

**www.e-rara.ch**

**La estación zoológica de Nápoles, y sus procedimientos para el examen microscópico**

**Castellarnau, Joaquín María de  
Madrid, 1885**

**ETH-Bibliothek Zürich**

Persistent Link: <https://doi.org/10.3931/e-rara-107309>

C. - Procedimientos para colorar.

---

**www.e-rara.ch**

Die Plattform e-rara.ch macht die in Schweizer Bibliotheken vorhandenen Drucke online verfügbar. Das Spektrum reicht von Büchern über Karten bis zu illustrierten Materialien – von den Anfängen des Buchdrucks bis ins 20. Jahrhundert.

e-rara.ch provides online access to rare books available in Swiss libraries. The holdings extend from books and maps to illustrated material – from the beginnings of printing to the 20th century.

e-rara.ch met en ligne des reproductions numériques d'imprimés conservés dans les bibliothèques de Suisse. L'éventail va des livres aux documents iconographiques en passant par les cartes – des débuts de l'imprimerie jusqu'au 20e siècle.

e-rara.ch mette a disposizione in rete le edizioni antiche conservate nelle biblioteche svizzere. La collezione comprende libri, carte geografiche e materiale illustrato che risalgono agli inizi della tipografia fino ad arrivare al XX secolo.

---

**Nutzungsbedingungen** Dieses Digitalisat kann kostenfrei heruntergeladen werden. Die Lizenzierungsart und die Nutzungsbedingungen sind individuell zu jedem Dokument in den Titelnformationen angegeben. Für weitere Informationen siehe auch [Link]

**Terms of Use** This digital copy can be downloaded free of charge. The type of licensing and the terms of use are indicated in the title information for each document individually. For further information please refer to the terms of use on [Link]

**Conditions d'utilisation** Ce document numérique peut être téléchargé gratuitement. Son statut juridique et ses conditions d'utilisation sont précisés dans sa notice détaillée. Pour de plus amples informations, voir [Link]

**Condizioni di utilizzo** Questo documento può essere scaricato gratuitamente. Il tipo di licenza e le condizioni di utilizzo sono indicate nella notizia bibliografica del singolo documento. Per ulteriori informazioni vedi anche [Link]

## B.—DISECCIÓN.

Sólo por no interrumpir la série completa de operaciones que hay que efectuar con un ejemplar, pongo aquí la *disección*, pues en la Estación Zoológica se efectúa esta, cuando hay necesidad, según el modo ordinario que está descrito en los libros que tratan especialmente de este asunto. En la parte que antecede, relativa á los procedimientos de matar y conservar, queda dicho lo suficiente para preparar los ejemplares para la disección; y como regla general puede decirse que será lo más conveniente, con aquellos animales que no se les haya señalado un tratamiento particular, matarlos con el ácido picrosulfúrico, y pasarlos luego al alcohol, en donde se disecan. Si conviene endurecerlos, puede mezclarse el ácido picro-sulfúrico con el crómico; y para ponerlos transparentes, el Dr. Mayer recomienda la creosota, que tal vez podría sustituirse con ventaja por una disolución concentrada de ácido fénico. El hidrato de cloral presta también buenos servicios en algunas ocasiones.

## C.—PROCEDIMIENTOS PARA COLORAR.

Muy raras veces se observan las secciones sin colorarlas de un modo conveniente; y para ello se pueden seguir dos caminos diferentes, que consisten en teñir, corte á corte, después de seccionado el ejemplar, ó bien colorarle *in toto*, y después sec-

cionarle. Este último método es el que se emplea en la Estación de Nápoles *siempre que sea posible*, pues es más rápido y más á propósito para los estudios morfológicos, puesto que permite con gran facilidad disponer un órgano, ó animal entero, en una *série de secciones*, de la manera que se dirá en el capítulo siguiente. Los histologistas se suelen más bien servir del primer método, porque su fin principal, al estudiar un corte, no es sólo ver en él las distintas regiones y tejidos bien diferenciados, para poder estudiar su posición relativa, sino la composición y propiedades de los tejidos mismos; y para ello les es preciso observar la acción de las sustancias colorantes, que usan más bien como reactivos.

Para colorar *in toto* animales ú órganos—á diferencia de las secciones, que es cosa de algunos minutos nada más—se necesitan de ordinario muchas horas y aún días; y de aquí que deban emplearse soluciones alcohólicas, pues en las acuosas los objetos entrarían en maceración, y aún podrían llegar á descomponerse. Otra razón hay para emplear en las coloraciones *in toto* soluciones alcohólicas, y es que se necesita que el líquido penetre perfectamente el cuerpo del ejemplar, condición que se llena más fácilmente cuanto mayor es la fuerza del alcohol; pero hay que tener en cuenta, según las observaciones del Dr. Mayer, que cuanto mayor es el tanto por 100 del alcohol en la solución colorante, más difusamente colora, como si el alcohol quitase á los tejidos su propiedad selectiva; y además también, tratándose del carmín, cochinilla y hematoxilina,

que cuanto más alcohólicas son las soluciones, menor cantidad de sustancia colorante contienen, y por lo tanto, menor será también su poder de coloración. De aquí la necesidad de poner en equilibrio estas tres condiciones, de modo que el objeto principal se llene sin perjuicio de las demás; y esto es lo que se ha tratado de hacer en las fórmulas de Mayer, Kleinenberg y Grenacher, que luégo consignaré. Algunas veces, como ha encontrado el Dr. Mayer, cuando los objetos son difícilmente penetrables, ó están protegidos por una cubierta *chitínosa*, en lugar de aumentar el tanto por 100 del alcohol en la solución colorante, se obtiene el mismo y aún mejor resultado, haciéndola obrar en caliente. (40° ó 50° C.)

Otra causa hace también que sea raro el uso de las soluciones acuosas en la Estación, aún cuando no se emplee la coloración *in toto*, y es que, como se ha visto en los «Procedimientos para matar, fijar y conservar,» los ejemplares están en alcohol de 70, y por tanto las secciones, al pasar á un líquido acuoso, por efecto de la fuerte osmósis que tiene lugar, se desgarran y se hinchan, hinchazón que no desaparece por un nuevo tratamiento por el alcohol; aunque no siempre, como hace notar el Dr. Mayer, es eso un inconveniente para la observación. Además, como en la Estación las preparaciones se montan casi exclusivamente en bálsamo de Canadá, después de colorar las secciones con una solución acuosa, es preciso hacerlas sufrir un tratamiento alcohólico con objeto de deshidratarlas, lo que produce pérdida de tiempo.

A pesar de todos esos inconvenientes, hijos más bien del exclusivismo en el método, que de la cosa en sí misma, las soluciones acuosas son indispensables en muchos casos, y en la misma Estación se usan algunas, tales como el picro-carminato; y muchos de sus inconvenientes desaparecen cuando se coloran las secciones una á una, y se montan en glicerina ó gelatina glicérica.

Una de las propiedades que ha de tener toda solución colorante, para ser buena, es gran poder de *diferenciación*: esto es, que tiña los distintos tejidos de una misma sección con diferente intensidad y tono de color, ó que no produzca la coloración *difusa*, como se dice en caso contrario. Esa propiedad selectiva ó de diferenciación que tienen los colores de fijarse de distinta manera en los diversos tejidos, ó bien de éstos de asimilarse diferentemente el color, se modifica mucho según el modo de operar. Ya he dicho cómo influye en ella la cantidad de alcohol, según las observaciones del Dr. Mayer. Otra condición que se debe tener presente es la de mayor ó menor cantidad de color. Una solución concentrada, y otra diluida, producen el mismo efecto, obrando diferente tiempo, pero la diferenciación será distinta. De ordinario será ménos difusa en la diluída; y deberá preferirse, á no ser que se siga un procedimiento inverso, que se usa mucho en la Estación, y que consiste en colorar por exceso, produciendo de esa manera una coloración difusa, y luégo decolorar por medio del lavado con un líquido conveniente—alcohol ó alcohol ácido—hasta obte-

ner la intensidad conveniente. Este método da muy buenos resultados en las coloraciones *in toto*.

Innumerables son las sustancias, que en distintas fórmulas y combinaciones, se usan en microscopia con objeto de diferenciar bien los tejidos y sus elementos. Los histólogos, sobre todo, son los que cada día aumentan su número, pues se sirven de ellas como de reactivos para estudiar los elementos histológicos y sus mútuas relaciones; pero en los trabajos morfológicos su importancia es más limitada, y por eso sólo me ocuparé de las siguientes fórmulas, de principal interés y de constantes resultados (1).

Las sustancias colorantes me parece podrían dividirse en estas cuatro secciones, agrupando las de propiedades semejantes:

- 1.<sup>a</sup> Carmín, cochinilla, hematoxilina, etc., etc.
- 2.<sup>a</sup> Colores de anilina.

Estas sustancias se fijan en los tejidos sin alteración química.

3.<sup>a</sup> Ácido ósmico y demás que se combinan con las diversas sustancias de las celdillas.

4.<sup>a</sup> Cloruro de oro, nitrato de plata etc., que no se combinan con las sustancias celulares, pero sí se fijan en ellas, descomponiéndose por reducción.

---

(1) El lector que desee conocer la historia detallada del empleo de las sustancias colorantes en microscopia, puede ver el trabajo completo, bajo el punto de vista histórico-bibliográfico, del Prof. H. Gierke—publicado después de presentada esta Memoria—titulado: «Färberei zu mikroskopischen Zwecken.» (*Zeitschrift f. wiss. Mikros.* tomo I (1884), part. 1.<sup>a</sup>, 3.<sup>a</sup> y 4.<sup>a</sup>)

Las sustancias de las dos últimas secciones son más propias para trabajos histológicos, y no se emplean en la Estación, razón por la cual tampoco me ocuparé de ellas; pues aunque se hace mucho uso del ácido ósmico, es como agente de matar y fijar, y se procura siempre, por todos los medios posibles, que no produzca efectos colorantes. Los colores de anilina tienen bastantes desventajas, y no sirven para colorar *in toto*; y, á pesar de tener el gran atractivo de la novedad, no se usan en Nápoles, á excepción de dos ó tres (pardo de Bismarck, safranina, etc.); pero los colores que verdaderamente pueden llamarse de la Estación, son el carmín, la cochinilla y la hematoxilina, sobre todo en sus fórmulas alcohólicas; pues tienen la ventaja de colorar *in toto*, diferenciar bien, ser completamente estables y dar resultados constantes, que es lo que se necesita para los estudios morfológicos.

#### Carmin.

El carmín es uno de los primeros colores que han empleado los histologistas, y aún hoy día su uso es muy general. No es soluble en el agua, y muy poco en el alcohol, y de aquí que deba siempre emplearse con otra sustancia que le sirva de disolvente. Al principio fué esta el amoniaco y luégo el ácido acético ó clorhídrico, el borax, el alumbre, etc. etc., dando lugar á una multitud de fórmulas, de las que, las más importantes, se pueden agrupar de la siguiente manera:

Como disolvente el amoniaco.—Carminato de amónio ó carmín amoniacal. (Fórmulas: Hartig, Prof. Exner, Dr. Beale, Prof. Hoyer).

Como disolvente un ácido.—Carmín acético de Schneider.

Carmín clorhídrico (Exner).

Carmín alcohólico de Grenacher y Mayer.

Como disolvente el alumbre.—Carmín-alumbre de Grenacher.

Como disolvente el borax.—Carmín borácico-alcohólico de Grenacher.

Carmín borácico-ácido de Grenacher.

Como disolvente el oxalato amónico.—Carmín oxálico de Thiersch.

Si á esta lista se añade la mezcla del carminato amónico con el ácido pícrico, que forma el picro-carminato amónico, estarán representadas las diversas formas bajo las cuales se emplea comunmente el carmín. Tal vez un examen razonado y comparativo haría desaparecer alguna de ellas, por dar idénticos resultados que el de otras, más ese examen no sé que se haya hecho aún.

En la Estación de Nápoles se usa muchísimo el carmín borácico-alcohólico, para colorar *in toto*, y el picro-carminato amónico; y en algunos casos solamente las otras soluciones de carmín de Grenacher. A pesar de eso, indicaré sus fórmulas por lo que puedan convenir, pues en muchos casos será preciso usar una tintura neutra, ácida ó básica, acuosa ó alcohólica, y ninguno de los colores que

hoy se emplean se presta tanto como el carmín á esas diferentes combinaciones.

El carmín se fija principalmente en las sustancias protoplásmicas, y sobre todo en los núcleos; y cuando por medio de un líquido decolorante se lavan las secciones, son siempre estos últimos los que se resisten más á perder el color. La propiedad selectiva de los diversos tejidos para tomar más ó menos carmín es bien marcada, y usándolo de un modo conveniente se obtienen coloraciones perfectamente diferenciadas. El carmín ácido es el que diferencia ménos. Otra ventaja grande del carmín es su gran estabilidad, ya se monten los cortes en glicerina ú otros líquidos acuosos, ó bien en bálsamo de Canadá.

El carmín se emplea en la doble coloración con los derivados de la anilina, pero difícilmente se obtienen mejores resultados que con el picro-carminato, al que casi no pueden ponerse otros inconvenientes que la necesidad de usarlo siempre en solución acuosa.

1. *Carmin amoniacal*.—El amoniaco es muy buen disolvente del carmín, formándose un carminato de amónio; pero al mismo tiempo, en estado libre, ataca fuertemente los tejidos animales. Transforma las sustancias albuminóideas en albuminatos alcalinos (Exner), que son solubles en un exceso de amoniaco, sucediendo muchas veces, si el carmín es alcalino, que disuelve enteramente las secciones; y tratándose de objetos muy delicados, basta para eso que sea pequeñísima la cantidad de álcali libre. A mí me ocurrió, al hacer unas preparaciones de

los glóbulos nucleados de la sangre del *Triton marmoratus*, emplear para la doble coloración un carmín que tenía por completamente neutro, y á los tres ó cuatro días, después de haber cerrado las celdillas, encontré que la membrana (?) de los glóbulos había sido completamente disuelta, y la preparación se había convertido en una sustancia granujienta, formada casi exclusivamente por los núcleos. Por eso es preciso, al preparar el carmín amoniacoal, tener mucho cuidado de que en la solución haya sólo la cantidad exclusivamente necesaria para disolver el carmín, combinado con él en forma de carminato.

No describiré los distintos medios que se han propuesto para preparar el carmín, encaminados todos ellos á obtener la solución completamente exenta de álcali libre, y sí sólo el procedimiento que el Profesor H. Hoyer ha dado á conocer recientemente.

Disuélvase un gramo de carmín en una mezcla de 1—2 centímetros cúbicos de fuerte solución de amoniaco, y 6—8 centímetros cúbicos de agua; y póngase en un baño de arena hasta que todo el amoniaco libre se haya evaporado. Esto se conoce teniendo en cuenta que mientras haya amoniaco libre se desprenderán *burbujas grandes*, y el color de la solución será rojo cereza algo morado; y que cuando el amoniaco libre se haya evaporado del todo, las *burbujas serán pequeñas*—proviniedo de la descomposición del carminato—y al mismo tiempo se formará un precipitado de color rojo de fuego. Cuando esto ocurra se dejará enfriar, y luego se fil-

tra. El precipitado es de carmín, que puede emplearse para cualquier otro uso. La solución queda de esta manera en estado de servir; y con el fin de que no se altere con el transcurso del tiempo, se le añade el 1 ó 2 por 100 de hidrato de cloral. Si se deseara una solución alcohólica, puede mezclarse con 4—6 veces su volumen de alcohol, teniendo en cuenta que, cuanto más fuerte sea éste, ménos carmín contendrá. El precipitado que en este caso se forma es de carminato de amónio, soluble en el agua.

La fórmula del Dr. Beale no viene á ser otra cosa que el carmín amoniacal mezclado con glicerina, y es más útil á los histólogos que para los trabajos de morfología. El modo de prepararlo se encuentra en casi todos los tratados de histología, y por eso excuso ponerlo aquí.

2. *Carmín acético.*—Se disuelve toda la cantidad que se pueda de carmín en ácido acético hirviendo (de 45 por 100), se filtra luégo, y se diluye al 1 por 100 para el uso (Schneider).

El carmín acético diferencia ménos bien que las otras fórmulas.

3. *Carmín alcohólico.*—El Dr. P. Mayer ha modificado la fórmula de Grenacher, con objeto de que sirva para colorar también las secciones dispuestas en serie, por el procedimiento de la albúmina, que se describirá más adelante. Cuatro gramos de carmín se disuelven, al baño de maría, durante media hora, en 100 centímetros cúbicos de alcohol de 80 por 100, al que se hayan añadido 30 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La solución

se filtra en caliente, y se neutraliza con algunas gotas de amoniaco, hasta que empiece el carmín á depositarse.

Esta solución tiñe rápidamente y con intensidad, pero de un modo difuso; y para que produzca buena diferenciación, es preciso decolorar luégo con alcohol ácido.

4. *Carmín alumbre de Grenacher.*—A una solución acuosa de alumbre común ó amoniacal de 1—5 por 100 (también puede llegarse á la saturación) se añade el  $\frac{1}{2}$  á 1 por 100 (cantidad *ad libitum* según Tangl) de carmín pulverizado, y se hace hervir durante 15 ó 20 minutos. Luégo se filtra; y para conservarla es bueno poner un poco de hidrato de cloral, tymol ó ácido fénico.

Después de teñidas las secciones, deben lavarse con agua.

El carmín-alumbre es una de las soluciones que tienen más selección por los núcleos; y en su uso no hay que temer la coloración por exceso, aunque se dejen las secciones en el líquido colorante por un día entero ó más. Por lo general, bastarán 5 ó 10 minutos para que tomen un hermoso rojo, tirando algo á púrpura, y queden los tejidos bien diferenciados. Puede también usarse la solución diluída.

5. *Carmín borácico-alcohólico.*—A una solución acuosa de borax al 4 por 100 se le añade toda la cantidad de carmín que pueda disolver en caliente. Luégo se mezcla esta solución con un volumen igual de alcohol de 70 por 100, y después de dejarla reposar por 24 horas se filtra (Grenacher).

En la Estación se usa mucho el carmín borácico para colorar *in toto*. El tiempo que debe estar el objeto es variable, según su tamaño y naturaleza, desde tres ó cuatro horas á 24 ó más. Los animales revestidos de una cubierta *chitínosa* se dejan á veces penetrar difícilmente, y este inconveniente puede remediarse por medio del calor, manteniendo el líquido á una temperatura de 40° á 50° C. mientras dura su acción. Casi siempre convendrá colorar un poco por exceso, y después lavar con alcohol de 35 por 100, al que se haya añadido una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (3—4 gotas por cada 100 centímetros cúbicos); y cuando se haya obtenido el grado de coloración conveniente se cambia el alcohol por otro más fuerte, y así gradualmente hasta llegar al endurecimiento necesario.

El Dr. Mayer prepara esta solución de carmín de modo que resulte con el 50, 60 y 70 por 100 de alcohol. Esta última contiene muy poco carmín, pero conviene para aquellos objetos delicados que podrían experimentar deterioro introduciéndolos en una solución muy acuosa. El alcohol hirviendo de 50 á 60 por 100, disuelve el 1 por 100 de carmín, é igual cantidad de borax. Inútil es decir que los lavados deben hacerse con alcohol del mismo grado que la solución.

6. *Carmín borácico-ácido de Grenacher*.—Una solución acuosa de borax al 1—2 por 100, y  $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$  por 100 de carmín, se calienta hasta que éste se haya disuelto del todo, y luégo se añade ácido acético, gota á gota, hasta que tome un color rojo vivo.

Se deja reposar 24 horas, y se filtra ó se decanta.

Esta solución no debe emplearse para colorar *in toto*. Las secciones en  $\frac{1}{3}$ —3 minutos habrán tomado color, pero difusamente; más un lavado con alcohol de 50 á 70 por 100, al cual se hayan añadido unas gotas de ácido clorhídrico (3—4 por 100 centímetros cúbicos) las decolorará, excepto los núcleos, que aparecerán de esta manera bien de manifiesto.

7. *Carmin oxálico de Thiersch.*—*a.)* Se disuelve una parte en peso de carmín, en una parte de amoniaco y tres de agua.

*b.)* Se disuelve una parte de ácido oxálico en 22 de agua.

*c.)* Un volumen del líquido *b)* se mezcla con 12 de alcohol absoluto.

*d.)* Un volumen del líquido *a)* se mezcla con ocho del líquido *c)* y se filtra.

La solución debe tomar el color anaranjado por la adición de algunas gotas de ácido oxálico, y volverse violeta por el amoniaco.

8. *Picro-carminato de amonio.*—Ranvier introdujo en la histología animal este reactivo, que tiene también su empleo en la vegetal; y sus resultados son tan excelentes, que es hoy día una de las sustancias colorantes más usadas. Sus efectos están fundados en las opuestas propiedades del carmín y del ácido pícrico, teniendo el uno gran selección por los núcleos y materia protoplásmica, mientras que el otro se fija de preferencia en las paredes de las celdillas, fibras etc., y de aquí sus efectos de doble coloración.

Ranvier no dió la fórmula precisa del picro-carminato, limitándose á indicar las siguientes direcciones para prepararlo. A una solución amoniacal de carmín, añádase una solución concentrada de ácido pírico hasta la saturación, y luégo evapórese en una estufa hasta que el líquido quede reducido á  $\frac{1}{5}$  parte; fíltrese y evapórese de nuevo hasta la sequedad. Para el uso, disuélvase una parte en peso del residuo seco, en 100 de agua.

El punto de saturación del carmín por el ácido pírico es bastante indeterminado, y la preparación larga y complicada, por lo que la mayor parte de micrógrafos compran el picro-carminato ya; pero como el que se vende raras veces reúne todas las condiciones necesarias, conviene preparárselo uno mismo. El procedimiento del Dr. Mayer, que es el más sencillo que conozco, y el que se usa en la Estación, es el siguiente:

*a.)* Se prepara una solución de carminato de amonio, mezclando dos gramos de carmín en polvo con 25 centímetros cúbicos de agua y el amoniaco necesario para que el carmín se disuelva. Con objeto de que se desprenda todo el amoniaco libre, el Doctor Mayer deja la solución en un vaso abierto, de boca ancha, por espacio de algunas semanas; pero también puede emplearse, y lo creo preferible, el procedimiento del profesor Hoyer, descrito al tratar del carmín amoniacal.

*b.)* Un volumen de la solución *a)* se mezcla con cuatro de una disolución concentrada de ácido pírico; y para que el líquido no sufra alteración, se

ponen en el frasco unos cuantos cristales de tymol ó unas gotas de hidrato de cloral (1 por 100). La adición del ácido pícrico debe cesar desde el momento que se forme un precipitado.

Según el profesor Hoyer se obtiene también muy buen picro-carmín, mezclando el carminato de amonio que se forma al preparar el carmín amoniacal alcohólico, con una disolución concentrada de ácido pícrico.

El procedimiento del Dr. Mayer, que acabo de describir, difiere de todos los demás en los que se trata de seguir estrictamente las indicaciones de Ranvier, y tiene en su favor la mayor sencillez; y sus resultados están garantidos por el largo tiempo que se usa en la Estación. En el Laboratorio anatómico de la Universidad de Cornell (Estados-Unidos de América) se han hecho varias y minuciosas experiencias para determinar el mejor modo de preparar el picro-carminato, siguiendo las indicaciones de Mr. Ranvier, y los resultados obtenidos, según los expone Mr. Gage en el *American monthly microscopical Journal* (año 1880), son los siguientes:

1. Partes iguales, en peso, de ácido pícrico y carmín, dan los mejores resultados.
2. El ácido pícrico debe disolverse en cien veces su peso de agua, usando el calor si es necesario.
3. El carmín debe disolverse en cinco veces su peso de fuerte disolución amoniacal.
4. Mézclense las dos soluciones. Parece indiferente verter la una en la otra ó *vice-versa*.

5. Empléense evaporadores de porcelana y embudos de cristal.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando las soluciones fueron hechas á la temperatura ordinaria del laboratorio—17° C.—y luégo evaporadas las tres cuartas partes á la temperatura de 40°—45° C. Después de fría la solución debe filtrarse con un filtro doble. El líquido filtrado se evaporará hasta la sequedad á 40° C., ó á la temperatura ordinaria. Si la preparación ha sido bien hecha, una parte en peso se disolverá en 100 de agua, quedando un líquido transparente después de filtrado.

Luégo propone Mr. Gage la siguiente mezela:

Picro-carmín.....	100	centímetros	cúbicos.
Glicerina.....	25	»	»
Alcohol de 95 por 100.....	10	»	»

que se conserva indefinidamente, con sólo filtrarla cada cinco ó seis meses.

Otras fórmulas para preparar el picro-carmín han sido dadas por Rutherford (*Practical Histology*), el Dr. Weigert (*Arch. path. Anat.*, LXXXIV, 1881), y el Dr. Frank (*Am. Month. Micr.*, v, 1884). (1)

Los objetos, después de teñidos con el picro-carmín, deben lavarse bien con agua, teniendo presente, para regular el tono de color, que el carmín no es soluble, sobre todo el fijado por los núcleos, y

---

(1) En la *Biologie Cellulaire* de Mr. Carnoy, he visto descrito otro procedimiento para preparar el picro-carmín, que es el que se usa en el laboratorio de la Universidad de Lovaina (página 92, nota 4.<sup>a</sup>)

el ácido pírico sí, aunque en pequeña cantidad.

El picro-carmín no es muy á propósito para colorar *in toto*, y por esta razón su uso no es tan general en la Estación como el del carmín borácico, pero, á pesar de eso, da en algunos casos excelentes resultados, y el Dr. Lang lo emplea de preferencia para colorar las Planarias.

#### Cochinilla.

La cochinilla se usa comunmente por los histólogos en solución acuosa, según las fórmulas de Czokor y Klein; y para evitar sus inconvenientes, el Dr. Mayer ha propuesto la tintura, que es la única que se emplea en la Estación.

1. *Tintura de cochinilla del Dr. Mayer.*—Un gramo de cochinilla pulverizada se pone en digestión, por espacio de varios días, en 8—10 centímetros cúbicos de alcohol de 70 por 100, y luégo se filtra. Cuanto más diluido esté el alcohol, tanto mayor será la intensidad de la tintura; pero en cambio su poder de penetración—cosa muy importante cuando se quiere colorar *in toto*—será menor, y por lo tanto debe atenderse á estas dos propiedades opuestas. El Dr. Mayer cree que quedan lo suficiente equilibradas con el alcohol de 70 por 100.

Tiene aplicación esta tintura en todos aquellos casos que no convenga emplear una solución acuosa, y tiene la ventaja sobre las alcohólicas de carmín (carmín borácico, carmín alcohólico etc.) que por lo general tiñe bien los objetos que hayan sido tra-

tados por el ácido crómico—no por el ósmico—pero en cambio sus efectos no son tan constantes. El color que comunica á los tejidos cambia según su naturaleza, la de las sales que tengan en suspensión y el tratamiento anterior á que hayan sido sometidos. Los ácidos le comunican un color amarillo, mientras que los álcalis la hacen pasar á púrpura; pero el cambio más notable lo experimenta con las sales solubles en alcohol, que originan un precipitado azul ceniciento, verde ceniciento ó azul negruzco. Por eso muchas veces los tejidos presentan estos colores, pues es sabido que por más cuidado que se ponga, nunca se llega á desembarazarles de las sales que tienen en estado vivo. Estas coloraciones sólo se presentan en ausencia de los ácidos y en presencia de las sales. En los demás casos, el color es siempre rojo; pero según el mismo doctor Mayer dice, es imposible saber el color que en definitivo un determinado tejido tomará, pues ocurre que en un mismo objeto presentan, con la misma tintura, dos diferentes colores.

Otra cosa particular pasa con la cochinilla, y es que según el tanto por 100 del alcohol que se emplee, se disuelven tales ó cuales principios que son insolubles en un alcohol de distinto grado; y por eso siempre que se añada á la tintura alcohol que no sea enteramente igual al que sirvió para hacerla, se forma un precipitado. Esta circunstancia hay que tenerla muy presente al lavar los objetos después de teñidos, sobre todo si se quisiera hacer bajar el tono del color; pues si se emplea alcohol de diferente

grado, en lugar de disolver los distintos principios de la cochinilla, servirá para fijarlos más.

Para teñir los objetos con la cochinilla deberán lavarse bien ántes con alcohol de 70, y si se sospechase que el alcohol pudiese haber determinado la formación de una costra de sales, según se ha dicho al tratar de esta sustancia como líquido de matar, se empleará el alcohol ácido, procurando luégo quitar hasta las últimas trazas de ácido por medio de lavados con alcohol.

La tintura debe usarse en abundancia, y es muy variable el tiempo necesario para que produzca una buena coloración, no habiendo inconveniente en prolongarlo por algunos días con los objetos grandes, aunque en este caso es preferible emplear la hematoxilina, que colora más intensamente, ó bien el borax-carmin. Colorados ya los objetos se lavan con alcohol de 70, y si hubiese exceso de coloración, se le añadirá el  $\frac{1}{10}$  por 100 de ácido clorhídrico, ó el 1 por 100 de acético.

2. *Solución de cochinilla de Czokor.*—(Las fórmulas de Czokor y Klein vienen á ser iguales, por lo ménos tal como se encuentran en el «Journal of the Royal Microscopical Society» correspondiente á los años 1881 y 1882; pero la de Czokor ha sido publicada un año ántes.)

Se disuelve el 1 por 100 de alumbre calcinado, é igual cantidad de cochinilla, en agua destilada, y luégo se hace hervir hasta que quede reducido á los cuatro séptimos. Filtrese, y añádanse unas gotas de ácido fénico.

### Hematoxilina.

La hematoxilina y la hematina son los dos principios colorantes del palo campeche, pero sólo el primero se usa en microscopia. La coloración azulada ó violeta que produce, es más agradable que la del carmín, pero sus resultados no son tan fijos. Puede emplearse en solución acuosa ó alcohólica, y esta última, según la fórmula de Kleinenberg, es la única que tiene uso en la Estación.

1. *Hematoxilina de Kleinenberg.*—*a.)* A una solución saturada de cloruro de calcio en alcohol de 70 por 100, se añade alumbre hasta la saturación y se filtra.

*b.)* Un volúmen del líquido *a)* se mezcla con 6—8 volúmenes de alcohol de 70 por 100.

*c.)* Al tiempo de usarse se vierte en el líquido *b)* algunas gotas de una tintura concentrada de hematoxilina en alcohol absoluto, hasta que tome la intensidad de color que se desee.

Una buena solución debe presentar un color de violeta tirando algo al azulado. Si después de algún tiempo de preparada se pusiera ligeramente roja, indica que contiene ácido libre, y no debe usarse. Para evitar que eso suceda conviene no preparar más que la cantidad que se vaya á usar; pero en caso de necesidad puede remediarse destapando el frasco, y poniéndolo debajo de una campana de cristal junto con otro de amoniaco. Entonces el amoniaco se apodera del ácido libre; pero debe te-

nerse en cuenta que si se prolonga demasiado su acción, se formará un precipitado, en cuyo caso debe desecharse.

El cloruro de calcio que entra en la composición de esta fórmula, no tiene más objeto que aumentar la acción osmótica entre el líquido colorante, y el alcohol que contienen los tejidos del objeto; pero como al poner el alumbre en la solución *a)* se forma un precipitado de sulfato de calcio, para evitarlo propone Mr. Whitman sustituirlo por el cloruro de aluminio.

La hematoxilina tiñe rápidamente y con intensidad, y da muy buenos resultados para colorar *in toto*. Puede usarse diluída con el líquido *a)* cuando los objetos son pequeños, y produce una coloración muy diferenciada. Antes de teñir los objetos, es preciso lavarlos bien con alcohol de 70, para que no contengan nada de ácido, pues según las experiencias del Dr. Mayer, es lo que produce el color amarillo ó amarillo parduzco que á veces toman las secciones, y que ha hecho decir que la acción de la hematoxilina no era constante. Según el Dr. Cook, el mismo efecto producen los cromatos alcalinos. Después de teñidos los objetos ó secciones se lavan con alcohol de 70—90 por 100; y si se hubiese producido una coloración por exceso, lo mismo que en los casos anteriores, podrá servirse del alcohol ácido ( $\frac{4}{3}$  por 100 de ácido oxálico ó clorhídrico) suspendiendo su acción enseguida que se note que el color enrojece, y pasándolo al alcohol ordinario en donde volverá á tomar el azul violeta.

2. *Solución acuosa de hematoxilina.*—*a.)* En 10 centímetros cúbicos de agua se disuelven 35 centigramos de hematoxilina.

*b.)* Se disuelven tres gramos de alumbre en 30 centímetros cúbicos de agua.

*c.)* A la solución *a)* se le añaden algunas gotas de la solución *b)*.

Esta solución debe tener un bonito color de violeta, y es una de las que mejor diferencia los núcleos.

#### Colores de anilina.

En la Estación de Nápoles tienen un uso muy limitado, y el Dr. Mayer no es partidario de ellos. Efectivamente, presentan inconvenientes reales, como son por ejemplo, su poca estabilidad—excepto el pardo de Bismarck—el no ser á propósito para colorar *in toto*, y dar resultados muy inconstantes, de modo que sus efectos no se pueden predecir con la seguridad que se hace tratándose del carmín ó de la hematoxilina, pero así y todo, no creo sean bastantes inconvenientes para abandonarlos por completo.

El moderno estudio de las Bacterias mucho ha contribuído á poner en moda estos colores, y basta para convencerse de ello hojear algunos números de cualquiera de las publicaciones periódicas de Microscopia; y también se verá la poca constancia en sus efectos, y las opiniones contradictorias sobre sus propiedades.

El empleo de los colores de anilina es sumamente sencillo. Unos son solubles en agua, y otros en alcohol. Basta, pues, hacer una solución de intensidad conveniente según se quiera colorar lenta ó rápidamente, y luego lavar la sección con agua ó alcohol, teniendo en cuenta que el color no queda fijado, sino que va disolviéndose á medida que el lavado se prolonga, hasta decolorarse por completo en algunos casos. Por eso es muy importante detener el lavado en un punto conveniente, y tratar enseguida el corte por la esencia de clavo y el bálsamo del Canadá. Según Giesbach el verde de yodo (verde Hoffmann) es uno de los colores que más se fijan en los tejidos, y mejor resisten el lavado alcohólico.

Como es muy útil, para servirse de los colores de anilina, conocer su mayor ó menor solubilidad en el agua ó alcohol, á continuación la indico de los principales colores, según el Dr. Harris. (Quart. Jour. Micr. Sci., xxiii, 1883.)

*Color pardo.*—Bismarck—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol débil.

Vesubina—soluble en agua.

Chrisoidina—soluble en agua.

*Color rojo.*—Eosina—muy soluble en agua.

Anilina escarlata—insoluble en agua; soluble en alcohol.

Flamingo (rojo pardo oscuro)—en parte soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol.

Ponzó (rojo carmesí oscuro)—en parte soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol diluído.

(Este color es una mezcla de rosanilina y fosfina.)

Rosanilina—parcialmente soluble en agua; fácilmente soluble en alcohol diluido.

Fuchsina—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol diluido.

*Color anaranjado.*—Aurina.—insoluble en agua; parcialmente en alcohol fuerte, y algo más en alcohol absoluto.

Anilina anaranjada—insoluble en agua; parcialmente en alcohol fuerte, y algo más en alcohol absoluto.

Tropæolina—parcialmente soluble en agua; más soluble en alcohol.

Fosfina (amarillo anaranjado)—parcialmente soluble en agua; más soluble, pero no del todo, en alcohol.

Safranina—soluble en agua y en alcohol.

*Color amarillo.*—Fluorecina (amarillo verdoso)—insoluble en agua; soluble en alcohol con un hermoso color fluorescente.

Anilina primavera (*Primula*)—sólo en parte soluble en alcohol.

*Color verde.*—Verde de yodo (verde Hoffmann, verde azulado)—soluble en agua y en alcohol.

Verde malaquita—soluble en agua y en alcohol.

*Color azul.*—Azul soluble de anilina—enteramente soluble en agua.

Azul de Lyon—insoluble en agua; soluble en alcohol fuerte.

Azul metilo (azul muy oscuro)—soluble en agua y en alcohol.

Azul China—soluble en agua y en alcohol.

*Color violeta.*—Violeta Hoffmann—soluble en agua y en alcohol.

Violeta metilo (Violeta de París)—parcialmente soluble en agua; soluble en alcohol.

Violeta de genciana—soluble en agua y alcohol.

Azul Tiria (muy próximo al violeta)—soluble en agua.

Púrpura de Spiller—soluble en alcohol.

En esta lista sólo figuran una pequeña cantidad de los colores que da la anilina, tan numerosos hoy, que reina gran confusión, lo mismo en el conocimiento de sus propiedades, que en su composición y nombre. Por eso, si nos atreviésemos á dar un consejo, diríamos que lo mejor y más seguro es procurarse unos cuantos colores, estudiarlos prácticamente bajo el punto de vista microquímico y no salirse de ellos. Así lo he hecho en cuanto se refieren á las secciones vegetales, y limitándome á cinco ó seis, logro usarlos con bastante seguridad.

Los colores de anilina pueden emplearse combinados para producir la doble y triple coloración. Para ello se siguen varios métodos, y uno de los más prácticos es el de Gibbes, que por lo ménos en los cortes vegetales, da casi siempre buenos resultados. Consiste en teñir primero la sección con una disolución alcohólica, y después de bien lavada, con una acuosa. El todo está en elegir bien los dos colores, para lo que servirá la lista que acabo de

poner. Por ejemplo: para la solución alcohólica puede emplearse la rosanilina ó el violeta de metilo, parcialmente solubles en agua, y para la acuosa el azul soluble ó el verde de yodo. De esta manera, los tejidos que no hayan tenido gran selección por el color alcohólico podrán tomar el acuoso, y efecto de sus distintas solubilidades, en lugar de perjudicarse, contribuirán á fijarse más el uno al otro. El Dr. Stirling propone, con objeto de fijar bien el color alcohólico, lavar las secciones, ántes de introducir las en la solución acuosa, con agua acidulada con ácido acético ó clorhídrico. (1 por 100).

Para obtener una doble ó triple coloración, se ha propuesto: por el Dr. Stirling el uso simultáneo del picro-carmín y de varios colores de anilina, especialmente del verde de yodo; del picro-carmín, verde de yodo y verde de malaquita, por Mr. Richardson; del picro-carmín y la eosina, por el Dr. Lang; de la hematoxilina y la eosina, por Mr. Renant; del cloruro de oro y varios colores de anilina, por el Dr. Gibbes, etc., etc.; y en la literatura, al final de este capítulo, se indican las citas en donde podrán verse descritos esos procedimientos.

Otra propiedad que ha dado importancia á los colores de anilina es la selección de la mayor parte de ellos por los núcleos, selección que tienen también el carmín y la hematoxilina. El *modus operandi*, debido á Flemming, consiste en lo siguiente:

- a.) Se endurecen los objetos en ácido crómico.
- b.) Se lavan bien con agua.

c.) Se lavan con alcohol y se coloran enseguida. Al principio el color predilecto era la safranina, más luégo se ha visto que otros varios producen el mismo efecto. Flemming recomienda además, el rojo de Magdala y el violeta dahalia, preparados de esta manera:

Una parte de safranina, ú otro color, se disuelve en 100 de alcohol absoluto, y después de algunos días se mezcla con 200 partes de agua.

d.) Después de teñidos los cortes se lavan con alcohol de 70 por 100, y luégo con alcohol absoluto, hasta que la coloración haya desaparecido de todas partes, excepto de los núcleos, sirviéndose del microscopio para determinar ese punto.

La predilección de estos colores por los núcleos—excepto la eosina y algún otro—hace que se empleen con ventaja en el estudio de los Schizomicetos. Los colores más convenientes para los *Micrococcus*, según Weigert, son los siguientes:

Color rojo.—Todos los rojos, y especialmente la purpurina, fuchsina y el rojo de Magdala. (También los preparados de carmín).

Color amarillo.—Safranina.

Color verde.—Verde de metilo.

Color azul y violeta.—Verde de yodo, de metilo, dahalia y violeta de genciana. (También la hematoxilina).

Color pardo.—Pardo de Bismarck.

Para los *Bacillus*, ni la hematoxilina ni el carmín sirven, y ningún color da tan buenos resultados como el violeta de genciana.

Finalmente, y para terminar, indicaré las combinaciones que el Dr. Harris encuentra mejores para la doble coloración de los corpúsculos nucleados de la sangre, pues las mismas podrán servir para teñir las secciones; debiendo tenerse presente que sólo operando en idénticas condiciones se obtendrán iguales resultados, y aún así nunca con la seguridad que con el carmín y la hematoxilina.

Rosanilina y verde de anilina.

Fuchsina y azul de metilo.

Fuchsina y pardo Bismarck.

Eosina y vesubina.

Verde de yodo y pardo Bismarck.

Violeta Hoffmann y pardo Bismarck.

Violeta de anilina y azul de metilo.

Literatura referente á los procedimientos de coloración:

Dr. Mayer, *M. T. Zool. Stat. Neap.*, II (1880), p. 1-27.—Dr. Whitman, *Amer. Nat.*, XVI (1882), p. 772.—Prof. H. Hoyer, *Biol. Centralbl.*, II (1882), p. 17-19.—Prof. Exner, *Guide dans l'examen microscopie*, p. 45-46.—Schneider, *Zool. Anzeig.*, número 56.—Grenacher, *Arch. Mik. Anat.* XVI (1879), p. 463.—Prof. Gage, *Am. month. Micr. Jour.*, 1880, p. 22.—Rutherford, *Practic. Histology*.—Prof. C. Weigert, *Arch. path Anat.* (Virchow) LXXXIV (1881), p. 275.—J. Czokor, *Zool. Jahresbericht Neap.*, I (1880), p. 42.—Klein, *Mag. Nat. Hist.*, VIII (1881), p. 232.—Dr. Cook, *Jour. Anat. and Phys.*, XIV (1879), p. 140.—Dr. Harris,

*Quart. Jour. Micr. Sci.*, xxii (1883), p. 292.—H. Gibbes, *Jour. Roy. Micr. Soc.*, III (1880), p. 291.—Dr. Stirling, *Jour. Anat. and Phys.*, xv (1881), p. 349.—Mr. Renant, *Comptes Rendus*, LXXXVIII (1879), p. 1.039.—Wills Richardson, *Jour. Roy. Micr. Society.*, 1881, p. 868.—Flemming, *Arch. f. Mik. Anat.*, XIX (1881).

D.—PROCEDIMIENTOS PARA SECCIONAR Y MONTAR LAS SECCIONES.

Después de muerto un animal, fijados sus tejidos, disecada la parte que se quiera examinar—caso de que no sea todo él—y teñido según los procedimientos y en las condiciones que quedan indicadas, viene ahora el hacer su examen microscópico; mas para ello es preciso ponerle en condiciones á propósito, pues, como ya he dicho, rarísimos son los casos en que un animal se puede observar directamente. Por regla general hay que cortarle en secciones planas muy delgadas, y examinar cada una de ellas; y no se crea que constituye ésto un inconveniente del examen microscópico, pues es el mismo método general que seguimos también en el macroscópico, siempre que queremos hacernos cargo de la verdadera forma de un objeto. No es pues solamente porque no hay otro medio de examen por lo que se reduce á secciones, sino porque es el único modo de conocer su estructura. Las Diatomeas, por ejemplo, se pueden examinar enteras, y, no obstante, hasta que se han obtenido secciones de algunas de ellas no se ha tenido el perfecto conoci-