

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Uso del Colorante Natural Carmin – Ácido Carmínico,
Obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en la
Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina en Tejidos
de Hígado de Ovino - Cajamarca**

T E S I S

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

Presentada por el Bachiller

CARLOS EMILIO VELÁSQUEZ DOMÍNGUEZ

Asesor

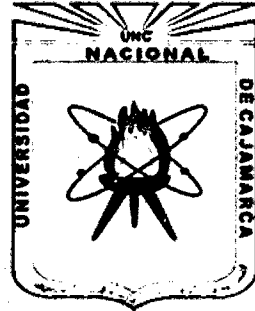
M.V. M.Cs. Eduard Egberto Guevara Lara

CAJAMARCA – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Uso del Colorante Natural Carmín – Ácido Carmínico,
Obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en la
Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina en Tejidos de
Hígado de Ovino - Cajamarca**

TESIS

Para Optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentada por el Bachiller
CARLOS EMILIO VELÁSQUEZ DOMÍNGUEZ

Asesor
M.V. M.Cs. Eduard Egberto Guevara Lara

CAJAMARCA- PERÚ
2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DECANATO

Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205 Fono 076 365852



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

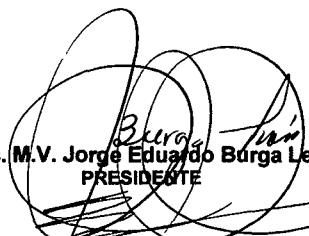
En Cajamarca, siendo las doce y quince minutos la tarde del día ocho de abril del dos mil quince, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “**César Bazán Vásquez**” de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada “**USO DEL COLORANTE NATURAL CARMÍN-ÁCIDO CARMÍNICO OBTENIDO DE LA COCHINILLA (*Dactylopius coccus*) EN LA TÉCNICA DE COLORACIÓN HEMATOXILINA EOSINA, EN TEJIDOS DE HÍGADO DE OVINO-CAJAMARCA**”, presentada por el Bachiller en Medicina Veterinaria: **Carlos Emilio Velásquez Domínguez**.

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


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

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

Siendo las una y treinta minutos de la tarde del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


M.Cs. M.V. Jorge Eduardo Búrga León
PRESIDENTE


M.Cs. M.V. Jorge Bernardo Gamarra Ortiz
SECRETARIO


M.Cs. M.V. Jorge Luis Portal Torres
VOCAL

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres **EMILIO** y **JUANA**, por haberme conducido por un camino de rectitud. Por haberme inculcado responsabilidad y respeto conmigo mismo y hacia los demás. Por su apoyo económico y espiritual, ya que sin ellos, no hubiese culminado mis estudios universitarios.

A **PILAR**, mi esposa y compañera ejemplar. Por su paciencia y su cariño desinteresado, fuente de estimación y confianza.

A mis hijos **GIANFRANCO EMILIO**, **NICOLAS** y **KARLA MARÍA**, por su amor y paciencia durante mis estudios universitarios, a ellos dedico mi superación como profesional Médico Veterinario.

CARLOS EMILIO

AGRADECIMIENTO

Al M.V. M.Cs. Eduard Egberto Guevara Lara, mi mayor agradecimiento y reconocimiento, por su asesoramiento en la conducción del presente trabajo de tesis, gracias por su colaboración desinteresada.

A los **docentes y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, por sus enseñanzas y consejos, durante mis estudios universitarios; para todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

A mis **compañeros de promoción**, por compartir momentos agradables, mi más sincero reconocimiento y agradecimiento, ya que sin ellos, no hubiese podido alcanzar el sitio que ahora ostento. Compañeros, de nosotros es la Universidad de Cajamarca, para siempre la tendremos en nuestros corazones.

CARLOS EMILIO

RESUMEN

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de: Embriología e Histología Veterinaria, Química y Biología de la Universidad Nacional de Cajamarca, en el distrito y provincia de Cajamarca- Perú, para determinar la afinidad, de los tejidos del hígado de ovino, al colorante natural "Carmín - Ácido Carmínico", obtenido de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), en reemplazo de la Hematoxilina, en la Técnica de Coloración "Hematoxilina Eosina". Los resultados obtenidos, muestran que los núcleos de las células del hígado, como los núcleos de las células endoteliales, de los vasos sanguíneos del hígado, tienen afinidad por el colorante. El tejido conectivo de la cápsula de Glisson, y de las trabéculas del parénquima hepático; no tiene afinidad al colorante.

Palabras claves: Coloración, Eosina-Carmín Ácido Carmínico, hígado, ovino.

ABSTRACT

This research was conducted in the Laboratory: Veterinary Embryology and Histology, Chemistry and Biology at the National University of Cajamarca, in the district and province of Cajamarca, Peru, to determine the affinity of the liver tissue of sheep, the dye natural "Carmine -Hydrocyanic Carminic", obtained from the cochineal (*Dactylopius coccus*), replacing hematoxylin in coloring technique "hematoxylin eosin". The results obtained show that the cores of liver cells, like the nuclei of endothelial cells of blood vessels of the liver, have affinity for the dye. The connective tissue of Glisson's capsule, and liver parenchymal trabeculae; has no affinity to the dye.

Keywords: Color, eosin-Carmine Acid Carminic, liver, sheep.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

Página

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO 3

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS 17

CAPÍTULO IV

RESULTADOS 34

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN 40

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES 43

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES 44

CAPÍTULO VII

LISTA DE REFERENCIAS..... 45

ANEXO 47

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Selección de los parásitos <i>Dactilopius cocus</i> (cochinilla), para obtener Carmín y Ácido Carmínico.....	24
Fotografía 2. Cosecha del parásito <i>Dactilopius cocus</i> (cochinilla)	25
Fotografía 3. Secado del parásito <i>Dactilopius cocus</i> (cochinilla)	26
Fotografía 4. Homogenización tres veces por día para el secado uniforme del parásito <i>Dactilopius cocus</i> (cochinilla).....	27
Fotografía 5. Verificación del trabajo de investigación por el Presidente del Jurado de Tesis.....	28
Fotografía 6. Pesado de colorante Carmín y Ácido Carmínico	29
Fotografía 7. Proceso de trituración del parásito <i>Dactilopius cocus</i>	30
Fotografía 8. Proceso de filtrado del material triturado del parásito <i>Dactilopius cocus</i> (cochinilla)	31
Fotografía 9. Estudio microscópico para elaborar el diagnóstico histológico.....	32
Fotografía 10. Toma de microfotografías.....	33

ÍNDICE DE MICROFOTOGRAFÍAS

Microfotografía 1.	Lobulillo hepático.....	35
Microfotografía 2.	Lobulillo hepático. Cordones hepáticos	36
Microfotografía 3.	Lobulillo hepático. Vena centrolobulillar	37
Microfotografía 4.	Lobulillos hepáticos. Vasos sanguíneos.....	38
Microfotografía 5.	Lobulillos hepáticos. Espacio portal	39

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La investigación de los constitutivos orgánicos que conforman la arquitectura de las células, de elementos fibrilares y constitución del intersticio de los órganos de animales y plantas, a través del estudio microscópico, siempre se ha tenido resultados satisfactorios con el empleo de técnicas especiales de coloración, sean estos colorantes vitales o supravitales, detallando componentes celulares que han tenido afinidad por sustancias químicas básicas o como aquellas que han tenido afinidad por colorantes ácidos.

Casi en todas las técnicas de coloración, el empleo de colorantes para visualizar constitutivos de la arquitectura celular y elementos que conforman un tejido especial, es gracias a la utilización de la combinación de dos colorantes: un colorante básico, que permite apreciar los elementos estructurales del tejido de un color azul o púrpura (basofilia) constituidos por ácidos nucleicos; y otro que permite apreciar los elementos estructurales de color rosa (acidofilia) constituidos por sustancias proteicas, glucógeno, carbohidratos, etc. En el presente trabajo de investigación, la utilización del colorante natural carmín y ácido carmínico como colorante acidófilo y la hematoxilina como colorante básico, nos permitirá determinar el grado de afinidad que tienen los elementos estructurales del hígado de ovinos a través del uso de estos colorantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la afinidad de los tejidos del hígado de ovino al colorante natural carmín – ácido carmínico, obtenido de la cochinilla (*Dactilopius coccus*) en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración de Hematoxilina Eosina.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Anatomía y fisiología del hígado

El hígado es la más voluminosa de las vísceras y desempeña la doble función de secretar bilis y de elaborar glucógeno. Está situado en la parte superior del abdomen, debajo del diafragma, encima del estómago y de la masa intestinal. Su coloración es rojoparda, su consistencia es bastante dura; sin embargo se amolda a los órganos vecinos y presenta una friabilidad muy notable. Determina 2 a 5 % del peso corporal. El hígado es un tejido parenquimatoso, rodeado de una cápsula conectiva o peritoneal visceral, compuesta por tejido fibroso blanco denso, lo cubre la membrana serosa o capsula de Glisson, el tejido capsular es rico en fibras elásticas. Es una glándula tubular compuesta con diversas funciones metabólicas. Es un órgano complejo, estructural y funcionalmente, estas funciones lo realiza a través de dos células, el hepatocito y las células de Kupffer, el hepatocito retiene un alto potencial mitótico. Sintetizar (azúcares, proteínas plasmáticas, factores de coagulación, lípidos, urea, cuerpos cetónicos); secreción (sales biliares); excreción (pigmentos biliares); almacenamiento (lípidos, vitaminas, glucógeno); biotransformación (tóxicos, fármacos, drogas hormonas) y metabolismo (lípidos, proteínas, carbohidratos). Las células de Kupffer, elemento del sistema de macrófagos, revisten los sinusoides hepáticos y está íntimamente relacionado con el hepatocito, auxilian la actividad fagocitaria del hígado. El potencial mitótico del hígado por los hepatocitos se retiene toda la vida. La actividad mitótica y la hipertrofia

celular determinan el potencial de restauración de la masa hepática (Banks, 1987).

Histología del hígado

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

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

Unidad Funcional del Hígado

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

Técnicas de coloración

Con el microscopio de luz puede verse pocos detalles de la célula en: 1) una rebanada de tejidos sin teñir, 2) acúmulos de células no coloreadas, o 3) células vivas sumergidas en líquidos nutritivos. Los componentes celulares tienen una densidad óptica muy similar. Es la densidad óptica de cada estructura atravesada por la luz que disminuye la amplitud de luz que le atraviesa. Las densidades ópticas de diversas estructuras situadas dentro de una célula son muy similares, de manera que todos se afectan por igual por la amplitud de la luz que las atraviesa. Por lo tanto, estas estructuras no se observan más claras o más oscuras que otras, y no pueden distinguirse. La

forma más frecuente de resolver este problema es tratar con colorantes los cortes de tejidos fijados previamente en una solución bufferada. Estos colorantes se combinan en forma desigual con diversos componentes de células de tejidos, por lo tanto, crean cambios relativos de densidad óptica y de color, de manera que pueden distinguirse unos de otros, existe afinidad distinta entre los componentes estructurales de los tejidos, por ejemplo, los colorantes ácidos tiñen de rosa al citoplasma de las células, pero los colorantes básicos como la hematoxilina en un corte se distinguen a los núcleos de color azul brillante. Pero en estudios de investigación muchas veces resulta importante poder estudiar células vivas frescas situadas en soluciones nutritivas, incluso registrar sus movimientos y su conducta mediante cinematografía. Esto puede lograrse mediante la observación de microscopio de fase. Artefactos: Para comprender los artefactos hay que tener presente que en la preparación de un corte cada una de las etapas, brinda oportunidad para que ocurra algo que haga menos perfecto el producto final. Los artefactos no son el resultado de algo que ha ocurrido en el tejido durante la vida, sino de alteraciones posteriores, por manipulación humana al preparar los cortes (Ham, 1998).

Afinidad de los colorantes

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

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

Coloraciones especiales

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

fibras elásticas y límites de los vasos sanguíneos y del espacio portal de un color azul claro. El colorante Impregnación Argéntica de Golgi, colorea al estroma (fibras reticulares del conectivo) y límites celulares de los cordones hepáticos de un color marrón oscuro (Prieto Motta, 1998).

Colorantes especiales. Tricrómicos

En los trabajos de histología de exploración microscópica empleando diferentes colorantes básicos y ácidos, ciertas estructuras microscópicas de las células o de los tejidos, apetecen por ciertos colorantes especiales, a esta afinidad exclusiva los colorantes se denominan colorantes selectivos para determinados componentes celulares, por ejemplo, las fibras del tejido conectivo específicamente las reticulares se las observa utilizando nitrato de plata, las fibras elásticas se las observa utilizando la coloración hematoxilina-orceína. Existen colorantes tricrómicos, no porque se emplean tres colorantes, sino que, el detalle histológico se observa de tres colorantes diferentes. Los principales productos químicos que intervienen en la estructura y metabolismo de las células son proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. El citoplasma de las células, está conformado principalmente por proteínas. Las proteínas actúan como ácidos o bases, porque son anfóteras (amfo, ambos). Si los líquidos corporales tienden a volverse ácidos, las proteínas actúan como bases. Las proteínas pueden actuar en uno u otro sentido, porque los aminoácidos de los cuales están formadas tienen cadenas naturales, algunas de las cuales son donadoras de H^+ cuando el pH sube, y otras que pueden combinarse con H^+ cuando el pH disminuye. Muchas proteínas del cuerpo, incluyendo las del citoplasma de las células (hepáticas), en el pH usual en el cual se efectúa la tinción tienen suficientes grupos básicos (cargados positivamente) en sus cadenas laterales para combinarse con colorantes ácidos, como la eosina que, claro está tienen su color en sus aniones (partes cargadas relativamente); por lo tanto, la proteína del citoplasma se colorea de rosa o rojo con eosina. La proteína de los glóbulos rojos (hemoglobina) y de las células musculares

también fijan eosina y, por lo tanto, que el citoplasma de las células hepáticas es de color rosa o rojo en un corte de hematoxilina-eosina (Bartolos, 2004).

Características biológicas de la cochinilla (*Dactilopius coccus*)

La cochinilla es un insecto hemíptero, de la familia de los cóccidos, del tamaño de una chinche de México. Vive sobre nopal o tunera (tuna común) y reducido a polvo se emplea como colorante en la industria textil, farmacología, helados, bebidas alcohólicas, yogur, etc. Se siembra en nidos que contengan 8 o 10 madres en estado de desove, procurando que la siembra en los nopales sea uniforme y que no queden amontonadas ni se estropeen. Después de 3 días de nacido el insecto clava su pico en la tunera, dispositivo chupador localizado en la parte inferior de su cabeza, y que le sirve para alimentarse. Allí permanece asido hasta su muerte; de modo que si por alguna causa se desprende, no vuelve a agarrarse, y perece. Pasado un mes de nacido el insecto forman unos capullitos que parecen de algodón, de las que salen unas pequeñas moscas con dos alas blancas que vienen hacer los machos. Estos en nuestro concepto no son necesarias para la fecundación en todas las generaciones; a pesar de que se cree generalmente lo contrario; pues repetidas observaciones que la hembra desova sin la concurrencia del macho, en la cochinilla se verifica la fecundación como en los pulgones sin que sea necesario el macho en todas las generaciones, entendiéndose la influencia de unas fecundaciones primitivas a muchas generaciones sucesivas. Aislando las hembras se obtienen en un año hasta tres generaciones. La cochinilla desde que nace hasta que empieza a desovar emplea ochenta y cinco días, este periodo es más corto en verano que en invierno. Lo mismo se observa en los parajes cálidos, en donde crece más pronto que en los fríos. Su larva aparece en los nopales por la primavera, y se nutre de la cochinilla. El mejor medio para ayudarlo es limpiar las tuneras de las piedras y malezas en donde se abrigan (Márquez, 2002).

Origen y características morfológicas de la cochinilla

La grana o cochinilla (*Dactylopius coccus*) es un insecto que parasita las hojas del nopal o tunera. Tiene forma de grano rojizo-negro cubierto por un polvo blanco. Cuando han alcanzado su desarrollo (unos 8 milímetros), se recogen y se colocan al sol o se secan en hornos. Su aspecto es granular, de forma más o menos oval, arrugada, convexo y con algunas estrías. La grana es la materia prima para la obtención de extracto de cochinilla <<carmín>> y ácido carmínico. En el año 1825, los señores Juan Mengliorini y Santiago de la Cruz, publicaron una memoria sobre el nopal y la cría de la cochinilla de América. Progresivamente se ha aumentado el cultivo en todas las regiones con resultados muy positivos por el alto poder de la propagación de este insecto.

Desove de la cochinilla

La primera semillación se hace en los meses de marzo, abril o mayo, y después empiezan a desovar de los setenta y cinco a los noventa días de nacidas, y en los meses más fríos, de los noventa y cinco a los ciento quince de nacidas. Hecha la semillación se recogen y se las mata a las madres, (que es la cochinilla preferida); colocándolas a dos pulgadas de espesor dentro de grandes bandejas de latas o barro, en estufa u horno calentado a 55 grados centígrados.

Crianza y recolección de la cochinilla

La recolección de la cochinilla de las tuneras para cualquier uso, es a los tres meses, época que comienza a desovar, y están listas para su recolección. Si el insecto que va a recogerse es el plantado en la primera siembra de mayo o junio, conviene dejarle desovar completamente quitando tan sólo las madres de las paletas que están muy pobladas, a fin de que éstas no se sequen y puedan alimentar bien a la nueva cría. Mas, si el invierno ha comenzado, y la cochinilla que se halla desovando es la de

segunda cría, deben recogerse todas ellas, después de un ligero desove que sea suficiente para conservar la semilla en los nopales durante la estación lluviosa.

Método de secado de la cochinilla

No hay otro método para secar la grana que el de matarla en hornos, exponiéndola después al sol o al aire libre. Para realizar esta operación se coloca la cochinilla en bandejas de barro, cuidando que no quede amontonada, se prefiere hacer el secado en horno.

Producción. Climas

La cochinilla en las regiones costa y sierra a temperaturas: entre 14 y 27°C. Humedad relativa de 55 a 85 % y una precipitación pluvial de 400 a 800 mm/año. Los principales factores que influyen en la producción de cochinilla son:

La insolación o luminosidad: La cochinilla tiene clara tendencia a fijarse en las superficies de menor insolación. Fuertes vientos provoca el desprendimiento de la cochinilla, por lo que es necesario instalar cortinas rompévientos; vientos moderados favorecen la infestación, lluvias fuertes ocasionan el desprendimiento de la cochinilla. A mayor temperatura y menor humedad relativa, se acelera el desarrollo de la cochinilla.

Propagación. Características Biológicas

El ciclo vital del animal macho oscila entre 51-63 días, desde la postura del huevo hasta su adultez, periodo en que se realiza su función procreadora. Por cada macho existe entre 150 y 200 hembras adultas. La hembra tiene un ciclo vital de 89-136 días desde la postura del huevo hasta su estado adulto. La infestación de la tuna puede ser: natural o inducida. La infestación

natural: Las pencas son infestadas en forma natural, inducidas por el viento y producidas por las ninfas migrantes que se trasladan por si solas entre planta y planta. Infestación Artificial: Consiste en infestar hembras adultas en ovoposición sobre pencas de las tunas. Las infestaciones más conocidas son por el método de las bolsitas de tul o el método de la gasa, método del tarrito de lata y método de bandeja. La infestación artificial se recomienda efectuarla en el mes de abril luego de la época de lluvias para la sierra, para la costa puede efectuarse durante todo el año.

Grados de Infestación. Cosecha

De acuerdo al estado de madurez de las cochinillas hembras, la recolección se realiza todo el año, siendo la época más apropiada los meses de marzo a diciembre. Anualmente se realiza 3 cosechas, aunque hay productores que la realizan cada 60 días, dependiendo del manejo que se dé a la planta. La recolección se hace usando unos cepillos especiales y se realiza cuando la hembra adulta ha llegado a medir 7 mm de longitud por 6 mm de ancho.

Técnica de muerte de la cochinilla

La calidad de colorante a obtenerse, depende de la técnica de muerte y secado de la cochinilla. La matanza se realiza en bandejas de calamina: Bandeja cubierta con plástico y expuesto al sol durante aproximadamente 2 horas, la muerte es por asfixia y sofocación, se obtiene producto plateado.

Matanza en Bolsa. Se emplean bolsas de plástico de color negro expuestas al sol y herméticamente cerradas, en pocos minutos se obtiene un producto plateado de buena calidad.

Secado Post cosecha

Secado de la cochinilla: Existen los métodos de secado al sol (6 a 8 días), secado a la sombra (18-20 días) o secado al horno (8 horas) (Valdivia, 2002).

Clasificación, Industrialización y usos del colorante

Nombre y clasificación

Clase: Insectos

Orden: hemípteros

Sub- Orden: Homópteros

Familia: Dactylopidae

Género: Dactylopius

Especie: Dactylopius coccus

Nombre vulgar: Cochinilla

Descripción y características

La cochinilla es un insecto (*Dactylopius coccus* costa) que se instala como parásito, en las hojas de la tuna (*Opuntia picus* cactil), de cuya savia se nutre a través de un estilete bucal. Su reproducción se realiza en la misma tuna, donde se aloja formando colonias. El colorante natural que se extrae de la cochinilla contiene dos sustancias: el carmín y el ácido carmínico los que son inocuos al hombre, por lo que se usa como colorante natural.

Usos

La cochinilla es empleada tradicionalmente, en estado acuoso utilizando alumbre como mordiente, para teñir pelos de alpaca y algodón. Actualmente, el uso principal de la cochinilla es en la modalidad de carmín, el cual es un producto versátil de gran valor para muchas industrias. En la industria

farmacéutica, el carmín en polvo o en solución, se emplea en pastas dentífricas, enjuagues bucales, etc.

Análisis de Laboratorios. El ácido carmínico se usa en unciones histológicas y bacteriológicas. Igualmente como indicador químico de reacciones. Usos en fotografía a color y pigmentos para artistas. En la industria cosmética, se emplea en lápices, polvos faciales, lápices para ojos, etc. Desde el punto de vista de calidad, la industria cosmética es la más exigente, sólo acepta el carmín de alta pureza que coincida en tonalidad con sus patrones de calidad y color. En la industria alimentaria, el consumidor de embutidos está acostumbrado a utilizar productos de cierta tonalidad de rojo. El fabricante emplea carmín para colorear sus embutidos cuando utiliza carne de cerdo y así poder teñir las tripas. Cuando el embutido es hervido por el consumidor se utiliza carmín en polvo. En Francia, se le agrega en forma de sal colorante. Con carmín se colorean las bebidas alcohólicas (tipo Campari), bebidas no alcohólicas, jaleas, mermeladas, helados, yogur, cerezas, sopa en polvo, etc. En general, cualquier producto que deba tener una tonalidad rojo fresa.

Zonas de producción

El Perú es el primer productor mundial de cochinilla, abastece aproximadamente el 84% de la demanda mundial, lo que corresponde a 420 toneladas anuales. Otras zonas productoras son: Las Islas Canarias con el 8%, Chile con el 6%, Bolivia con el 2%.

Productos procesados

Al carmín, químicamente se le define como un complejo organometálico formado por ácido carmínico de color rojo o morado.

Propiedades

-El carmín es insoluble en agua y en alcohol; y soluble en medios alcalinos. Es un polvo impalpable de color rojo o morado.

-Tiene mejor resistencia al calor y a la oxidación química, comparado con los colorantes sintéticos.

-Buena estabilidad frente a la luz.

-Es un producto muy estable. No se han detectado variaciones en su contenido de ácido carmínico, es producto almacenado durante 4 años.

- Su principal propiedad radica en su enorme poder colorante, que supera indiscutiblemente al de cualquier otro.

-El carmín no es tóxico. Es completamente inofensivo. Puede ser ingerido por el organismo humano o estar en contacto prolongado con la piel, sin producir el menor efecto tóxico. Por esta importantísima propiedad, este colorante natural está incluido en la mayoría de las farmacopeas oficiales.

-En lo que respecta a su inocuidad, el carmín no ha podido aún ser desplazado por los colorantes sintéticos, a pesar de los gigantescos adelantos de la química moderna. El carmín es utilizado como pigmento o como colorante. Cuando se emplea como pigmento (líquido) su método de coloración es directamente proporcional a su pureza. En cambio, cuando se le emplea como colorante (sólido) su método de coloración es por dispersión (distribución del color a lo largo de todo el material a ser coloreado) y a fuerza de coloración no es proporcional a su pureza.

Tabla 1. Zonas de producción de *Dactilopius coccus* (cochinilla).

DEPARTAMENTO	ZONAS
Ayacucho	Huamanga, Huanta, Cangallo y Lucanas (Pausa, Huaytará, Pampas y Atopampa).
Huancavelica	Acobamba, Tayacaja, Pampas y San Miguel
Arequipa	Colca, Arequipa, La Joya, Caravelí
Lima	Pativilca, Barranca, Supe, Huacho (Sta. Rosa),
Moquegua	Chancay, Huaral, Pampa XIII. Chiloca, San Bartolomé, Cuculí, Asia, Ayaviri, Yauyos, Mala, Huarochirí, Cañete. Moquegua y Omate.
Apurímac	Abancay, Andahuaylas, Crahuasi.
Ancash	Caraz, Sihuas, Corongo, Chavín, Hauri, Huasta, Canis, Ciquian.
La Libertad	La Libertad, Santiago de Chuco
Cajamarca	Cajamarca, San Marcos
Piura	Ayabaca, (Sicchez, Jilili y Ayabaca), y Piura
Tacna	Tacna
Cuzco	Limatambo, Mollepata y Paruro
Huánuco	Huánuco, y la Unión
Ica	Chincha (hoja redonda), Ica, Nazca

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN

La preparación del colorante natural carmín-ácido carmínico y los análisis se realizaron en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. Las muestras serán coloreadas en el Laboratorio de Patología del Hospital Regional de Cajamarca. Las muestras de tejido de hígado de ovino serán recolectadas de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

Datos Meteorológicos (*)

Temperatura máxima	23,5° C
Temperatura media	11° C
Temperatura mínima	9° C
Humedad relativa	68.0 %

(*) Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología- Cajamarca-2013

MATERIALES

Material biológico

Muestras de tejido hepático de 20 ovinos.

Equipos

Microscopio compuesto de luz incorporada.

Microscopio compuesto con cámara incorporada.

Micrótopo de rotación.

Refrigeradora.

Estufa.

Baño María.

Material de laboratorio

Mortero.

Tamiz (malla metálica de 1/16").

Láminas porta y cubre objetos.

Reactivos

Alcohol etílico.

Xileno.

Formaldehído.

Carmín y ácido carmínico.

Bálsamo de Canadá.

METODOLOGÍA

Selección de los insectos

Insectos "cochinilla" en estado fresco (recién cosechado), procurando hacer la selección de los insectos de acuerdo al estado de madurez, a aquellos que hayan llegado a medir 7mm de longitud por 6 mm de ancho preferentemente.

Matanza en bandejas de calamina

1. Una vez seleccionado los parásitos, serán colocados en bandejas de calamina cubiertas con plástico, de 41 cm de largo por 25 cm de ancho, procurando la uniformidad de la muestra por extendido de la cochinilla, que no exceda a una pulgada de espesor, para facilitar el secado y la muerte de los parásitos.
2. Seguidamente se les expuso al sol por 15 – 25 días, tiempo necesario en el cual se verificó la muerte de los insectos por asfixia y sofocación. Los parásitos muertos se caracterizan por presentar una extrema deshidratación, sin motilidad, y envueltos de un polvo blanquecino característico.
3. Durante el tiempo de exposición al sol de la cochinilla, fue necesario mezclarlos continuamente, con mucho cuidado, evitando maltratarlos demasiado.
4. Al finalizar el procedimiento de matanza, se obtiene un producto plateado de buena calidad.

Obtención del colorante

1. El producto plateado obtenido de la matanza de los insectos por secado y deshidratación, se muele en mortero hasta obtener un polvo homogéneo bien triturado.
2. Luego, se realiza el tamizado en mallas metálicas de 1/16", hasta obtener una uniformidad del producto (cochinilla en polvo).
3. Se pesa 10 g de cochinilla en polvo, se deposita en un beaker con capacidad para 150 ml, para luego añadirle 100 ml de alcohol etanol absoluto.
4. Mezclar hasta disolver el carmín y ácido carmínico con alcohol etanol absoluto, (puede ayudarse con calor de mechero a gas).
5. Una vez obtenido el colorante de carmín y ácido carmínico, se le añade 5 ml de una solución de alumbre como mordiente (solución de alumbre al 5%, el alumbre se disolverá 5 g de alumbre en 100 cc de agua destilada).
6. Las dos soluciones se mezclaron hasta su homogenización total.
7. Es recomendable dejar añejar el colorante hasta su uso. De 2 meses más.
8. El producto final, es una solución de colorante de un color azul o púrpura.

Obtención de la muestra de tejido de hígado de ovino en el camal Municipal de Cajamarca

Una vez sacrificados los animales, las muestras del hígado de ovino son recolectadas en las mesas de inspección. La toma de la muestra (1 centímetro cúbico) de diferentes partes del órgano, son depositadas en frascos de vidrio que contienen el fijador formaldehído bufferado al 10%.

Luego las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca para proseguir con la Técnica de Inclusión en Parafina.

Trabajo de Laboratorio (histología)

Método de Inclusión de Parafina

1. Toma de la muestra de tejido hepático de ovino 1 cm³.
2. Fijación. Luego de la fijación de las muestras en una solución de formaldehído bufferado al 10%, los bosques de tejido hepático se los lavará en agua corriente por 5 a 10 minutos, tiempo necesario para eliminar con agua el exceso del fijador.
3. Deshidratación. Seguidamente, serán sometidas a concentraciones crecientes de alcohol etílico en soluciones de 80°, 95° y alcohol absoluto hasta la deshidratación total.
4. Aclaramiento. Efecto de Aclaramiento de las muestras con xileno en tres baños de vasos Coplin.
5. Inclusión. Las muestras se las incluirá en bloques de parafina diluida, obteniendo tacos de parafina que contendrán las muestras correspondientes. Se las dejará enfriar al aire libre por 24 horas, y para permitir el proceso satisfactorio, luego permanecerán por 72 horas en refrigeración.

Laboratorio de Histología del Hospital Regional de Cajamarca

6. Microtomía. Obteniendo el endurecimiento y enfriamiento de los tacos de parafina, se los montará al Micrótopo de rotación, para obtener rebanadas de tejido a 5 – 8 micras de grosor. Estos cortes se extenderán en Baño María (37°C – 40°C), que previamente contiene

gelatina adhesiva. Se recupera el corte con una lámina portaobjetos, se las deja secar al aire hasta el momento de colorearlas.

7. Coloración. Una vez seca la muestra. Se llevará a cabo la coloración con Carmín – ácido carmínico.
8. Montaje. Finalmente, se realizará el montaje, adicionando 1 gota de Bálsamo de Canadá, como pegamento, se coloca una laminilla cubreobjetos, evitando por presión la formación de burbujas de aire.

TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

El presente trabajo de investigación se someterá a un análisis de Estadística Descriptiva.

Criterios para evaluar la calidad de la tinción del colorante Carmín y Ácido Carmínico

Buena

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

Regular

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

Mala

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

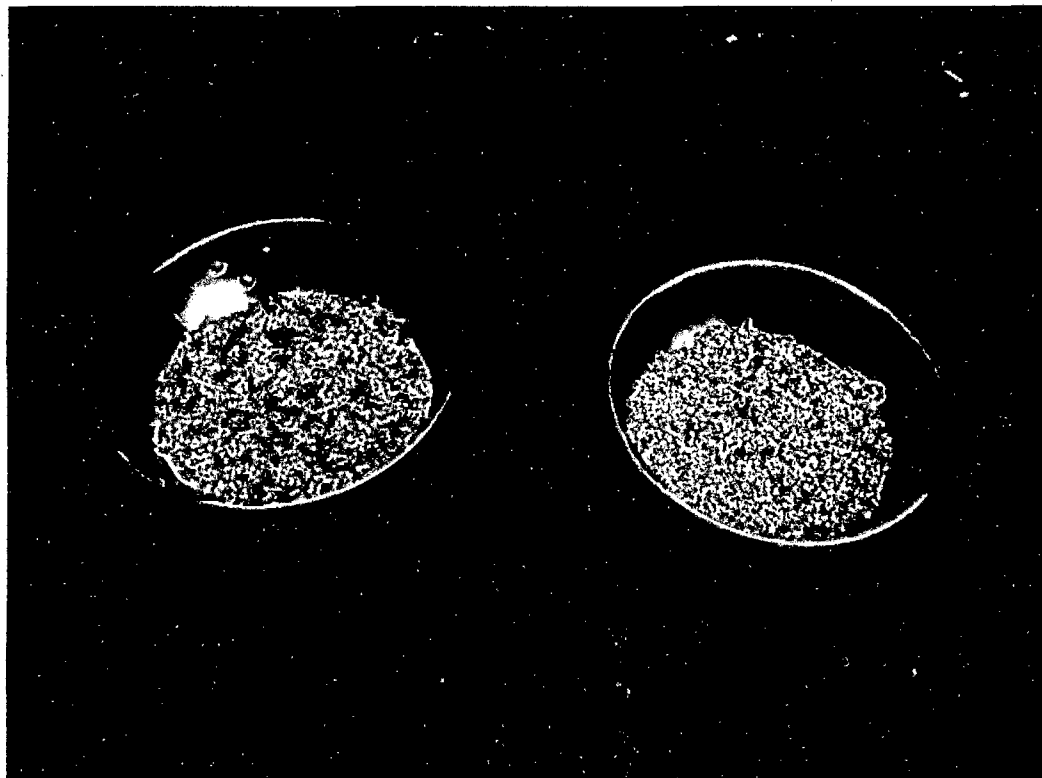
**TESTIMONIO FOTOGRÁFICOS QUE DETALLAN LOS PASOS DE LA
METODOLOGÍA DEL PRESENTE ESTUDIO**



Fotografía 1. Selección de los parásitos *Dactilopius coccus* (cochinilla), para obtener Carmín y Ácido Carmínico.



Fotografía 2. Cosecha del parásito *Dactilopius coccus* (cochinilla).



Fotografía 3. Secado del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla) mediante exposición solar durante 15-25 días, hasta alcanzar la muerte de todos los parásitos.



Fotografía 4. Homogenización tres veces por día para el secado uniforme del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla).



Fotografía 5. Verificación del trabajo de investigación por el Presidente del Jurado M.V. M.Cs. Jorge Gamarra Ortiz.

**TRABAJO EN EL LABORATORIO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y
DINÁMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

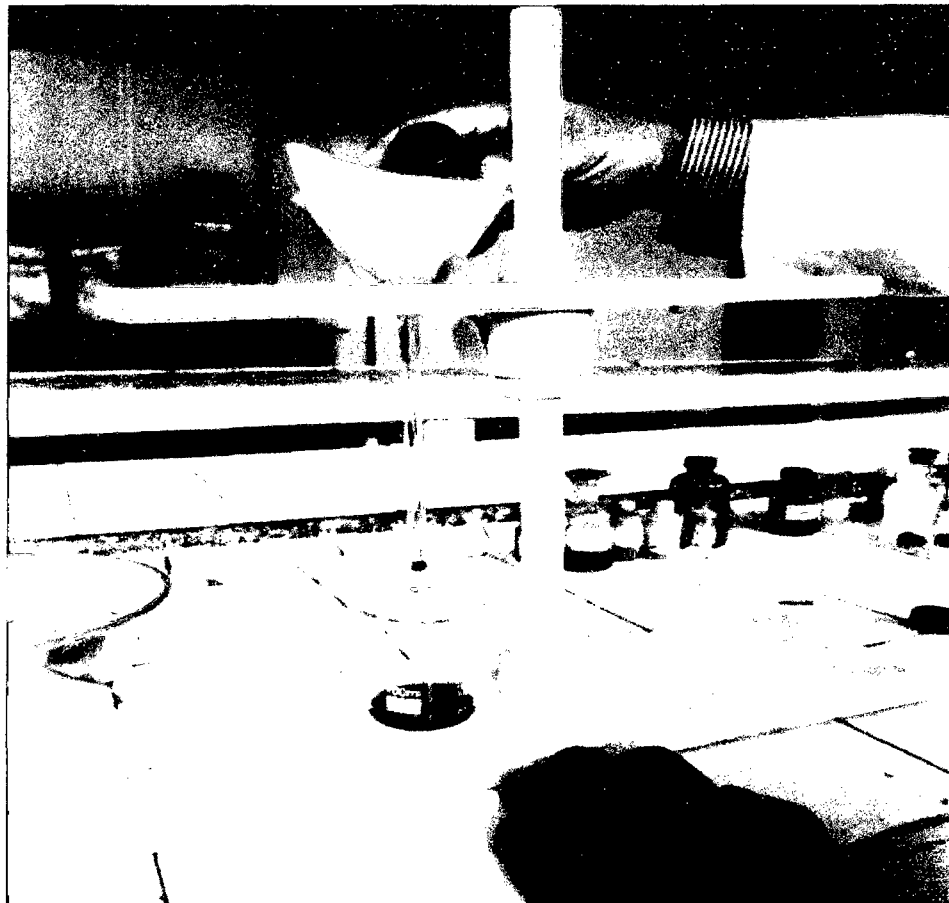
ELABORACIÓN DEL COLORANTE CARMÍN-ÁCIDO CARMÍNICO



Fotografía 6. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas UNC. Pesado de colorante Carmín y Ácido Carmínico obtenido del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla).



Fotografía 7. Laboratorio de Ciencias Química y Dinámicas UNC. Proceso de trituración del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla), en mortero de 20 g de capacidad.



Fotografía 8. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas UNC. Proceso de filtrado del material triturado del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla), para obtener el colorante Camín y Acido Carmínico, en embudo de plástico que contiene el papel de filtro, con alcohol etanol absoluto.



Fotografía 9. Laboratorio de Biología de la Facultad de Educación UNC. Estudio microscópico para elaborar el diagnóstico histológico, mediante los Criterios de calidad de la tinción del colorante Eosina - Carmín y Ácido Carmínico en los tejidos de hígado de ovino.



Fotografía 10. Laboratorio de Biología de la Facultad de Educación. Toma de microfotografías.

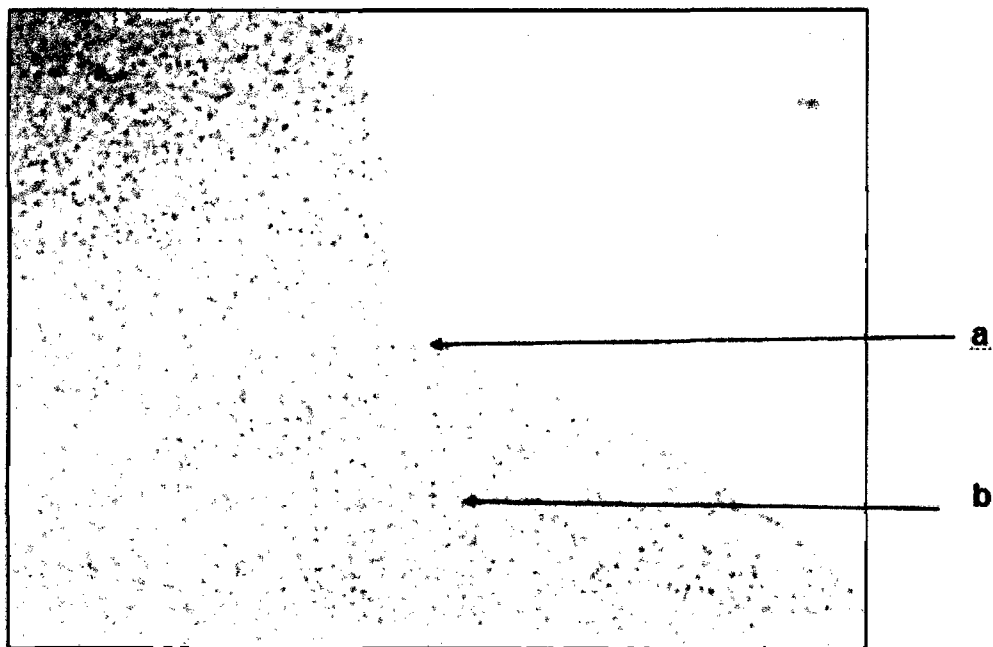
CAPÍTULO IV

RESULTADOS

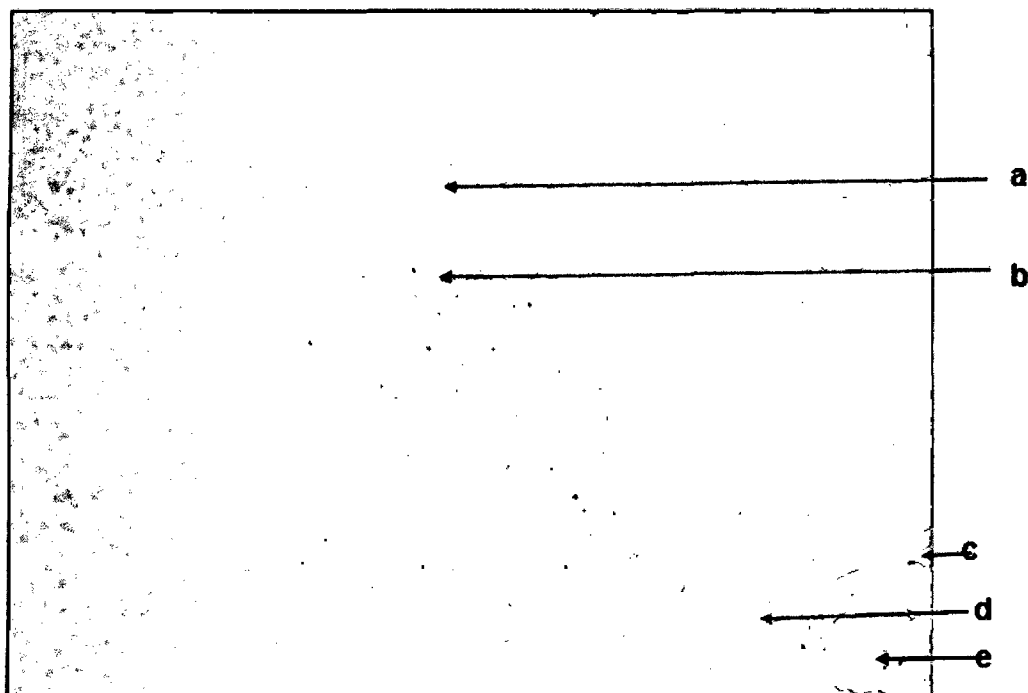
CUADRO 1. Efecto de la Afinidad Tintorial de la Coloración Eosina-Carmín y Ácido Carmínico sobre los Elementos Estructurales de los Tejidos del Hígado de Ovino.

TEJIDOS DEL HÍGADO	CALIDAD DE LA TINCIÓN		
	BUENA	REGULAR	MALA
Cápsula de Glisson			La delgada capa conectiva conformada por numerosas fibras elásticas, ausentes. Sin afinidad al ácido carmínico.
Lobulillo Hepático Cordones Hepáticos Hepatocitos		Cordones hepáticos radiales a la vena centrolobulillar de color rosa sin límites celulares, separados de sinusoides sanguíneos sin coloración, hepatocitos acidófilos de color rosa, con núcleos basófilos.	
Vena centrolobulillar		Revestida de células endoteliales con núcleos basófilos. En el lumen sangre hemolizada de color rojo.	
Espacio portal	Entre los ángulos de los lobulillos se aprecia con claridad: un conductillo biliar, rama de la vena porta, rama de la arteria hepática y capilares linfáticos.		
Vasos sanguíneos		Revestidos de células endoteliales con núcleos basófilos.	

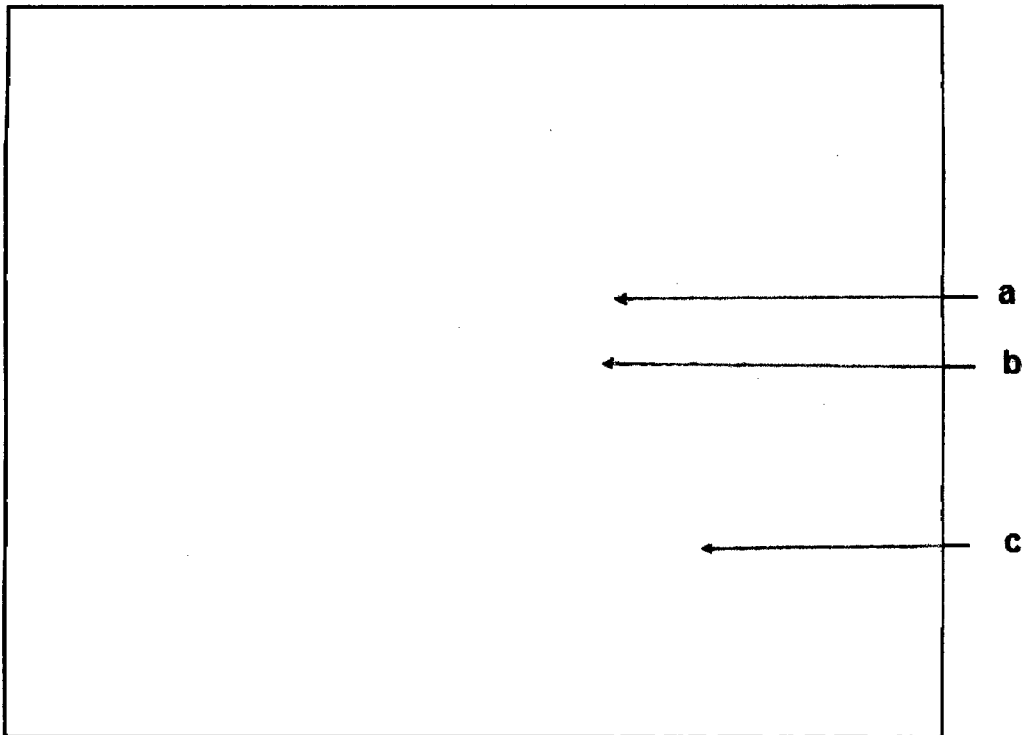
Descripción Microscópica de los Elementos Estructurales de los Tejidos del hígado de Ovino. Coloración. Eosina-Carmín y Ácido Carmínico.



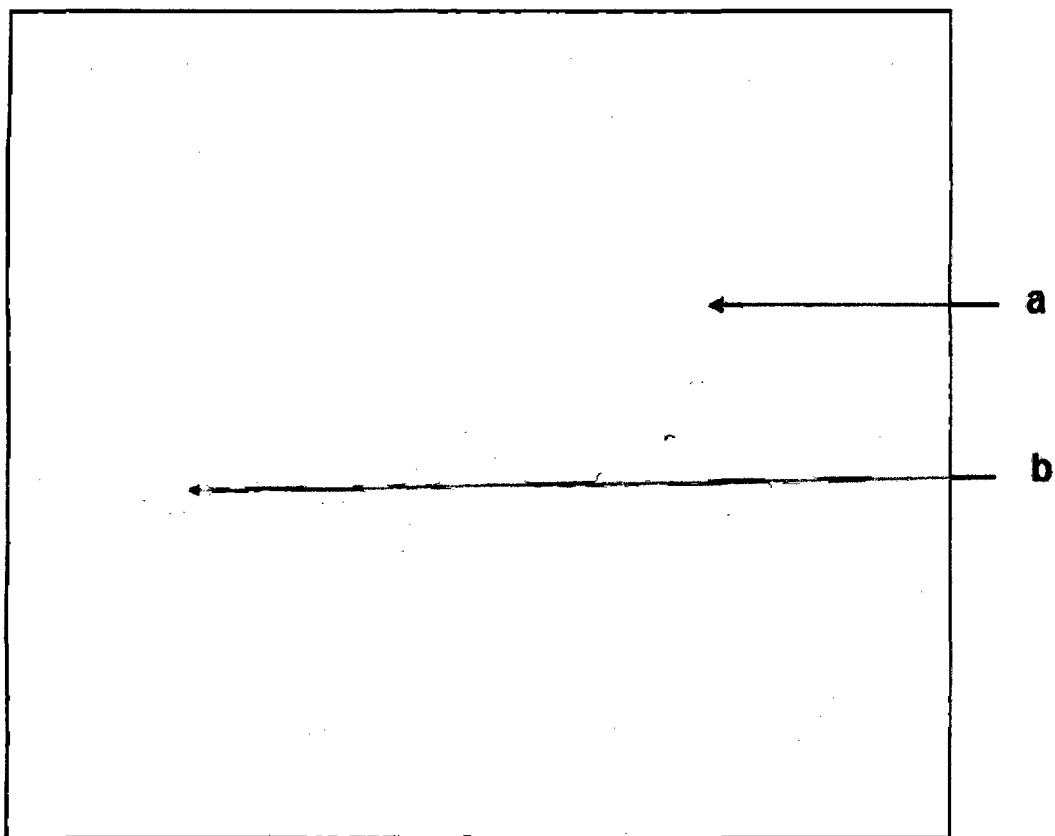
Microfotografía 1. Lobulillo hepático, (a) Ausencia de la Cápsula de Glisson, no muestra el tejido conectivo estructural, por lo tanto, las numerosas fibras elásticas presentes en ella sin afinidad a la coloración Eosina- Ácido Carmínico, (b) Parénquima hepático, cordones hepáticos sin límites que muestren su disposición radial alrededor de una vena centrolobulillar, los núcleos de los hepatocitos difusos de un color azul oscuro con afinidad al ácido carmínico. (100 X).



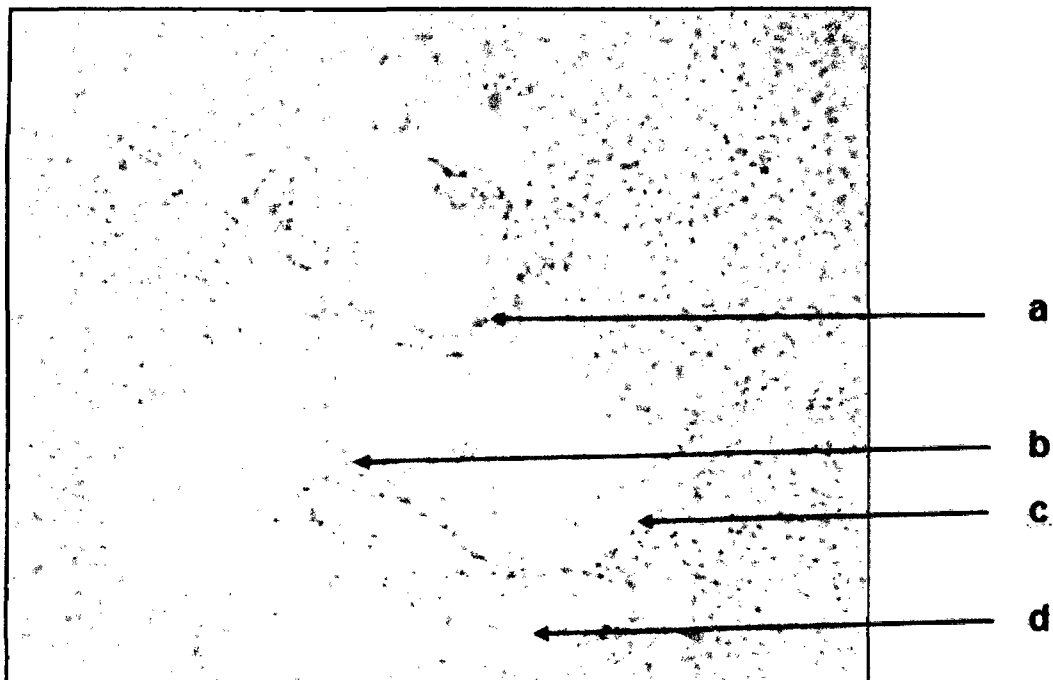
Microfotografía 2. Lobulillo hepático. Cordones hepáticos, **(a)** Células hepáticas formando cordones radiales alrededor la vena centrolobulillar, con afinidad a la coloración acidófila-Eosina, de un color rosa, sin membrana celular definida, separados de los sinusoides sanguíneos de color claro. Núcleos de los hepatocitos de un color azul con afinidad al ácido carmínico, **(b)** Vena centrolobulillar rodeada de núcleos endoteliales basófilos, **(c)** Espacio porta, **(d)** se observa un conducto biliar de color rosa con núcleos basófilos, **(e)** La vena porta con núcleos de células endoteliales basófilas. (100 X).



Microfotografía 3. Lobulillo hepático. Vena centrolobulillar, **(a)** Revestida de células endoteliales con núcleos basófilos con afinidad al colorante ácido carmínico, **(b)** En el interior del lumen sangre hemolizada de color rojo, con afinidad a la Eosina, **(c)** Cordones hepáticos separados de sinusoides sanguíneos de color claro. (100 X)



Microfotografía 4. Lobulillos hepáticos. Vasos sanguíneos, **(a)** Tejido conectivo interlobulillar sin coloración; **(b)** Vena en el espacio interlobulillar revestida de células endoteliales con núcleos basófilos con afinidad al colorante ácido carmínico, en el lumen presencia de sangre de color rojo con afinidad a la eosina. (100 X)



Microfotografía 5. Lobulillos hepáticos. Espacio portal, (a) Conducto biliar revestido de núcleos celulares basófilos, (b) Rama de la arteria hepática con núcleos de las células endoteliales basófilos, (c) Rama de la vena portal con núcleos basófilos, en el lumen sangre de color rojo, (d) Capilares linfáticos con células endoteliales con lumen de color claro. (100 X).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Para mostrar la afinidad de los tejidos de hígado de ovino con el colorante Eosina-Carmín y Ácido carmínico extraídos del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla), se consideró trabajar en el hígado por ser un órgano parenquimatoso, macizo y compacto, donde sus elementos celulares y estromales se encuentran bien organizados. Criterios que compartimos con, Alvarado (2000) el cual manifiesta, que la selección de un corte adecuado, para observar detalles estructurales de las células y de los tejidos cuando están trabajados con colorantes ácidos y básicos, se recomienda, en este caso, probar determinado colorante en órganos que dentro de su estructura orgánica, los elementos celulares se encuentren juntos y ordenadamente. El hígado es el órgano de elección. La mayor parte de las células son similares, y poseen una distribución también similar, en este órgano el 60 por 100 de las células son del mismo tipo y se hallan dispuestas en forma similar.

En el Cuadro 1, Microfotografía 1, referente a la calidad de tinción del colorante Eosina- Carmín Ácido Carmínico con los elementos conectivos de la cápsula de Glisson del hígado, constituida por gran cantidad de fibras elásticas. En cuanto, a la calidad de tinción es mala, no se observan tejidos estromales capsulares por no tener afinidad al colorante usado. Prieto Motta (1998), describe que los componentes celulares y tisulares necesitan de un colorante específico, basado en la composición química de lo cual están constituidos. La cápsula del hígado, el conectivo interlobular, y los límites celulares, tienen afinidad a la Hematoxilina Eosina. La hematoxilina colorea sustancias basófilas de un color azul-púrpura, y a las células y tejido

conectivo de un color rosa. Así mismo, la Hematoxilina Férrica colorea de marrón sangre a la cápsula de Glisson, y a los espacios interlobulares. Bartolos (2004), emplea diferentes colorantes básicos y ácidos, en sus trabajos microscópicos, determina que las células y los tejidos apetecen colorantes especiales, a esta afinidad exclusiva por tal colorante lo denomina colorantes selectivos. En coloraciones habituales los núcleos celulares muestran una coloración basófila. Las fibras del tejido conectivo específicamente las reticulares se las observa utilizando nitrato de plata, las fibras elásticas se las observa utilizando hematoxilina-orceína que las muestra de un color azul claro.

En la Microfotografía 2, detallamos a un lobulillo hepático, en donde los cordones hepáticos formados por hepatocitos, radiales alrededor de la vena centrolobulillar de color rosa, con tendencia acidófila-Eosina, sin límites celulares definidos, separados de los sinusoides sanguíneos de color claro. Los núcleos de los hepatocitos de un color azul con afinidad al ácido carmínico, la vena centrolobulillar rodeada de núcleos endoteliales basófilos. En el espacio portal, se observa un conducto biliar de color rosa con núcleos basófilos; la vena porta con núcleos de células endoteliales basófilas. Nuestros hallazgos también lo comparte Prieto Motta (1998), quien determina que los constitutivos de un tejido son coloreados de acuerdo a su composición química, por lo tanto, el Carmín y ácido carmínico colorea a los núcleos de los hepatocitos de un color azul-púrpura por ser sustancias basófilas.

La Microfotografía 3, detalla la parte central de un lobulillo hepático con la vena centrolobulillar revestida de núcleos endoteliales basófilos, contienen en su lumen una masa de glóbulos rojos; de igual manera en la Microfotografía 4, se observan vasos sanguíneos revestidos de células endoteliales con núcleos basófilos con afinidad al colorante ácido carmínico. En interior del lumen existe una masa de sangre de color rojo, con afinidad a la Eosina. Prieto Motta (1998), refiere que las estructuras celulares

apetecen un determinado colorante de acuerdo a su composición química, en este caso, los núcleos celulares presentan basofilia.

El espacio portal, descrito en la Microfotografía 5, dentro de los criterios considerados para evaluar la calidad de tinción, revela una calidad buena, se observa: Conducto biliar revestido de núcleos celulares basófilos; Rama de la arteria hepática con núcleos de las células endoteliales basófilos; Rama de la vena portal con núcleos basófilos, en el lumen sangre de color rojo; y capilares linfáticos con células endoteliales con lumen claro. Con referencia a esta afinidad Bartolos (2004), determina que cuando se emplea coloraciones basófilas, los núcleos celulares muestran una coloración azul.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Después de haber realizado los estudios de laboratorio de los tejidos de hígado de ovino, sometidos a la coloración Eosina-Carmín y Ácido Carmínico extraídos del parásito *Dactilopius cocus* (cochinilla), se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El colorante Carmín- Ácido Carmínico, se comporta como colorante básico, y colorea a los núcleos celulares (Hepatocitos) y núcleos de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de un color azul oscuro.
2. Las hileras de células hepáticas se encuentran sin límites celulares.
3. El tejido conectivo de la cápsula hepática, como el tejido conectivo trabecular del parénquima hepático, no tiene afinidad al colorante Carmín y Ácido Carmínico.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevos trabajos de investigación usando el colorante natural Carmín y Ácido Carmínico obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en mayor concentración.
2. Probar el colorante en otra clase de tejido y en otras especies de animales domésticos.

CAPÍTULO VIII

LISTA DE REFERENCIAS

1. Alvarado, I. 2000. Histología Veterinaria. 23ava Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. España pg. 274-280. (Internet) Disponible: <http://www.nonografias.com/trabajos/estorago-cerdo>. Consultado el 22 de Noviembre del 2014.
2. Arévalo, J. 1998. Sembrío e industrialización de la cochinilla. Ministerio de Agricultura. Segunda Edición. Perú.
3. Bancks. 1996. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda Edición. Editorial Manual Moderno México. pg. 480. (Internet) Disponible: <http://ciartsbijengronen.nl/histología-veterinaria-aplicada-Bancks.htm>. Consultado el 12 de octubre del 2014.
4. Bartolo, R. 2004. Histología. Primera Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
5. Ham, Arthur. 2013. Tratado de Histología. Novena Edición. Editorial Interamericana. Caracas. Venezuela. pg. 935. (Internet). Disponible <http://listado.Libros-ciencias-médicas-naturales/tratado-de-histología-Artur-w-ham>. Consultado el 20 de febrero del 2015.
6. Márquez, M. 2002. Estudio Económico Productivo del Perú. Cría y Producción de la cochinilla. Perú. (Internet) Disponible: http://es.wikipedia.org/Dactylopius_coccus. Consultado el 20 enero del 2015.

7. Rubio, E. (2000). Siembra de Cochinilla. Ministerio de Agricultura. Oficina de Información. Asistente CORPEI-Perú. (Internet) Disponible: <http://blogs.20minutos.es/cronicaverde/2013/09/10/cochinilla-el-colorante-natural-mas-ecologic/>. Consultado el 15 de noviembre del 2014.
8. Sifuentes, G. 1997. Principios de tinción. Colorantes en Histología. Primera Edición. Editorial Interamericana. Chile.
9. Valdivia, R. 2002 Cochinilla. Revista Científica. Sembrío y Producción. Lima Perú. (Internet) Disponible: http://es.wikipedia.org/Dactylopius_coccus. Consultado el 10 Octubre del 2014.

ANEXO

PREPARACIÓN DE FOSFATO BAFERADO SALINO (FBS)

FBS: 0,15 M CLORURO DE SODIO Y 0,01 M FOSFATO MISHEL and STANLEY

1. Dentro de un beaker con capacidad para un litro, se coloca una barra imantada.
2. El beaker es llenado con 800 ml de agua recientemente destilada.
3. Se coloca el beaker sobre el plato del agitador magnético, agitando lentamente.
4. Se adiciona 1,194 g de fosfato sódico dibásico anhidro y 0,256 g de fosfato sódico monobásico monohidratado. Se continúa agitando hasta que disuelva (se puede someter a calor si es necesario).
5. Si ha usado calor se espera a que enfríe y se mide el pH con un peachímetro, ajustándolo si es necesario con 1,0 N de hidróxido de sodio, hasta que el pH se encuentre 7,2 y 7,4.

Nota: La preparación del 1,0 N de hidróxido de sodio se hace disolviendo en un beaker con capacidad para 100 ml, 4 g de NaOH en 80 ml de agua destilada, se transfiere esta solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agregar 20 ml de agua destilada agitando la solución.

6. Se continúa agitando la solución y se agrega 8,766 g de NaCl esperando que disuelva.
7. Se transfiere la solución hacia un frasco volumétrico de un litro y se adiciona 200 ml de agua destilada agitando constantemente.

SOLUCIÓN DE FORMOL BAFERADO NEUTRAL AL 10 %

Formol 40 %.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml
Fosfato sódico monobásico.....	4 g
Fosfato sódico dibásico ¹ anhidro.....	65 g

GELATINA ADHESIVA AL 5%

Gelatina farmacéutica.....	5 g
Agua destilada.....	100 ml

Disolver con ayuda de calor. Adicionar varios cristales de timol para preservar. Para uso, mezclar completamente tres cucharaditas de la solución de gelatina al 5% por 1000 ml, en el baño de flotación.

STOCK DE EOSINA ALCOHÓLICA AL 1%

Eosina(amarillenta), agua soluble.....	1 g
Agua destilada.....	20 ml
Disolver y adicionar	
Alcohol 95%.....	80 ml

SOLUCIÓN DE EOSINA PARA TRABAJO

Stock de eosina alcohólica al 1%.....	1 parte
Alcohol 80%.....	3 partes

Justo antes de usar adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante y remover.

ALCOHOL ÁCIDO

Alcohol 70%.....	100 ml
Ácido clorhídrico concentrado.....	10 ml

CARBONATO DE LITIO SATURADO AL 1%

Carbonato de litio.....	1 g
Agua destilada.....	100 ml

TÉCNICA DE DESHIDRATACIÓN, ACLARAMIENTO, IMPREGNACIÓN E INCLUSIÓN (TACOS) DE MUESTRA ENVIADAS AL LABORATORIO

DESHIDRATACIÓN

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

ACLARAMIENTO

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

IMPREGNACIÓN

11. Parafina 56°-58°..... 2 horas.
12. Parafina 56°-58°..... 2 horas.
13. Parafina 56°-58°.....1.5 horas.

INCLUSIÓN

14. Confección de tacos.

TÉCNICA DE COLORACIÓN DE HEMATOXILINA- EOSINA

TIEMPO DE DURACIÓN

1. Xilol.....	5 minutos.
2. Xilol.....	5 minutos.
3. Alcohol absoluto al 100%.....	3 minutos.
4. Alcohol absoluto al 100%.....	3 minutos.
5. Alcohol absoluto al 95%.....	3 minutos.
6. Alcohol absoluto al 95%.....	3 minutos.
7. Alcohol absoluto al 70%.....	3 minutos.
8. Agua destilada	3 -5'
9. Carmin ácido carmínico.....	5-10'
10. Agua destilada.....	3-5'
11. Alcohol ácido- enjuagar	
12. Agua destilada- enjuagar	
13. Carbonato de litio al 1%.....	2 minutos.
14. Lavado con agua corriente.....	10 minutos.
15. Lavado con agua destilada.....	5 minutos.
16. Alcohol absoluto al 70%.....	3 minutos.
17. Eosina.....	1-5'.
18. Alcohol absoluto al 70%.....	3 minutos.
19. Alcohol absoluto al 95 %.....	2 minutos.
20. Alcohol absoluto al 95 %.....	2 minutos.
21. Alcohol absoluto al 100%.....	2 minutos.
22. Alcohol absoluto al 100%.....	2 minutos.
23. Xilol.....	3 minutos.
24. Xilol.....	3 minutos.
25. Xilol.....	3 minutos.

26. Colocar una gota de Bálsamo de Canadá sobre la lámina portaobjeto y cubrir con la lámina cubreobjetos.
27. Observar al microscopio.