ambas soluciones durante 24 horas y, después, se filtran. Si volviese a aparecer algún precipitado

en ellas, hay que pasarlas de nuevo por papel de filtro.

Las soluciones se pueden guardar durante varias semanas e, incluso, se puede teñir varias veces con las que se conservan en vasos de Coplin tapados.

Cuando la solución de Eosina se pone verdosa, debe reemplazarse por otra nueva.

Técnica para la tinción:

Este colorante se emplea de preferencia para teñir gotas - gruesas que se hacen en tal forma que, a su través, puedan distinguirse las manecillas de un reloj de pulsera.

La gota gruesa de sangre NO SE FIJA, pero antes de iniciar la tinción debe estar bien seca. Se colorean mejor las gotas - recién tomadas.

- 1.- Sumergir la preparación en la Sol. 1 1 segundo.
- 2.- Lavar enseguida en agua corriente (de la llave) hasta que deje de soltar colorante.
- 3.- Sumergir la preparación en Sol. 2 1 segundo.
- 4.- Lavar en agua limpia.
- 5.- Dejar secar la lámina en posición vertical.

COLORANTE J. S. B.

(Jaswant, Singh y L. M. Bhattacharji, 1944)

Utilizando este colorante se consigue teñir frotis o gotas gruesas con mejores resultados que con la técnica anterior y en un tiempo también bastante corto. Las preparaciones pueden conservarse durante mucho más tiempo sin alterarse.

Preparación del colorante:

Solución I.-

Azul de metileno medicinal	0.5 g.
Bicromato de Potasio	0.5 g.
Acido sulfúrico al 1%	3 ml.
Agua destilada	500 ml.

Disolver totalmente el Azul en el agua, agregar el ácido sulfúrico y mezclar bien; después añadir el bicromato. Se forma un precipitado espeso y amorfo de Cromato de Azul de Metileno que tiene color púrpura.

Ponerle en autoclave de 100° a 109° C. (sin llegar nunca a 110° C.) durante 3 horas. Al cabo de este tiempo el líquido debe ser azul; pero si está verdoso, hay que volverle a calentar en autoclave una hora más. Conviene cuidar que no se torne

violeta por exceso de oxidación.

Dejar que se enfríe; después, añadirle 10 ml de Potasa o Sosa al 1% gota a gota, muy lentamente, sacudiendo el líquido en forma continua.

Verter la mitad del colorante en otro matraz de la misma capacidad que el primero y agitarle durante 15 minutos, mezclando de nuevo después, las dos mitades. El precipitado debe disolverse gradualmente y la solución ha de adquirir un color azul profundo con reflejo violeta.

Dejar que madure 48 horas a la temperatura del laboratorio y después filtrarla a través de papel. Esta solución mejora cuando va envejeciendo.

Solución II.-

Eosina	1 g.
Agua destilada	500 ml.

Dejar que madure algún tiempo, porque cuando llega a adquirir un color rojo obscuro tiñe mejor que la solución acuosa preparada recientemente.

Solución III.- (Agua acidulada: pH 6.2 - 6.6)

Acido acético (o Ac. cítrico al 5%)	5 gotas
Agua destilada	100 ml.

Esta solución diferenciadora se puede hacer también así:

Fosfato monosódico	0.05 g
Agua destilada	100 ml

Técnica para la tinción:

"FROTIS" O EXTENSIONES.

- 1.- Fijación con alcohol metílico 1 - 2 minutos.
- 2.- Después de secos al aire, colorearlos por inmersión en el azul 30 "
- 3.- Lavar brevemente con el agua acidulada (solución III)
- 4.- Colorear con la solución de Eosina (Solución II) 1 "
- 5.- Diferenciar en agua acidulada (solución III) 4"- 5 "
- 6.- Volver a teñir con el azul (solución I) 30 "
- 7.- Diferenciar con el agua acidulada hasta obtener un fondo color rosa (solución III) 4"- 5 "
- 8.- Dejar que se seque la preparación y estará lista para su examen.

NOTA: Para facilitar el paso de una a otra de las diferentes soluciones es conveniente colocar en un frasco de Coplin cada una de ellas en cantidad suficiente para que pueda quedar cubierto el frotis entero.

GOTAS GRUESAS

- 1.- Sin fijar previamente, se tiñen las gotas sumergiéndolas en el azul (solución I) 10"
- 2.- Diferenciar en agua acidulada (solución III) .. 2"
- 3.- Colorear con la Eosina (solución II) 1"
- 4.- Volver a diferenciar con agua acidulada (Sol. III) 5"
- 5.- Reteñir por inmersión en azul (solución I) . . . 10"
- 6.- Diferenciar de nuevo con la solución III durante 2"
- 7.- Después de haber obtenido un fondo color rosa con la solución diferenciadora (a veces se logra antes de 2") dejar secar la preparación para poderla examinar.

NOTA: Como en el caso de la coloración de los frotis de sangre, se facilita mucho el trabajo si se ponen las diferentes soluciones en vasos de Coplin, con la cantidad suficiente de cada una para que cubra exclusivamente la gota por teñir.

PANCROMO

Este colorante tiene la facultad de teñir a la vez, meta cromáticamente, las estructuras basófilas y las acidófilas de los protozoarios y de las células hemáticas.

La solución madre (Pancromo R.A.L.) se obtiene en el comercio y está compuesta de una mezcla, tipo Giemsa, de Azul de Metileno, Azúr de Metileno y Eosina, más Azul de Toluidina y Violeta de Metileno, todo ello disuelto en alcohol metílico, acetona y glicerina.

Técnica para la tinción:

Se practica exactamente como si se utilizara Giemsa, diluyendo convenientemente la solución madre:

Para teñir frotis también puede emplearse sólo el Pancromo como fijador y colorante a la vez, del modo siguiente.

- 1.- Colocar el frotis en el fondo de una caja de Petri y cubrirle con 15 gotas de Pancromo (Sol. madre), cerrando la caja y dejándole así 3 minutos.
- 2.- Sin tirar el colorante, agregar sobre el frotis 10 ml. de agua destilada neutra, mezclar bien y dejar - que actúe de 15 a 20 minutos como mínimo.

- 3.- Lavar con agua de una pizeta y diferenciar con solución de ácido bórico al 1% hasta conseguir el contraste deseado. Esta solución actúa lentamente.
- 4.- Secar la preparación por escurrimiento, poniéndola -- verticalmente en un soporte apropiado.

NOTAS: El Azul de Toluidina produce una coloración intensa de los elementos acidófilos y el Violeta de Metileno tiñe meta cromáticamente los cromotropos basófilos.

C O L O R A N T E S M I X T O S

METODO PANOPTICO DE PAPPENHEIM (1908)

En él se emplean sucesivamente los colorantes May-Crúnwald y de Giemsa. El primero tiñe principalmente los elementos acidófilos y las granulaciones neutrófilas de los leucocitos; el segundo los núcleos y las partes azurófilas.

Preparación de las soluciones colorantes:

(Ver páginas 19 y 20)

Técnica para la tinción:

"FROTIS"

- 1.- Colocar la preparación en el fondo de una caja de Petri y cubrirla totalmente con 10 - 15 gotas del colorante de May-Grünwald (fijación), dejándole actuar durante 3 minutos en la caja tapada.
- 2.- Agregar sobre el frotis 10 - 15 gotas de agua destilada (las mismas que se pusieron del colorante), mezclarlas con el May-Grünwald moviendo o inclinando la lámina en varios sentidos, y dejar que actúe durante un minuto.
- 3.- Tirar el colorante diluído y, sin lavar, cubrir la -- preparación con una solución de Giemsa en la proporción de 3 gotas por cada 2 ml de agua destilada, dejando actuar el nuevo colorante de 5 minutos a una hora, según sea de antiguo el frotis. Para un frotis recién hecho basta con 10 ó 15 minutos.
- 4.- Lavar rápidamente con el chorro de agua destilada de una pizeta, sin inclinar la preparación para que la película irisada que se formó no se adhiera al frotis y puedan ser arrastrados todos los precipitados.
- 5.- Dejar secar la preparación en posición inclinada, no al calor.

GOTA GRUESA

La técnica de tinción es igual; pero es necesario hemolizar la gota antes de iniciar el proceso de coloración.

NOTAS: Si la tinción es demasiado azul o muy intensa, se puede diferenciar mediante un lavado prolongado de agua destilada o, mejor aún, empleando para tal fin una solución de ácido bórico al 1% (o de fosfato monosódico en la misma proporción) dejándola secar después de haber conseguido el contraste deseado.

Durante el proceso de fijación y coloración es de suma importancia que la preparación no se seque. Sin embargo, cuando esto ocurra, se puede remediar el accidente lavando el frotis o la gota con alcohol metílico hasta que se disuelva el precipitado adherente y, enseguida, se vuelve a cubrir con el colorante May-Grünwald como en el primer tiempo de fijación, para continuar la técnica en la forma antes anotada.

Las preparaciones teñidas con el Panóptico de Pappenheim se conservan perfectamente sin montarlas. El bálsamo del Canadá, Permout, Clarite, etc., no son aconsejables para cubrir las, porque esta coloración se altera frecuentemente con los medios ácidos o con los que son reductores.

Se puede constituir en esta técnica el May Grünwald por el colorante de Leishman como fijador. Para ello, se ponen sobre el frotis 20 gotas de éste y se dejan actuar durante 1 minuto pasado el cual, se tira el colorante sin lavar y se vuelve a cubrir con el Giemsa diluido, continuando la tinción como en la técnica indicada anteriormente.

NOTA: Puede obtenerse las soluciones indicadas en comercios especializados, lo cual evita la molestia de prepararlas.

C A P I T U L O V T E C N I C A S D E F I J A C I O N Y T I N C I O N P A R A A L G A S M A R I N A S

Las fijaciones se hacen algunas veces en formol al 6%, que es el método más común, y en el cual el material permanece durante mucho más tiempo. También es empleada la fijación en una solución de ácido acético - ácido crómico al 1% la cual es recomendada por Johansen. Esta fijación se lleva a cabo en agua de mar, siendo suficientes 10 minutos, ya que en un tiempo mayor se destruye el material, sobre todo cuando es muy delicado como sucede en la mayor parte de los representantes de la familia Rhodomelaceas. Una vez hecha la fijación, se lava el material con agua de mar hasta la eliminación total del fija--

dor. Después del lavado se va substituyendo el agua de mar -- por agua destilada y alcohol en forma dual, siguiendo la tabla expuesta a continuación:

Tabla I

Agua de mar	90	80	65	50	35	20
Agua destilada	5	10	20	30	35	40
Alcohol etílico de 96%	5	10	15	20	30	40

Se deja que el material permanezca una hora como mínimo en cada solución y una vez hechos todos estos cambios se lleva a alcohol etílico de 50% en donde puede guardarse por largo tiempo.

FIJADOR PARA CORALINACEAS.

Se usa para las coralíneas a las cuales fija el contenido celular y descalcifica, permitiendo con ello una inclusión satisfactoria: este fijador es una mezcla de los siguientes reactivos:

Formol	10 cc.
Acido Acético	8 cc.
Cloruro de sodio	1 g.
Alcohol etílico	50 cc.
Agua destilada	100 cc.

DESCALCIFICADOR DE CLOROFICEAS.

Partes iguales de formol al 10% y ácido acético al 5.

En ambos casos se deja inmerso el material en el fijador durante varios días con el objeto de eliminar la mayor cantidad posible de sales de calcio, posteriormente se lava el material con agua corriente para eliminar el fijador y se lleva de una manera gradual a alcohol etílico de 50%

I N C L U S I O N.

In toto.- Se hacen necesarias en casos donde el material es pequeño y además sensible a la hidratación y deshidratación. Este fenómeno se debe a que los carbohidratos presentes en -- las cápsulas de secreción forman coloides hidrófilos que se hinchaban con el exceso de agua y se contraen cuando la pierden, deformándose el material con estos cambios. Se toman porciones pequeñas de material, los cuales después de fijar y lavar en agua corriente, se llevan a la tinción.

De cortes.- Se deshidrata el material fijado de manera gradual. Para las primeras se emplea alcóhol etílico de 5, - 10, 20, 30, 40 y 50%, procediéndose a la siguiente deshidratación con alcohol butílico terciario, el cual se prepara de la siguiente manera:

Tabla II

Porcentaje de alcohol aproximado	50	70	85	95	100
Agua destilada	50	30	15		
Alcohol etílico de 96°	40	50	50	45	
Alcohol butílico terciario	10	20	35	55	75
Alcohol etílico absoluto					25

El material se tiene en cada solución alcohólica un -- tiempo mínimo de 2 horas.

Una vez puesto el material en la mezcla de alcohol butílico terciario absoluto, se continúa la deshidratación en éste mismo, suprimiéndose de esta manera el alcohol etílico. Se hacen tres cambios de alcohol butílico terciario absoluto con tiempo mínimo de 2 horas cada uno. Al último alcohol butílico terciario se le agrega posteriormente una cantidad -- igual de vaselina OP. lográndose la transparentación del material. Obtenida la deshidratación total se incluye en parafina.

La primera inclusión, que es el paso de alcohol butílico-vaselina a parafina se hace de la siguiente manera: se -- lleva la parafina hasta su punto de fusión; una vez fundida se lleva al punto de solidificación y sobre ella se coloca -- el material listo para la inclusión junto con unas gotas de la solución alcohol butílico-vaselina. Se pone en la estufa para que se funda nuevamente y en ese estado el material se impregnará lentamente de parafina.

Los tiempos aproximados que permanecen los trozos en cada parafina son los siguientes:

Cambio de alcohol butílico-vaselina a parafina 1 con P. F. 53-55, dos horas.

Cambio de parafina No. 2 con P. F. 53-55, 12 horas.

Cambio a parafina No. 3 con P. F. 56-58, 2 horas.

Inclusión definitiva en parafina con P. F. 56-58.

Se hacen Bloquesitos de 1.5 cm. por lado aproximadamente quedando listo el material para cortarse y teñirse.

3o. La tinción.

Es variada, usándose varios colorantes. Se hacen cortes de 10 hasta 100 micras, los cuales se montan en portaobjetos en los que previamente se ha puesto albúmina de Mayer y se -- desparafina con Xilol, procediéndose de inmediato a la deshidratación en los alcoholes siguientes: Alcohol etílico de 100, - 96, 85, 75, 50 y 30%, 5 a 10 minutos cada uno; enseguida se - pasa a agua destilada.

El paso de la hidratación hasta agua no es necesario en todos los casos. Por ejemplo para el café de Bismarck sólo se llega hasta alcohol de 70%, ya que el colorante se encuentra disuelto en alcohol de esta concentración; en la hematoxilina de Harris y de Delafield la coloración se hace después de alcohol de 50%.

Azul de algodón.- Esta coloración se hace directamente sin necesidad de incluir. Después de fijado y lavado, el material se corta por congelación e incluso se hacen cortes finos a mano. Los cortes se ponen en el colorante de 3 a 10 minutos y de ahí se pasan a portaobjetos, montándose en lactofenol; las preparaciones se tiñen de azul, quedando así listas para observarse. Esta tinción es muy útil para ver estructuras de Rodofíceas y Feofíceas y sirve muy bien para preparaciones "in toto".

Café de Bismarck.- Esta tinción se usa en Feofíceas, Rodofíceas y Clorofíceas, en cortes e inclusiones. La hidratación se lleva hasta alcohol de 70%, pasándose de inmediato al colorante, dentro del cual se mantienen durante 20 minutos; - después de este tiempo, las preparaciones se lavan con alcohol de 96% y se contrastan con verde ácido (en solución de aceite de clavo-celosolve metílico) durante 10 segundos aproximadamente.

Hemaroxilina de Heidenhein.- Se usa en Clorofíceas, Cianofíceas y Rodofíceas. Los cortes obtenidos a través de la inclusión, se hidratan gradualmente hasta agua., pasándose a una solución de alumbre férrico al 2% como mordente, en el cual - se mantienen durante 2 horas; en seguida, el material se lava rápidamente, primero con agua corriente y a continuación con agua destilada, de tal manera que se elimine el exceso de alumbre férrico, pasándose de inmediato a la hematoxilina, donde permanecen aproximadamente 12 horas; después de este tiem-

po se elimina el exceso de colorante con agua destilada. El material teñido por medio de esta técnica se colorea excesivamente, por lo que es necesario diferenciar con alumbre férrico de la misma concentración del usado como mordente (se puede usar el mismo alumbre en el que se ponen los cortes), controlando este paso por medio del microscopio. Una vez obtenida la coloración deseada se lava inmediatamente con agua corriente, durante una hora o más hasta la eliminación total del alumbre, procediéndose después a la deshidratación gradual hasta alcohol de 96%, paso en el que se usan los colorantes de contraste, tales como anaranjado G, azul de anilina, eritrosina o verde ácido. Se deshidrata con alcohol absoluto, se aclara con Xilol y se monta en bálsamo de Canadá.

Hematoxilina de Harris.

El material incluido se corta, desparafina e hidrata hasta alcohol de 50%, pasándose a la hematoxilina, donde los cortes permanecen durante 20 minutos. El exceso de colorante se quita con agua destilada (los casos en que hay sobrecoloración el material se diferencia con agua acidulada), el material teñido de rojo se pasa a agua de la llave con el fin de obtener una coloración azulvioleta; una vez obtenida ésta, se lava con agua destilada (en ocasiones para aclarar las estructuras celulares, se pone una pequeña cantidad de carbonato de litio en el agua) y se deshidrata hasta el alcohol necesario para usar el colorante de contraste. Por ejemplo, en el caso de la eosina, se lleva la deshidratación hasta alcohol de 70%, se tiñe con el colorante durante 10 minutos, se lava con alcohol de 96%, alcohol absoluto, xilol y se monta en bálsamo de Canadá. Para los colorantes de contraste disueltos en alcohol de 96%, se lleva la deshidratación hasta alcohol de esta concentración, se tiñe durante 15 o 20 segundos aproximadamente; se deshidrata con alcohol absoluto, se aclara con xilol y se monta en bálsamo. Los colorantes de contraste, disueltos en celosolve metílico-aceite de clavo, se usan de la siguiente manera: la deshidratación se lleva hasta alcohol absoluto y se tiñe en el colorante de contraste, el exceso de éste se elimina primero con aceite de clavo (50%) alcohol absoluto (25%), xilol (25%), que además sirva como aclarante, finalmente se pone xilol quedando listas las preparaciones para montarse en bálsamo.

En otras ocasiones las preparaciones una vez teñidas en la hematoxilina, no se llevan hasta la deshidratación. En este caso, quitando el exceso de colorante y obtenido el vire de color rojo a azul violeta, se contrasta con verde ácido en so

lución acuosa durante 15 segundos aproximadamente, el exceso de colorante se elimina con agua destilada y se monta en miel Karo. Las preparaciones montadas en miel Karo y contrastadas con eosina son hechas de la siguiente manera: obtenido el vire de color de la hematoxilina, se deshidrata hasta alcohol de 70%, se pone el colorante y se lava con alcohol de 50%, -- 30%, y agua, montándose enseguida.

Las preparaciones "in toto" se hacen con el siguiente procedimiento: el material fijado se lava primero en agua corriente y enseguida en agua destilada; se tiñe con hematoxilina (durante 15 minutos) lavándose con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante, obteniéndose al mismo tiempo el vire de rojo a azul violeta; se lava con agua destilada, -- se contrasta con verde ácido (solución acuosa), se hace un -- nuevo lavado con agua destilada y se monta con miel Karo. Se contrasta también con eosina, siguiendo para este caso los pasos mencionados en preparaciones fijas obtenidos por la inclusión y montadas en Karo. Otro tipo de contraste se hace con eritrosina (al 1% en alcohol de 96%); para ello el material -- se deshidrata hasta alcohol de 96%, se tiñe durante 15 segundos, el exceso de colorante se quita con alcohol de 70%, 50%, 30% y agua montándose en miel Karo. Este mismo tipo de contraste se usa para preparaciones montadas en bálsamo, solamente que el material, una vez contrastado se lava con alcohol absoluto y xilol. Los mismos pasos son usados para contrastar con verde ácido en alcohol de 96%.

Hematoxilina-lugol de Papamiltiades. - Se usa en Clorofíceas, Feofíceas y Rodofíceas. Los cortes se hacen por inclusión, congelación y además preparaciones "in toto".

Una vez obtenidos los cortes por congelación son llevados a hematoxilina durante 3 minutos. Para quitar el exceso de colorante, se lavan con agua de la llave donde viran de rojo a azul violáceo a partir del primer minuto. Las preparaciones montadas en miel Karo son contrastadas con verde ácido -- (solución acuosa), de acuerdo con los pasos mencionados anteriormente.

Los cortes por inclusión son desparafinados e hidratados hasta agua, de ahí se pasan a hematoxilina; el tiempo de coloración y viraje es el mismo que se señala para los cortes de congelación; se lavan con agua destilada y se deshidratan hasta alcohol de 96%, contrastándose con eritrosina y verde ácido. Se lavan con alcohol absoluto, xilol, montándose en bálsamo.

Ahora bien, 10 minutos son suficientes para la fijación del contenido celular en cualquiera de los grupos mencionados con lo cual el material no queda expuesto a la destrucción. Sin embargo, es de hacer notar que las algas calcificadas necesitan un tiempo mayor para su fijación y que el fijador especial para éstas contiene también ácido pero no hay destrucción del material. Por el contrario, cuanto mas tiempo permanezcan las algas dentro del fijador, las posibilidades de una buena fijación son mayores, porque en este caso el talo está impregnado de sales de calcio y un tiempo mayor es favorable para la decalcificación. Tal es el caso de Li thophyllum, Coralina y Amphyroa dentro de las Rodofíceas y de Ripócephalus, Halimeda y Cymopolia, en las Clorofíceas.

La deshidratación previa a la inclusión es un punto muy importante. Es sabido que el xilol no penetra en un material mal deshidratado y que si no penetra éste, no se difunde la parafina; y debido a esto, dicho material se desintegra al -- cortar.

Generalmente, el deshidratante más usado es el alcohol etílico, el cual se emplea en concentración gradual hasta llegar a alcohol absoluto; el material es aclarado con xilol, que penetra en los tejidos (en caso de no existir agua) de tal manera que, cuando se sumergen en la parafina, ésta se disuelve en el xilol, ocupando todas las regiones que antes ocupara éste. Cuando los tejidos permanecen mucho tiempo en el xilol, se endurecen, se contraen y se vuelven quebradizos. En el caso de las algas marinas esta acción es casi inmediata, principalmente en las Rodofíceas, a excepción de las Coralináceas. Es por esta razón que las técnicas histológicas botánicas modernas, recomiendan el uso del alcohol butílico terciario, que es un magnífico deshidratante y sobre todo, evita el uso del xilol, ya que una vez lograda la deshidratación se usa vaselina Q.P. como aclarante, la cual a su vez disminuye la rigidez causada por la deshidratación.

Cuando el material no está bien deshidratado, al poner -- la vaselina y agitar la mezcla alcohol butílico terciario-vaselina, ésta se torna blanquizca o lechosa, mientras que, cuando la deshidratación es correcta, la mezcla es transparente. Este fenómeno es muy importante ya que evita que se lleve a la parafina el material que aún contiene agua, asegurándose de esta manera, una buena inclusión.

Los cortes del material incluido, en el caso de las algas marinas, deben ser preferentemente de grosor variable entre 50 y 100 micras, ya que las células vegetativas generalmente son

muy grandes y los cortes de un tamaño menor sólo permiten la observación de cápsulas vacías e incluso de grandes huecos - que sólo revelan la existencia de las células. Por ejemplo, - en el caso de Codium los cortes de 10, 15 y 25 micras no son recomendables debido a que solamente pueden observarse fragmentos aislados en las preparaciones.

Un colorante con el que se obtienen buenos resultados es el azul de algodón, las estructuras pueden observarse perfectamente, además presenta la ventaja de ser una tinción, rápida que no requiere el uso de cortes especiales, basta con hacer cortes a mano con una navaja de rasurar o bien un fragmento "in toto" a los cuales se les pone unas gotas de azul, se montan en lactofenol y se observan enseguida; sin embargo, esta técnica presenta el inconveniente de no servir para hacer preparaciones fijas, pues este tipo de colorante no seca y las preparaciones solo pueden conservarse poco tiempo poniendo cemento Kronin alrededor. Hay que hacer notar que es una técnica recomendada para el estudio rápido de las algas marinas cuando se puede evitar la manufactura de las preparaciones fijas, las cuales requieren un tiempo mayor para su elaboración.

En cambio con el café de Bismarck los resultados son más satisfactorios. Esta técnica es recomendada por Johansen, en especial para las Feofíceas, pero puede usarse también en algas Rodofíceas, tales como Acanthophora y Bryothanmiun en donde la observación de las estructuras se determina bastante bien.

La coloración mas indicada para la obtención de preparaciones fijas de algas marinas es la que se hace con hematoxilina, la cual, puede prepararse por varias fórmulas, que varían en cuanto al tiempo requerido para la preparación del colorante, y el tiempo necesario para lograr la tinción.

Pero esto no puede decirse de la coloración para determinar detalles intranucleares o intracelulares, para los cuales es preferible el uso de las hematoxilinas de Heidenhain, Harris o hematoxilina lugol de Papamiltiades.

Las hematoxilinas con lugol o con sulfato de zinc son colorantes de técnica rápida; la preparación de ellas no requiere un tiempo mayor de 30 minutos y pueden usarse inmediatamente después de hechas, es decir, no necesitan madurarse, la coloración es rápida, aproximadamente de 3 minutos y el viraje de rojo a azul en agua de la llave es de 1 a 2 minutos, o sea, que se necesita un tiempo aproximado de 5 minutos para teñir las estructuras, sobre todo con la hema

toxilina lugol, con la que se pueden apreciar detalles nucleares y citoplasmáticos. En las preparaciones "in toto" los cistocarpos se tiñen con bastante detalle como en el caso de -- Polysiphonia y Ectocarpus: Las tetraesporas también se observan claramente en el género Spyridia.

Debido a esta razón el material de este tipo debe montarse en miel Karo, pues a través de este paso se evita la deshidratación y con ello la contracción (esta miel es una mezcla de dextrinas, maltosa y dextrosa, presentando la particularidad de secar sin cristalizarse por lo cual puede usarse perfectamente en el montaje de preparaciones finas). En este caso el material una vez teñido se lava perfectamente y se monta. Es de recomendarse que la miel sea fresca, pues cuando está muy concentrada el material se contrae.

Material montado "in toto".

Al hablar sobre este tipo de preparaciones se da a entender que se trata de una pequeña parte del material, es decir, no es toda la planta en sí. Aquí se refiere exclusivamente a una porción pequeña de ella o a una rama que indicará la constitución general de toda la planta, que aunque grande en aspecto, está formada de pequeñas células o bien de formas difíciles de cortar, tal es el caso de Cladophora, Ectocarpus, Elachistea, Pilayella, Spyridia, Ceramium y Polysiphonia.

Para contrastar deben usarse preferentemente eritrosina, verde ácido o anaranjado G. El montaje puede hacerse en bálsamo de Canadá, usando como aclarante xilol, pero en los cortes por congelación es recomendable sustituir este último por creosota; para los géneros Ulva, Enteromorpha y Cladophora es preferible el uso de miel Karo.

2.- Para las Feofíceas es preferible el uso de ácido acético, ácido crómico, como fijador. Para la deshidratación, el empleo del alcohol butílico terciario es el más adecuado. Los cortes de la familia de los Dictiotales requieren un grosor de 50 a 100 micras, pero en otros géneros es necesario hacer cortes de mayor tamaño; para los Ectocarpales se recomiendan las preparaciones "in toto".

3.- La fijación de las Rodofíceas con ácido acético-ácido crómico debe ser controlada o en todo caso es preferible el uso de formol; para las Coralináceas es necesario el empleo de fijadores especiales o bien decalcificantes.

4.- Haciendo una referencia en particular a las hematoxilinas, hay que indicar que la hematoxilina lugol puede sustituir a los otros tipos de hematoxilina, obteniéndose con ella no solamente una tinción general, sino incluso específica para materiales nucleares, teniendo como ventaja el poco

tiempo que necesita para su preparación, así como para teñir, que como se ha indicado anteriormente se efectúa en un tiempo aproximado de 5 minutos (contando la coloración y el viraje).

C A P I T U L O V I

D I S O L U C I O N E S .

Como la mayoría de las reacciones se efectúan en disolución, se debe primeramente recordar algo de lo que previamente se ha aprendido sobre disoluciones, particularmente la terminología de éstas.

Una disolución es una mezcla homogénea de dos partes, el soluto y el disolvente. El soluto es generalmente considerado como un sólido que se pone en una disolución (sal, azúcar, -- KNO_3 , etc.), pero este término también puede aplicarse a los líquidos o gases (glicerina o alcohol disueltos en agua o gas H_2S disuelto en agua). Para tener una mezcla homogénea es sin embargo, necesario que el soluto se distribuya uniformemente en toda la mezcla; el medio por el cual queda distribuido se conoce como el disolvente.

El primer disolvente en que se piensa es el agua; ésta - representa un papel de disolvente tan frecuente que se le ha llamado el disolvente universal. Pero hay otros muchos disolventes, tales como el alcohol, gasolina, cloroformo, amoníaco líquido, etc.

El soluto es la materia que se disuelve o la materia que va en la disolución. Si se tiene una disolución genuina, se puede separar el soluto del disolvente por el proceso de evaporación o destilación. Si se hierve una disolución de sal - en agua, el agua se evapora y la sal sólida se cristaliza de la disolución, así es que nuevamente se obtiene en estado sólido. Lo mismo se aplica en disoluciones de azúcar, KNO_3 , -- etc. Como una disolución es algo así como una mezcla mecánica o física, se puede separar de sus dos componentes principales por medios mecánicos o físicos, pero no por los medios ordinarios centrífugos, fuerza de gravedad, o filtración.

Se notará que la palabra "disolver" se emplea en una forma indeterminada. Por ejemplo, se dice que el azúcar se disuelve en agua, lo cual es correcto pero también se dice que el sulfato de cobre se disuelve en HNO_3 caliente, lo cual no es estrictamente correcto, porque por ningún medio físico o mecánico se podría recoger el sulfato de cobre en esta disolución. Se dice que el AgCl se disuelve en $\text{NH}_4 \text{OH}$, que el --

$BaCD_3$ se disuelve en HCl, que el $Al(OH)_3$ se disuelve en HCl ó NaOH, que el CoS se disuelve en "agua regia". Todos estos son ejemplos en los cuales un compuesto insoluble ha sido tratado químicamente, formando productos que son solubles, pero el compuesto insoluble primitivo no puede ser restituído por ningún medio físico. La palabra "disolver" empleada en dichos casos, significa simplemente que la substancia ya no se encuentra en su forma sólida, y que ha desaparecido en un "medio líquido, como resultado de la acción química.

FORMAS DE EXPRESAR LA FUERZA DE LAS DISOLUCIONES.

En forma general, las disoluciones pueden llamarse "fuertes" (concentradas) o "débiles" (diluídas). Muchas personas consideran que una disolución es fuerte cuando contiene una gran cantidad de materia disuelta, mientras que una disolución diluída contiene muy poca cantidad, e.g., una disolución diluída de KI puede contener 2 ó 5 ó aún 10 gm. en 100 ml. mientras que una disolución fuerte puede contener de 80 a 100 gm. en 100 ml.

Otros vocablos empleados para describir disoluciones son "saturado" y "no saturado". Si se tienen 100 gm. de agua a 50° C y se le agrega NaCl sólida, desintegrado finamente, sin resolver o agitar, hasta que haya un exceso de sólido y no pueda disolverse más, se tendrá como resultado una "disolución saturada" de cloruro de sodio. Si parte de esta disolución fue se trasegada y se le añadiera sal sólida, ésta no se disolvería, sino que se iría al fondo del recipiente. Si quisiéramos determinar cuanta NaCl se disolvió en los 100 gm. de agua a 50° C, encontraríamos que fueron 36.7 gm. y que siempre será la misma cantidad. Esto es, la concentración de un soluto en una disolución saturada tiene un valor constante para cada una y todas las substancias. Una disolución saturada de NaCl nunca contiene 34 gm. por 100 gm. de agua, ni 38 gm., siempre son 36.7 gm. Por lo tanto, una disolución saturada es aquella que retiene en la disolución, todo el soluto que puede, pero para estar seguros que está saturada y que permanece en ese estado, debe mantenerse en continuo contacto con algún sólido sin disolver. Vemos así que el vocablo "saturado" al aplicarse a una disolución la define como una disolución en particular que contiene una cantidad definida de soluto, y de allí provienen el vocablo "solubilidad" (solubility).

La cantidad de un soluto contenida en una cantidad determinada de disolución saturada se denomina la solubilidad de un sólido. La solubilidad de NaCl es 36.7 gm. por 100 gm. de

agua a 50° C.

La cantidad de disolvente o disolución debe ser indicada. La temperatura debe también manifestarse debido a que la concentración de una "disolución saturada" varía con la temperatura.

Como regla general puede disolverse más cantidades de un sólido en agua caliente que en fría, y por lo tanto, la solubilidad de un sólido es mayor a temperaturas elevadas. En limitadas ocasiones sucede lo contrario.

Disoluciones no saturadas, son las que no contienen las cantidades máximas de soluto.

Una disolución de 10 gm. NaCl en 100 gm. de agua a 50° C. está no saturada. Así también una conteniendo 5 gm. por 100 o 0.5 gm. por 100.

Al describir una disolución como saturada a determinada temperatura definitivamente se está indicando su concentración. Sin embargo, este método tiene muy poca aplicación ya que prácticamente ninguna de las disoluciones empleadas en trabajo analítico son saturadas. Por lo tanto, se hace necesario una manera más definida para describir las disoluciones y como al hacerlo manifestaríamos lo fuerte o débil de una disolución, discutiremos las diversas formas de expresar la concentración de las disoluciones. Los sistemas más usuales son los siguientes:

- (1) Peso por volumen (gramos/litro de disolución).
- (2) Peso por peso (gramos/1000 gramos de disolución).
- (3) Porcentaje (en peso: g/100%; en volumen: ml/100 ml).
- (4) Molaridad (moles/litro) y Molalidad (Moles/1000 gramos)
- (5) Normalidad (Equivalente gramo/litro)

(1) Peso por volumen:- Puede decirse que una disolución contiene 5 gm. de soluto por 100 ml. de disolución y esto sería exactamente lo mismo que 50 gm. por litro (1000 ml.) Para preparar esta disolución se pesan 5 gm. de substancia sólida y se disuelven en suficiente agua para hacer exactamente 100 ml. de disolución.

(2) Peso por peso:- Puede decirse que una disolución contiene 50 gm. de soluto en 1000 gm. de disolución, y esto sería exactamente que 5 gm. 100 gm. de disolución. Esta solución no sería exactamente la misma que la mencionada en (1) debido a que los 100 ml. del (1) pesarían un poquito más que los 100 gm. Si se deseara preparar esta disolución se pesarían 50 gm. del sólido agregándole 950 gm. de agua. Esto haría un to

tal de 1000 gm. de disolución con un contenido de 50 gm. de soluto.

- (3) PORCIENTO:- Igual que en el (2), si 100 gm. de una disolución contiene 5 gm. de soluto, podríamos decir que 5 por ciento de la disolución es soluto y el 95 por ciento es agua. A esta disolución se le llama disolución al 5 por ciento, quedando así definitivamente catalogada. Suponiendo que se prepara una disolución de esta substancia al 3.5 por ciento; se pesarían 3.5 gm. y se le agregarían 96.5 gm. de agua.
- (4) Molaridad y Molalidad:- No sólo es más conveniente, sino también más lógico, en análisis cualitativos, tratar -- acerca de las disoluciones en términos de molaridad. Una disolución molar es aquella que contiene 1 "gramo-mol" - de peso (1 mole) del soluto en 1 litro de disolución. A su vez, una "disolución molal" es aquella que contiene 1 "gramo-mol" de peso (1 mole) del soluto en 1000 gramos de disolvente. Las molaridades pueden expresarse en distintas formas: disolución 1/5 molar, 0.2 molar ó 0.2M o M/5, teniendo todos el mismo significado. Un mole no es una molécula, sino el peso molecular tomado en gramos, esto es un mole de NaCl son 58.5 gm. de NaCl, un mole de H₂SO₄ son 98 gm. un mole de ion sulfato son 96 gm. etc.
- (5) Normalidad:- Se pueden preparar disoluciones de sales, - ácidos y bases en tal forma que siempre sean iguales entre sí, litro por litro, volumen por volumen, haciéndolas de igual normalidad.
- Una "disolución normal" es la que contiene el peso del - "equivalente gramo" de la substancia en 1 litro de disolución. El peso "equivalente-gramo" de un compuesto es * el peso en gramo que contiene 1.008 gm. de hidrógeno reemplazable, o su equivalente en términos de reacción química. Por ejemplo, se sabe que 36.5 gm. HCl (1 mole) contiene hidrógeno (1.008 gm. del mismo) que se puede reemplazar con metales. Por lo tanto, 36.5 gm. HCl no es solamente su peso molecular, sino también su peso equivalente. Se sabe que 1 mole (40 gm.) de NaOH reaccionará con un peso equivalente a 36.5 gm. de HCl en términos de su reacción química con HCl. Por lo tanto, 40 gm. no es solamente el peso molecular de NaOH, sino también su peso equivalente. El producto de la reacción entre 1 peso equivalente de HCl y un peso equivalente de NaOH es 1 peso molecular de NaCl (58.45 gm.).

Pro en términos de reacción química 58.45 gm. NaCl es equivalente a 36.5 gm. HCl, y a 40 gm. NaOH, y por lo -- tanto 58.45 gm. es el peso equivalente de NaCl.

Un ejemplo:- El peso molecular de $Al_2(SO_4)_3$ es 342; cuál es su peso equivalente? Como es una sal, puede hacerse por la reacción entre el ácido adecuado, y la base correspondiente.



Estudiando esta ecuación se ve que un término de reacción química 1 mole de $Al_2(SO_4)_3$ es equivalente a seis hidrógenos reemplazables, y su peso equivalente es un sexto de su peso molecular.

El número de equivalentes en 1 peso molecular de un ácido es igual a la "valencia" del radical ácido (anión); igualmente, de una base, es igual a la valencia del "ion" metálico (catión). Con respecto a las sales, existen dos posibilidades: Las "valencias" del catión y del anión pueden ser iguales o pueden ser distintas. Si son iguales, el número de equivalentes en 1 peso molecular es igual a la "valencia". Si son distintas entonces es igual al "producto de las valencias". La siguiente tabla es un resumen de lo anteriormente expuesto, - indicando los valores para compuestos específicos:

TABLA No. 1
PESO EQUIVALENTE DE ACIDOS

Acido.	Peso mole cular	No. de hidróge no reem plazable	Valen cia del anión	Equiva lentes en 1 peso molecular	Peso equiv. ----- Peso Molec.	Peso Equiv.
HCl	36.465	1	1	1	1	36.465
HNO ₃	63.016	1	1	1	1	63.016
HC ₂ H ₃ O ₂	60.052	1	1	1	1	60.052
H ₂ SO ₄	98.076	2	2	2	1/2	49.038
H ₃ PO ₄	98.044	3	3	3	1/3	32.681

TABLA No. 2
PESO EQUIVALENTE DE BASES

Base	Peso molecular	Valencia del cation	Equivalentes de 1 peso molecular	Peso equiv. ----- Peso molec.	Peso equivalente
KOH	56.104	1	1	1	56.104
NaOH	40.005	1	1	1	40.005
Ca(OH) ₂	74.096	2	2	1/2	37.048
Ba(OH) ₂	171.376	2	2	1/2	85.688
Al(OH) ₃	77.994	3	3	1/3	25.998

TABLA No. 3
PESO EQUIVALENTE DE SALES

Sales	Peso molecular	Cation	Valencia		Peso equiv. ----- Peso molec.	Peso equiv.
			Anión	Pro Equivalentes to en 1 peso molecular		
NaCl	58.454	1	1	1	1	58.454
KNO ₃	101.104	1	1	1	1	101.104
CaSO ₄	136.140	2	2	2	1/2	68.070
BaCO ₃	197.370	2	2	2	1/2	98.685
MgSO ₄	120.380	2	2	2	1/2	60.190
Na ₂ SO ₄	142.054	1	2	2	1/2	71.027
K ₃ PO ₄	212.308	1	3	3	1/3	70.769
CaCl ₂	110.994	2	1	2	1/2	55.497
Al(NO ₃) ₃	212.994	3	1	3	1/3	70.998
Al ₂ (SO ₄) ₃	342.020	3	2	6	1/6	57.003
Ca ₃ (PO ₄) ₂	310.280	2	3	6	1/6	51.713

C A P I T U L O V I I

PRESERVACION DE MATERIAL HIDROBIOLOGICO

Es común que al efectuar un viaje de prácticas al mar o lechos dulceacuícolas, el alumno de Ciencias Naturales, tenga interés en preservar los ejemplares zoológicos o vegetales colectados, a fin de mantenerlos en condiciones adecuadas para posteriores

observaciones en el laboratorio. Para ello deberá contar con los siguientes materiales básicos:

Formol comercial.
Alcohol etílico.
Estuche de disección.
Manta de cielo.
Etiquetas.
Bolsas de polietileno grandes.
Hilo.
Botes de hojalata.

Formol. - Tanto el formol como el alcohol etílico, actúan como fijadores, sin embargo, el primero es más usado que el segundo debido a su bajo precio. Este fijador se expende en el mercado como formol comercial y se obtiene en laboratorio haciendo burbujear gases de formaldehído ($\text{CH}_4 + \text{H}-\overset{\text{Cu}}{\text{C}}-\text{CHOH}$) en agua, quedando una solución al 40% de formol en agua, la cual es conocida como formalina. De acuerdo con la concentración anterior, ya sea que llegara a usarse tal cual o diluída, la solución actúa como agente coagulante de los tejidos animales o vegetales, pudiendo ser su acción enérgica, benévola o débil. De cualquier modo, deberá usarse siempre con precaución, ya que irrita la piel, las mucosas nasales, ojos y garganta, produciendo molesto ardor en las heridas. La solución fijadora se prepara de acuerdo con los tejidos y organismos a preservar, así si se trata de fijar especímenes planctónicos, se hará una solución al 4% de formalina. Si de algas se tratase, la concentración variará de 4 a 6%, si de organismos grandes, sobre todo de aquellos con tejidos ricos en materiales susceptibles de descomponerse fácilmente, la solución habrá de prepararse al 10%. Una manera sencilla de preparación de dicho agente fijador, es hacer una solución al 10% de formol y tomar alícuotas o diluciones de ésta, dependiendo de las necesidades. La solución tipo, por así decir, se prepara añadiendo a una parte de formol 9 de agua, así si se desea preparar 100 ml de formalina, a 10 ml de formol (al 40%) se añaden 90 ml de agua. Partiendo de ésta, si se desea obtener formol al 5%, se toma la mitad de la misma y se le añaden 50 ml. de agua.

Cuando se trate de animales macroscópicos es conveniente practicarles una incisión ventral a la altura de la región anal, a fin de facilitar la penetración de la solución fijadora.

Alcohol.- Puede usarse como fijador. La concentración más comúnmente usada es al 70%, recomendándose partir de alcohol (C_2H_5OH) de 96° GL.

Para saber la cantidad de alcohol a emplear para su posterior aforo con agua, se acostumbra hacer -- una regla de tres simple. Por ejemplo:

$$\begin{array}{r} 100 \text{ -----} 96 \\ x \text{ -----} 70 \end{array}$$

de donde:

$$\frac{70 \times 100}{96} = 72.9$$

$$x = 96$$

$$x = 73.$$

Así que, para preparar una solución al 70%, a 73 ml de alcohol se añaden 27 ml de agua.

Estuche de disección.- Un estuche de disección siempre será útil en el campo. Entre las piezas más comúnmente usadas, se tienen: bisturí, tijeras largas y cortas de punta aguda, pinzas de diverso tipo de punta, aguja de disección, etc.

Manta de cielo.- Es una tela que recibe también los nombres comunes de "tela de mosquitero", "clán", "gasa", etc., muy útil para hacer envoltorios de aquellos organismos que se desea proteger o separar entre sí al provenir de diversos sitios de captura.

Etiquetas.- Al separar las muestras es recomendable adjuntar una etiqueta provisional a cada una, escrita con lápiz plomo o tinta indeleble, con anotaciones breves o un número clave, el cual debe asentarse en la libreta de campo con las observaciones siguientes: lo calidad, fecha, condiciones ecológicas, nombre del colector, etc. Este procedimiento evita pérdidas de tiempo y permite catalogar fácilmente cada muestra en el laboratorio.

Los datos asentados en la libreta, deberán ser asentados en las etiquetas definitivas y en los libros de registro.

Bolsas de polietileno.- Después de hacer los envoltorios, se introducen éstos en bolsas de polietileno grandes, que en el mercado se venden con las siguientes dimensiones: 72 x 41 cm. las cuales serán dobles, a fin de evitar la salida del líquido fijador, colocando en su seno la solución de formol.

H i l o. - Al concluir lo anterior, se atan las bolsas convenientemente con hilo.

También puede hacerse mediante un nudo a las mismas bolsas, o con bandas de hule delgadas.

Botes de hojalata. - Las bolsas con organismos deberán ser colocadas previamente en botes de hojalata, tales como envases de galletas, de dulces y preferentemente aquellos que contienen grasas vegetales o animales. Los botes deberán ser siempre de boca ancha.

Para concluir se tapan los botes y se sellan con soldadura de estaño, en caso de ser remitidas por los medios públicos comunes.

B I B L I O G R A F I A

Baker, John R.

- 1958.- Principles of Biological Microtechnique.
A Study of Fixation and Dyeing. 1-330.
Ed. John Willy and Sons. U.S.A.

Deleón, R. I.

- 1963.- Manual de Laboratorio de Histología. México.

Huerta, M. Laura.

- 1959.- Notas Tomadas del Curso de Botánica. I.)Citolología y Organografía). Esc. Nal. de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.

Kudo, Richard.

- 1954.- Protozoology. 4a. Ed. Charles C. Thomas, Publ.
894-900. U.S.A.

Langeron, M.

- 1934.- Précis de Microscopie. Ed. Masson et Cia.
Francia.

Pedroza, J.-

- 1959.- "Disoluciones". Curso de Fisico-Química. Esc.
Nal. de Ciencias Biológicas. I.P.N. (en mimeó-
grafo). México.

Peláez, D.

- 1957.- "Métodos de coloración de Protozoarios Parásitos". Curso de Parasitología. Esc. Nal. de Ciencias Biológicas. I. P. N. México. (En mimeógrafo).

Sánchez R., Ma. Elena.

- 1959.- "Revisión de Técnicas Histológicas para el Estudio de las Algas Macroscópicas". Tesis Profesional Esc. Nal. de Ciencias Biológicas. I. P. N. México.