



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MOFOLÓGICAS Y FORENSES
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



**USO DE COLORANTES NATURALES PARA EL ESTUDIO DE
ESTRUCTURAS TISULARES**

AUTORES:

JESÚS AVENDAÑO
YAMALI GUEVARA
MARÍA HERRERA
MARIANGELA RAMOS

TUTOR METODOLÓGICO:

ZORAIDA CASTILLO

TUTOR ESPECIALISTA:

PROF. RUBÉN TORO

BÁRBULA, JULIO 2016



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y FORENSES
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Informe Monográfico titulado:

USO DE COLORANTES NATURALES PARA EL ESTUDIO DE ESTRUCTURAS TISULARES.

Presentado por los bachilleres:

**JESÚS AVENDAÑO.C.I. 22.411.153
YAMALI GUEVARA.C.I. 20.445.024
MARÍA HERRERA.C.I. 25.591.212
MARIANGELA RAMOS.C.I. 24.293.056**

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado el mismo, y que aunque no nos hacemos responsables de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha: _____

Profesor

Profesor

Profesor

INDICE GENERAL

	p.
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCION.....	1
CONTEXTUALIZACIÓN DEL TEMA	
Planteamiento del problema.....	1
Justificación.....	2
Objetivo general y específicos.....	2
CUERPO DEL TRABAJO	
Antecedentes e importancia de los colorantes naturales.....	3
Tipos de colorantes, fundamento y mecanismo de extracción.....	5
Colorantes de mayor uso en los Laboratorios de Anatomía Patológica en Venezuela.....	7
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	8
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	9



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y FORENSES
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO



**USO DE COLORANTES NATURALES PARA EL ESTUDIO DE
ESTRUCTURAS TISULARES**

AUTORES:
JESÚS AVENDAÑO
YAMALI GUEVARA
MARÍA HERRERA
MARIANGELA RAMOS

TUTOR:
TORO RUBEN
AÑO: 2016

RESUMEN

Los colorantes son sustancias capaces de teñir muestras tisulares y otros materiales. Forman mezclas o reaccionan químicamente con las sustancias a teñir y les proporcionan un grado determinado de coloración. Desde la antigüedad se han utilizado con este fin diversas materias procedentes de vegetales, como el índigo natural, de color azul; y otras de origen animal, como la que se extrae de la cochinilla, de color rojo. Los colorantes naturales se remontan en la época de los 80, pero es Van Leeuwenhoek en 1714, el primero en realizar una coloración, en donde pretendía observar fibras musculares estriadas, empleando una solución de azafrán en vino dando paso a la introducción del carmín y la hematoxilina. Ensayos que produjeron un gran desarrollo en la historia de la histología. La muestra coloreada debe su color a la capacidad de absorber parcial o totalmente la luz visible. Al incidir sobre una sustancia la luz blanca, formada por un conjunto o espectro de radiación, tiene lugar la absorción de cierta radiación.

Palabras clave: Colorantes naturales, muestras tisulares, vegetales, animal, histología.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS Y FORENSES
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**USO DE COLORANTES NATURALES PARA EL ESTUDIO DE
ESTRUCTURAS TISULARES**

**AUTORES:
JESÚS AVENDAÑO
YAMALI GUEVARA
MARÍA HERRERA
MARIANGELA RAMOS**

**TUTOR:
TORO RUBEN
YEAR: 2016**

ABSTRACT

Colorants are substances capable of dyeing tissue samples and other materials. Forming mixtures and chemically reacting to substances that will be dyed, giving them a certain degree of coloration. Since ancient times different plant materials have been used with this purpose, like natural indigo, of blue color; and some of animal origins, like the one that is obtained from cochineals that has a red color. Natural colorants can be traced back to the 80's, but is Van Leeuwenhoek in 1714, the first to do a coloration, in which he wanted to observe striated muscle fibers, using a saffron solution in wine, making the first step into the use of carmine and hematoxylin. Trials that produced a great development in the history of histology. The colored sample owes color to the ability to absorb visible light, partially or completely. When affecting a substance the white light, formed by a electromagnetic spectrum, the absorption of certain amount of radiation takes place.

keywords: Natural colorants, tissue samples, plant materials, animal, histology

INTRODUCCIÓN

El estudio microscópico de las características morfológicas de los tejidos, rutinariamente se circunscribe en el área de la histotecnología, la cual es definida por Mejías y Colsen 2011, como aquella en la cual se emplea una serie de métodos y/o técnicas para que en función a lo que se desee observar, se opte por aquella técnica específica que destaque dicha estructura mediante el uso de uno o más colorantes. (1)

Es decir, “se hace necesario la interacción entre la célula y el cromóforo presente en el colorante, lo cual le da la potencialidad a este último, para ser categorizado como una sustancia de origen químico o biológico, pigmento o reactivo, empleado en la coloración de tejidos o microorganismos en exámenes microscópicos”. (2)

En virtud a las citadas características y de acuerdo con su origen, “los colorantes se clasifican en naturales y en sintéticos; siendo los naturales aquellos que proceden de tejidos animales o vegetales”, por ejemplo, el obtenido cuando las plantas verdes y algunos microorganismos que abundan en la superficie terrestre llevan a cabo un proceso llamado fotosíntesis; mientras que los sintéticos se obtienen por síntesis química de minerales procesados y manipulados en el laboratorio, por lo cual son de naturaleza orgánica, tienen una pureza superior que el de los naturales y comprenden una gran variedad de moléculas que se agrupan en porfirinas, flavonoides, antocianinas, quinonas, xantonas y carotenoides. (3-5)

Ahora bien, considerando que la finalidad de la tinción tisular es aumentar el contraste de las estructuras celulares mediante la adición de compuestos coloreados que tienen propiedades selectivas por determinadas zonas del tejido, es apreciable resaltar que no todos los colorantes de origen natural poseen las características deseadas en cuanto a factores como estabilidad a la luz y a la temperatura, pero destacan y se diferencian de muchos colorantes sintéticos por no ser tóxicos ni actuar como agentes carcinogénicos sobre el ser humano. (5)

Este efecto pudiera relacionarse en que los colorantes de origen natural poseen dos tipos primarios de pigmentos utilizados para teñir: pigmentos solubles en aceite y pigmentos

solubles en agua. Los solubles en aceite tal como la clorofila o los carotenoides se dan en todas las plantas en varias cantidades. En cambio las antocianinas que se clasifican dentro de las flavonoides son pigmentos que se encuentran en algunas frutas que van del color rojo al azul o morado y son solubles en agua. (6)

En consecuencia, en este trabajo, podemos encontrar información destacada de los tipos de colorantes, su mecanismo de extracción y la importancia de los colorantes naturales. Teniendo como objetivo primordial; describir el uso de colorantes naturales para el estudio de estructuras tisulares. Se hace énfasis en el valor que se le debe dar a los colorantes naturales, logrando más adelante, de ser posible la sustitución de los colorantes sintéticos, contando con estudios pertinentes para verificar si cuentan con las propiedades adherentes que se necesitan, el cual siendo un aporte convencional, ayude a los histotecnólogos a resolver la problemática de recursos escasos, porque el principal interés, es la investigación de los problemas que dificulten la fluidez u organización del trabajo.

De esta manera, tomando en cuenta la problemática que se presenta en muchos de los laboratorios del país, en los cuales se hacen estudios de biopsias y no cuentan con los reactivos necesarios para procesar las muestras, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Describir el uso de colorantes naturales para el estudio de estructuras tisulares

Objetivos Específicos

- Resaltar el mecanismo de extracción de cada uno de los colorantes
- Destacar, en orden de prioridades, aquellos colorantes más accesibles en Venezuela

CUERPO DEL TRABAJO

Antecedentes e importancia de los colorantes naturales

La mayoría de los tejidos, sobre todo los de los animales, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas. Las tinciones generales están basadas en el uso de colorantes, sustancias mediante las cuales se consigue colorear a los tejidos. Los colorantes son normalmente hidrosolubles y se caracterizan por unirse a ciertas moléculas presentes en los tejidos gracias a afinidades electro-químicas. Se utiliza normalmente para teñir a las células y componentes tisulares que van a ser observados con el microscopio óptico y por ello se realizan habitualmente sobre secciones de tejido, siendo las más utilizadas las secciones obtenidas a partir de inclusiones en parafina u obtenidas en criostato. Los colorantes son los elementos principales de las tinciones en general son moléculas que poseen tres componentes importantes: un esqueleto incoloro, que normalmente es un anillo aromático de benceno, al cual se le unen dos tipos de radicales: uno que aporta el color, denominado cromóforo, y otro que posibilita la unión a elementos del tejido denominado auxocromo. Al conjunto de estos tres elementos unidos en una molécula se denomina cromógeno. (11)

El fundamento de la coloración radica en la propiedad que poseen todos los tejidos en incorporar y fijar sustancias coloreadas. La coloración se basa en la afinidad particular de ciertos tejidos o formaciones celulares por una sustancia colorante determinada. (1)

Tomasi V. 2008 publica en su blog "Coloración de Muestras Biológicas"; En 1665, Robert Hooke informó sobre sus hallazgos referentes a la composición del tejido, en su texto titulado *Micrographia* (Royal Society, London), tras observar muestras vegetales diafanizadas con suero glicerinado y donde acuñó el concepto de célula, debido a que la unidad estructural observada era similar a las "cell" de un panal de abejas. (7)

Más tarde, Leeuwenhoek (1714) aplicó por primera vez un agente colorante natural para mejorar la observación microscópica de fibras musculares de mamífero, al emplear una solución alcohólica de azafrán (Saffron). (7)

A partir de estas experiencias, otros autores utilizaron diferentes tintes de origen natural a fin de colorear distintos componentes tisulares. Así por ejemplo, Hill el año 1770 aplicó carmín para la demostración del sistema vascular en plantas, Link (1807) utilizó sales férricas para visualizar el tanino celular en tejido vegetal, Raspail (1825) empleó yoduro para colorear los gránulos de almidón presentes en semillas germinadas, Hartig (1854) coloreó núcleos con phytolacca y Böhmer hizo lo mismo pero con hematoxilina en 1865 (7), dando paso a la investigación e innovación de nuevos colorantes vegetales.

Más tarde el año 2006, Rohde C y cols, explican que los colorantes histológicos, mayoritariamente sintéticos, son productos importados, con altos costos y que encarecen el proceso de coloración; el empleo de una nueva asociación de colorantes naturales entre los que la principal innovación fue la "bixina", un pigmento encontrado en la planta *Bixa orellana* (Onoto), como colorante histológico, demostró una óptima fijación en los tejidos, permitiendo la visualización de las estructuras celulares (8). El empleo del Onoto como colorante en la técnica de coloración histológica es mencionado por sus autores en un trabajo científico en el que refieren que la sustitución de colorantes importados por nacionales, constituye una alternativa para este proceso en laboratorio. (8)

En el mismo contexto, Guarnizo y cols publican información de sustento adicional, hablando de que entre los colorantes naturales más empleados se encuentra la hematoxilina, la cual es extraída del tallo del palo de *Campeche Haematoxylon campechianum*, original de esa provincia de México y ahora también cultivado en América Central y del Sur. En cuanto al carmín, se obtiene del cuerpo seco de la hembra de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), también originario de México y las regiones andinas. Tornasol, extraída de una planta llamada *euphorbiacea* mediterránea (*Chrozophora tinctoria*); el azafrán, obtenido de los estambres de *Crocus sativus* y la extraída tras la hidrólisis alcalina de ciertos líquenes (4).

Por otro lado, Uriol (2004) expresa que se ha observado que el maíz morado posee propiedades tintóreas básicas semejantes a la hematoxilina, y que este último es usado en la tinción de núcleos celulares, para luego contrastar el citoplasma con la eosina; motivo por el cual el maíz morado puede ser utilizado en la tinción nuclear de células en un corte histológico (9).

Tipos de colorantes, fundamento y mecanismo de extracción

Los colorantes de extracción natural son básicamente histológicos, encontrándose entre los empleados con mayor frecuencia, los siguientes:

Índigo

Se obtiene de diversas especie de plantas del genero indigófera que contiene indicano, el cual se fermenta para producir el colorante.

Hematoxilina

La hematoxilina es una sustancia cristalina incolora obtenida de una planta llamada *Haematoxylum Campechianum* (palo de campeche) de la familia de las cesalpiniáceas, del grupo de las leguminosas indígenas de la América Central y México. Esta sustancia por sí misma no es un colorante, fue introducida en la técnica histológica por un investigador llamado Waldeyer en 1863, quien la uso en la tinción de fibras nerviosas. Hasta entonces se habían utilizado otros colorantes como la rubia, el azafrán, el carmín, la mauveina y otros derivados de la anilina. (4)La hematoxilina se convierte en colorante mediante su oxidación, proceso llamado maduración. La oxidación se obtiene con la permanencia prolongada al aireo, más rápidamente, por medio de sustancias químicas oxidantes. El producto resultante de la oxidación de la hematoxilina se denomina *hemateina*. Esta última es la verdadera sustancia colorante, sin embargo, tampoco la hemateina colorea por si misma a los tejidos, es un colorante indirecto, de allí el uso de mordientes. Desde el punto de vista histológico, la hematoxilina es un colorante básico o nuclear. Tiñe de morado, negro, azul oscuro la sustancia nuclear. Desde el punto de vista químico se compone de un grupo llamado pyrocatecol, el cual es un núcleo de benceno con dos hidroxilos y otro grupo llamado pyrogalol el cual es también un benceno, pero con tres grupos hidroxilos. La hematoxilina es sin duda el mejor colorante nuclear. (11)

Carmín

El carmín es un colorante natural obtenido de un insecto hemíptero llamado *Coccus cacti*, el cual vive en un tipo de planta mexicana denominada *Opuntia Coccinellifera*. La sustancia colorante se obtiene de los cuerpos disecados de quermes hembras y de sus

huevos, del cual se saca bajo la forma de carminato alcalino. En el comercio se presenta en forma de granos aplanados de color negro, rojo y gris. (11)

Se extrae de las cochinillas hembras secadas al calor. La sustancia colorante no posee carga eléctrica definida: si el pH es alcalino adquiere carga negativa, y positiva si el pH es inferior a 4, por lo tanto para coloraciones de los núcleos se utilizan soluciones acidas, con lo cual se obtiene un color particularmente nítido y duradero. Este colorante fue utilizado por primera vez en 1849 por Goeppert y Cohn para colorear vegetales. En 1851, el zoólogo Corti lo uso para el teñido de tejidos animales. Es el mejor colorante para fragmentos grandes y tiñe muy bien los núcleos, pero no es muy bueno en cortes de parafina. Se usa en estudio de embriones, en general es bueno en anatomía microscópica. (11)

Brasilina

La brasilina es un colorante nuclear natural muy parecido a la hematoxilina. Se obtiene de unas plantas del Brasil, de allí su nombre. Las plantas de donde se extrae este colorante, se denominan brasilina (madera roja), solamente se encuentran en países tropicales es una leguminosa arborescente. La brasilina, toma un color rojo en solución cuando se expone al aire del cual toma oxígeno transformándose en brasileína. La brasileína es el verdadero colorante. Es un colorante indirecto y es necesario un mordiente. Ha reemplazado al carmín en el estudio de material fresco o fijado. (11)

Orceina

Barcat J. señala en su publicación “Orceina y Fibras Elásticas” 2003: La orceina es extraída de dos especies de líquenes, *Rocella tinctoria* y *Lecanora parella*. También está disponible en una forma sintética, pero la forma natural es preferida para el análisis de cromosoma, porque esto da un mejor contraste. También indica que la orceina tiñe cilindros, ejes, neuronas y neuroglia. (11)

Amarillo de Azafrán

Desecación o tostado: esta operación se efectúa para secar los estigmas rápidamente a fin de que se conserven inalterables las sustancias colorantes y sápidas. Se extienden los estigmas sobre zarandas con fondos de hilo de seda y se colocan en hornos a una temperatura de 70 a 80 grados aproximadamente. Cuando los estigmas se encuentran en condiciones de ser transportados sin que sufran alteraciones, se quiebran fácilmente con los dedos y presentan un color rojo dorado característico. (11)

Colorantes de mayor uso en los Laboratorios de Anatomía Patológica en Venezuela

Entre los colorantes más usados en los laboratorios del país, encontramos como coloración general la Hematoxilina & Eosina, la mayoría de las muestras que se procesan se tiñen con esta coloración la cual destaca el núcleo y el citoplasma de la célula.

Hematoxilina; colorea el núcleo de la célula de color azul-violeta o marrón.

Eosina; tiñe las células rojas de la sangre, el material citoplasmático, la membranas celulares y las estructuras fuera de la célula en un color rosa o rojo. Se utiliza para observar la forma y estructura de la célula. (12)

Safranina; se utiliza como una de las manchas en la técnica de tinción de Gram, y tiñe los núcleos de las células de un color rojo, también se usa para la coloración de cartílagos en donde adopta un color amarillento. (12)

Cristal Violeta; se utiliza en la clasificación de las bacterias y es el tinte de elección para la técnica de tinción de Gram. Mancha de purpura las paredes celulares cuando se combina con un mordiente. (12)

Verde Luz; es un colorante muy soluble en agua que se utiliza en tinciones de tejidos conectivos. (1)

Azul de Toluidina; colorante que tiñe estructuras basófilas, tales como la cromatina, se puede comportar como colorante ortocromático tiñendo de color azul el tejido nervioso, o metacromático tiñendo de color violeta-rojo estructuras como el cartílago joven.

CONCLUSIONES

Los colorantes naturales son fundamentales para el estudio de muestras en los laboratorios, hoy día, es más factible trabajar con estos colorantes porque los sintéticos son difícil de conseguir ya que tienden a ser productos importados y de alto costo, además los de origen natural brindan la posibilidad de innovar e investigar nuevas técnicas de coloración, usando otro tipo de fuente que no haya sido probada, también teniendo la posibilidad de hacer la extracción de manera artesanal, evitando así costos adicionales por la maquinaria.

Además fomentar el uso de los colorantes naturales, disminuye el aceleramiento de daño que se le está causando al planeta con la elaboración de los colorantes sintéticos, así como muestran algunos investigadores que han realizado tinciones con maíz morado y onoto, que aun siendo sustitutos de otros colorantes naturales motivan al estudio e investigación de otros métodos convencionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Mejias M; Molist P; Pombal M. Atlas de Histología Vegetal y Animal, 2011. Disponible en:
<http://www.mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf> (Consulta 08 de enero de 2016)
- 2- Gonzalez J; Gonzalez B; Barrial R. Laboratorio de Microbiología. Instrumentación y principios básicos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana 2004, p. 102
- 3- Neira C, Sedano E, Vilcarromero M. (1996) Guía de Práctica de Histotecnología. Lima, Perú.
- 4-Guarnizo F. A, Martínez P. N. Colorantes de origen vegetal. Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Editorial Ediciones Elizcom. Colombia 2009, p. 65
5. López J L, Hernández D M, Colín C C, Ortega P S, Cerón G, Cendejas F. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología 2013. Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b>. (Consulta 20 de marzo de 2016)
- 6- Montuenga L; Jiménez F; Ruiz E; Calvo A. Técnicas en Histología y Biología Celular. Edit. Elsevier Masson. España 2009, p. 74
- 7- Tomasi V. Coloración de Muestras Histológicas, 2008. Disponible en:
<http://www.educacionhistotecnologiacoloracio.blogspot.com/> (Consulta 05 de febrero de 2016)
- 8- Rohde D; Oliveira S; Barros Cristina; Andrades R. El uso de colorante de achiote (Bixa orellana L.), en técnica de tinción histológica, Revista Brasileira de Análisis Clínico. Brasil 2006, p.19

9- Uriol P. Aplicación del colorante del maíz morado en la tinción nuclear de células presentes en un corte histológico, 2004. Disponible en:

[http://www.cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/825/1/Uriol_bp\(1\).pdf](http://www.cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/825/1/Uriol_bp(1).pdf)

(consulta 13 de diciembre de 2015)

10- Barcat J. A. Orceina y Fibras Elásticas, 2003. Disponible en:

<http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol63-03/5/editorial-orceina.PDF>

(Consulta 18 de octubre de 2016)

11- Garcia del Moral R. Manual de Laboratorio de Anatomía Patológica. Edit. Mc Graw-Hill. Mexico 1993, p. 126

12- Rivera E. Los colorantes usados en la preparación de diapositivas para los microscopios, 2013. Disponible en:

http://www.ehowenespanol.com/colorantes-usados-preparacion-diapositivas-microscopios-lista_175597/ (Consulta 20 de octubre de 2016)