



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

TEMA: MICROTECNICAS BOTANICAS

Los métodos histológicos para estudiar los reinos vegetal y animal, no varían mucho, en ambos se siguen los siguientes pasos:

- Observación en vivo.
- Observación en fresco, utilizando colorantes vitales.
- Observación en tejidos fijados y teñidos.

La manera más simple de acondicionar un material para su observación con microscopio óptico es la obtención de preparados frescos sin colorear.

PREPARADO FRESCO:

Es aquel donde el material ha sido recién separado del organismo al que pertenecía. Su duración es muy limitada porque no se lo trata con ningún agente de conservación. Esto mantiene las estructuras celulares funcionando en condiciones normales pero por un lapso breve. Posteriormente la célula muere y se descompone.

Para realizar un preparado fresco sólo necesita colocar las células en un medio osmótico adecuado. Para las células vegetales se puede usar simplemente agua.

Con esta técnica se pueden observar estructuras celulares como por ejemplo: pared, núcleos, cloroplastos.

En el caso de los vegetales, se facilita estudiarlos en vivo y frescos por la presencia de la pared celulósica que cubre las células y que conserva su estructura por un determinado tiempo.

Cuando queremos conservar un preparado por largo tiempo, el principal inconveniente es la alteración progresiva de las células separadas del organismo vivo. Siguiendo una serie de pasos se obtiene un preparado histológico definitivo.

FIJADORES:

La fijación es una operación destinada a matar las células lo más rápido posible y conservarlas en el estado más parecido al que tenían mientras estaban vivas.

Fijadores:

FAA (formol-aceto-alcohólico).

CRAFF III

FARMER

Formulación del FIJADOR FAA (Formol Aceto Alcohólico)

- Alcohol etílico 96°.....50 ml.
- Agua destilada.....35 ml.
- Formol.....10 ml.
- Acido acético glacial..... 5 ml.

SERIE DE ALCOHOLES

Tabla de dilución según Gay Lussac (Langeron, 1949). A 100 ml. de alcohol 96° se debe agregar la siguiente cantidad de agua destilada:

| Alcohol a obtener | cc de agua a agregar |
|-------------------|----------------------|
| 30° | 227,70 |
| 40° | 147,22 |
| 50° | 98,15 |
| 60° | 64,92 |
| 70° | 40,85 |
| 80° | 22,45 |
| 90° | 7,73 |



REALIZACION DE CORTES:

Los cortes de objetos cilíndricos (tallos, raíces, etc.) pueden realizarse en los siguientes sentidos:

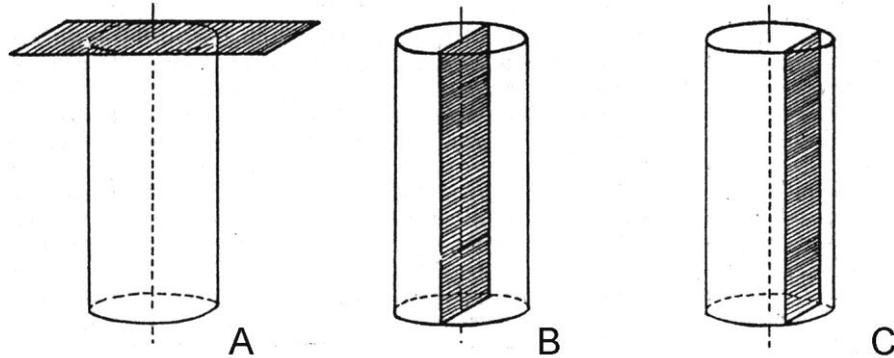


Figura 1: A: corte transversal; B: corte longitudinal radial; C: corte longitudinal tangencial

CORTES A MANO LIBRE:

Se hacen cuando se desea observar algo rápidamente y sin mucho detalle ya que el espesor que se logra pocas veces es menor de 20 μm . El material a cortar puede ser fresco o conservado. Los cortes se realizan con hoja de afeitar o navaja.

Técnica para realizar el corte a mano libre:

- Tomar un trozo de médula de hinojo o raíz de zanahoria, de una longitud aproximada de 2 cm.
- Cortar en sentido longitudinal por el centro, dejando la base entera y colocar el material a cortar entre ambos semicilindros.
- Sostener con una mano y con la otra deslizar perpendicularmente una hoja de afeitar nueva, cortando como si todo fuera una unidad. Es conveniente mantener húmeda la superficie a cortar.
- Recoger los cortes en vidrio de reloj con agua destilada.
- Seleccionar los cortes más delgados bajo lupa.

DIAFANIZANTES:

Dejan el material en condiciones tales que a través de ellos puede pasar la luz. Dicha transparencia permite ver por ej. la vascularización en hojas y flores. Los diafanizantes más empleados son **Hidrato de cloral - Hidróxido de sodio**.

El reactivo clarificante por excelencia es el hipoclorito de Na, que elimina contenidos celulares.

COLORANTES:

Un colorante es una sustancia que posee color y es capaz de cederlo al combinarse con otra. Los colorantes pueden ser:

Básicos: son selectivos para estructuras nucleares y paredes celulares lignificadas.

Ácidos: son ligeramente selectivos para estructuras citoplasmáticas y paredes celulares no lignificadas.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

Coloraciones generales:

- 1. Directas:** por inmersión del material en el baño colorante: Safranina.
- 2. Indirectas:** el material necesita de un mordiente para que el colorante pueda actuar. Ej. de mordientes: **carbonato de Na al 2%, cloruro de bario al 2%**.
- 3. Combinadas:** se emplean varios colorantes ya sea en forma sucesiva o combinada:
 - a) Combinada sucesiva:** cada colorante actúa por su propia cuenta y se fija a un elemento determinado, ej. safranina-verde rápido.
 - b) Combinada simultánea:** se mezclan los colorantes y luego se realiza la coloración del material ej. Carmín-verde Mirande.

Coloraciones específicas: para teñir:

- **Paredes celulósicas:** Hematoxilina-Azul de anilina-Fucsina Ácida.
- **Paredes lignificadas:** Safranina-Violeta Cristal.
- **Paredes cutinizadas:** Safranina-Verde Iodo.
- **Paredes intermedias:** Hematoxilina férrica-Rojo Neutro fresco.
- **Cromosomas:** Hematoxilina férrica-Safranina-Violeta Cristal.

Coloraciones vitales: no afectan la vida de la célula. Ej: Rojo Neutro y Verde Jano.

Modo de preparación de los colorantes para la coloración directa con safranina 1.) y la coloración combinada sucesiva 3.a)

• **SAFRANINA**

Se expende en polvo; fraccionamiento mínimo 25 gr. Se emplea en soluciones alcohólicas, saturadas o no, en alcohol etílico 80°.

También en soluciones hidroalcohólicas: se prepara safranina al 1% en alcohol etílico 96° y se diluye la cantidad preparada 4 veces en agua destilada.

• **VERDE RAPIDO**

Llamado comúnmente "fast-green". Se usa en soluciones saturadas de alcohol etílico absoluto. Fraccionamiento mínimo 10 gr.

Técnica para realizar la coloración directa con safranina

- 1- Clarificar** los cortes con hipoclorito de Na al 50% hasta que se observen blancos o casi transparentes (según el material).
- 2- Lavar** varias veces con agua destilada (5-6 veces).
- 3- Pasar** por alcohol 70%.
- 4- Colorear** con safranina diluida al 1% durante 2-5 minutos.
- 5- Lavar** con agua destilada.

MONTAJE:

Montar un material para obtener un preparado microscópico, consiste en ubicarlo entre un portaobjeto y un cubreobjeto, en un medio tal que sea apropiado para la conservación del mismo.

Los medios de montaje pueden ser:

- a) Líquidos: glicerina.
- b) Sólidos: gelatina-glicerina,
- c) bálsamo de Canadá .

Medio de montaje **GELATINA-GLICERINA**

Gelatina sin sabor.....25 gr.
Agua destilada.....150 ml.
Glicerina.....175 ml.
Cristales de fenol.....3,5 gr.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

Preparación:

Disolver la gelatina a baño María en el agua destilada agitando con varilla de vidrio (2 hs). Agregar la glicerina (15 min.) y los cristales de fenol.

Colocar en frascos de boca ancha y dejarlos destapados. La mezcla se solidifica al enfriarse y las burbujas de aire subirán a la superficie. Si quedaran muchas burbujas conviene desechar la porción superior y luego volver a fundir a baño María, para fraccionarla en tubos de ensayo. En cada tubo dejar una varilla de vidrio permanente.

MACERACION DE TEJIDOS

Las células de un tejido están unidas entre sí por pectato de calcio y magnesio, constituyendo lo que se denomina laminilla media. Esta laminilla media puede destruirse por medio de soluciones maceradoras (proceso denominado maceración) o por medio de la enzima pectinasa. En ambos casos se produce la separación individual de las células constituyendo los macerados. Se emplean generalmente para estudios de maderas las que se cortan en trocitos pequeños como si se sacara punta a un lápiz.

METODO DE JEFFREY:

- a) Pequeños trozos del material a macerar se colocan en un recipiente de vidrio que contenga una mezcla en partes iguales de ácido crómico al 10% y ácido nítrico al 10%. La mezcla se realiza en el momento de usar.
- b) Tapar el recipiente y colocar en la estufa a 35-40°C hasta que el material se ablande (generalmente 24-36 hs). Si el material está duro dejarlo varios días en la estufa, cambiando el líquido macerador 1 a 2 veces.
- c) Lavar cuidadosamente varias veces con agua destilada.
- d) Colocar el material sobre un portaobjetos, aplastar suavemente con una aguja y agregar una gota de
- e) safranina diluida.
- f) Escurrir el excedente y montar con gelatina glicerinada.
- g) El material macerado se puede conservar en alcohol de 50° en recipiente bien tapado.

METODO DE SCHULTZE:

- a) Coloque los trozos de material en vaso de precipitado, agregue unos pocos cristales de clorato
- b) de potasio y vierta en el vaso 2 ml de NO_3H concentrado.
- c) Caliente bajo campana ya que se desprenden vapores tóxicos de cloro.
- d) Apenas iniciada la reacción química debe interrumpirse el tratamiento para evitar la destrucción total del material. Esto se logra vertiendo en el vaso agua destilada fría, cuando el material se torna blanco lechoso.
- e) El tratamiento debe prolongarse durante 1-2 min. (Depende del material).
- f) Idem 3, 4, 5 y 6 método anterior.

METODO DE BOODLE: Es el método más rápido y menos drástico.

- a) Hervir el material con Hidróxido de Potasio al 10% (5-10'), lavar bien con agua destilada.
- b) Colocar el material así tratado en un tubo de ensayo con ácido crómico al 25% durante 30-60' o más si es necesario.
- c) Retirar cuando al pinchar el material tenga consistencia semejante a la manteca.
- d) Idem 3, 4, 5 y 6 del primer método.



TECNICAS PARA OBTENCION DE EPIDERMIS FOLIAR

PEELING

- 1- Tomar una hoja de la especie que se desea estudiar e introducir la aguja histológica por debajo de la epidermis.
- 2- Levantar un trozo pequeño, tomarlo con pinza de puntas finas y tirar hasta desprenderlo.
- 3- Montar este trocito sobre un portaobjetos con una gota de glicerina al 50% cuidando que la superficie exterior de la epidermis quede hacia arriba.
- 4- Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio, si los ostíolos de los estomas se ven negros, es porque quedó aire en ellos. En este caso, retirar el cubreobjetos, agregar más glicerina y calentar suavemente a la llama hasta que se desplacen las burbujas. Si con esto no se logra un buen resultado, pasar la epidermis por alcohol 96°.
- 5- Colorear con safranina diluida durante 5 minutos en el mismo portaobjetos.
- 6- Volcar el excedente. Enjuagar con agua destilada.
- 7- Volcar el excedente y agregar una gota de gelatina-glicerina.
- 8- Deslizar el cubreobjetos. Dejar secar.

METODO DE JEFFREY (Utilizar la mezcla de Jeffrey diluida con agua destilada al 50%).

- 1- Colocar en una caja de Petri la mezcla de Jeffrey diluida.
- 2- Agregar la hoja cortada en trozos.
- 3- Tapar y dejar 12 a 48 horas según la textura de la hoja. La solución atacar al mesófilo, cuando se observa que ya no quedan restos de éste, volcar la mezcla y lavar varias veces el material.
- 4- Colocar el material sobre portaobjetos con una gota de glicerina al 50%.
- 5- Cortar con hoja de afeitar los bordes de la hoja que están adheridos para poder separar así ambas epidermis ayudándose con pinza y agujas.
- 6- Colorear sobre el mismo portaobjetos con safranina.
- 7- Observar al microscopio óptico para asegurarse que ambas epidermis, superior e inferior queden con la superficie externa hacia arriba.
- 8- Montar con gelatina-glicerina.

RASPADO. TECNICA DE METCALFE

- 1- Colocar sobre un portaobjetos un trozo de hoja con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo.
- 2- Raspar suavemente la superficie con una hoja de afeitar.
- 3- Colocar sobre ella unas gotas de solución concentrada de hipoclorito de sodio, dejar actuar 15'.
- 4- Raspar nuevamente con la hoja de afeitar la epidermis y el mesófilo procediendo con mucha suavidad al acercarse hacia la epidermis próxima al portaobjetos.
- 5- Agregar una gota de hipoclorito y con un pincel de escobilla plástica eliminar el resto de mesófilo que pudiera quedar.
- 6- Lavar 5-6 veces con agua, la penúltima vez con agua y 2 ó 3 gotas de amoníaco y la última con agua destilada. Estos lavados se pueden hacer en el mismo portaobjetos utilizando una pipeta o pipeta gotero.
- 7- Observar al microscopio para cerciorarse que no hayan quedado burbujas.
- 8- Colorear y montar como en los métodos anteriores.

TECNICA DE HIDROXIDO DE POTASIO AL 3%

- 1- Preparar una solución de hidróxido de potasio al 3%.
- 2- Colocar la solución en un vaso de precipitado y agregar la hoja cortada en trozos. La cantidad de solución es suficiente, si cubre holgadamente el material.
- 3- Tapar el recipiente y hervir durante 10 a 30' según la textura de la hoja.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

- 4- Lavar bien varias veces.
- 5- Colocar sobre un portaobjetos un trozo de hoja con la epidermis que se desea estudiar hacia abajo.
- 6- Trabajar bajo lupa separando con la aguja histológica y un pincel la epidermis que quedó hacia la parte superior y el mesófilo.
- 7- Agregar una gota de agua para ayudar a retirar con el pincel los restos de mesófilo.
- 8- Pasar el trozo de epidermis ya limpio a otro portaobjetos de modo tal que la parte superior de la epidermis quede hacia arriba.
- 9- Colorear y montar como en los métodos anteriores. Si el material es muy tenue, reducir los tiempos y trabajar con una solución de hidróxido de potasio al 1%.

DIAFANIZADO

Técnica de Dizeo de Strittmater:

1. Colocar el material fresco o previamente fijado en un vaso de precipitado con alcohol 96° y llevar a ebullición durante 10 min.
2. Pasar a una solución de alcohol 96° e hidróxido de Na. al 5% en partes iguales. Llevar a ebullición durante 5 a 10 min., según la consistencia del material.
3. Hacer varios lavados hasta que el agua quede totalmente limpia.
4. Pasar el material lavado a agua destilada y realizar 2 cambios.
5. Introducir en una solución de hipoclorito de Na. al 50% y dejar hasta que se torne transparente. El tiempo requerido ser desde unos pocos min. a 1 hora, dependiendo del material y, por lo tanto se deberá observar permanentemente.
6. Pasar a agua destilada y hacer 5 cambios de 3 min. cada uno.
7. Colocar en hidrato de cloral (5 gr. en 2 ml. de agua destilada). durante 5 a 10 min. como mínimo para quitarle opacidad. El material podrá permanecer sin dañarse en esta solución todo el tiempo que transcurra hasta su observación directa o su coloración y montaje definitivo.

Coloración: Para colorear la nervadura, realizar los siguientes pasos:

1. Colocar el material en alcohol 70° durante 10 min.
2. Pasarlo a una solución saturada de safranina en alcohol 80° hasta que se observe el xilema completamente teñido de rojo (15 min. aproximadamente).
3. Quitar el exceso de colorante con alcohol 80° durante 5 min.
4. Alcohol 70° durante 5 a 10 min.
5. Alcohol 50° durante 5 a 10 min.
6. Lavar con agua destilada 5 min.
7. Montar con una gota de gelatina glicerinada.

Montaje en gelatina - glicerinada:

1. Colocar a baño María un tubo de ensayo que contenga gelatina- glicerinada y una varilla de vidrio.
2. Cuando la gelatina- glicerinada esté líquida dejar caer una gota, con la varilla de vidrio, sobre un portaobjeto perfectamente limpio.
3. Ubicar el material sobre la gota ayudándose con una pinza de puntas finas o aguja histológica.
4. Pasar ligeramente por la llama suave para que la gelatina- glicerinada se mantenga líquida y evitar así la formación de burbujas.
5. Deslizar suavemente un cubreobjetos, limpio y seco. Dejar secar.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

6. Quitar el excedente de gelatina- glicerizada solidificada que haya quedado en los bordes del cubreobjetos, raspando con una hoja de afeitar.
7. Limpiar con tela de algodón humedecida en agua.

TECNICAS PARA OBTENCION DE DISGREGADOS DE ORGANOS

Se trata de técnicas sencillas que pueden brindar una gran cantidad de información, por lo que se aconseja su empleo. Se las denomina “**Técnicas de Disociación**”, mediante las cuales se obtienen los disgregados de órganos. Éstos están constituidos por **células sueltas**, salvo las epidérmicas, por cuanto poseen la cutícula que las mantiene unidas.

Fundamento:

Los métodos de disociación tienen en común la **destrucción de la laminilla media** (que une las células de un tejido entre sí) por medio de soluciones disgregantes.

Métodos:

- Disociación leve o debil
- Disociación fuerte

DISOCIACION LEVE

Este procedimiento esta especialmente indicado para el análisis de **hojas, tallos herbáceos y cortezas**. Los cristales se conservan, no así, los almidones.

Técnica:

Se coloca en un vaso de precipitación x 30 ml una pequeña porción del material vegetal.
Se agregan 10 ml de solución al 5 % de NaOH.
Se lleva a ebullición durante 5 min.
Se enfría y se filtra por papel de filtro de velocidad media.
Se coloca el material retenido sobre un portaobjetos con una gota de agua.
Se coloca el cubreobjetos.
Se termina de disgregar ejerciendo presión sobre el cubreobjetos, cuidando de no romperlo.
Se observa al microscopio.

DISOCIACION FUERTE:

Este es el método de elección para el análisis de **leños** u otros materiales en que las células de paredes gruesas están unidas entre sí y se las quisiera separar, (por ejemplo, **tegumentos de semillas** o **endocarpios esclerosados**- carozos-). No se conservan cristales ni almidones.

Técnica:

Se coloca en un vaso de precipitación x 30 ml una pequeña porción del material vegetal. Se agregan 10 ml de solución al 10 % de KOH.
Se lleva a ebullición durante 10 min.
Se enfría y se filtra.
Se lava el material retenido en el filtro con agua destilada.
Se coloca el material de nuevo en el vaso de precipitación, que también fue lavado, y se agregan 10 ml de solución al 25 % de ácido crómico.
Se deja actuar el reactivo a temperatura ambiente un tiempo no inferior a 30 min.
Se prueba la consistencia del material vegetal. Si se considera que está lo suficientemente blando, se prosigue:
Se filtra por papel de filtro de velocidad media.
Se coloca una pequeña porción del material retenido en el papel sobre un portaobjetos.
Se agrega una gota de agua.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

Se coloca el cubreobjetos.

Se termina de disgregar ejerciendo presión sobre el cubreobjetos, cuidando no romperlo.

Se observa al microscopio.

TECNICAS PARA REALIZAR PRUEBAS HISTOQUIMICAS

Las pruebas microquímicas se pueden realizar tanto con material fresco como de herbario y aún conservado, siendo preferible al estado fresco.

a.- Para detectar almidón (Reactivo de Lugol):

Fundamento:

Los almidones cuando son tratados con solución yodo iodurada se tiñen de color azul ó azul violáceo (a veces muy oscuro, casi negro) por formación de un compuesto de inclusión del yodo con las moléculas de amilosa, que es el polisacárido lineal que interviene en la composición del almidón. Si no existiera la amilosa, la amilopectina, que es un polisacárido ramificado, se tiñe de color rojizo.

Reactivo:

Solución de Lugol (se aconseja diluirla convenientemente 1:2, 1:3).

Técnica:

1. Colocar el corte en el portaobjeto.
2. Montar en agua, colocar el cubreobjetos y agregar una gota de lugol junto al margen del cubreobjetos para que difunda por capilaridad.
3. El almidón adquiere coloración azul violácea intensa.

b.- Para detectar grasas y aceites (Reactivo Sudán III o Sudán IV):

Fundamento:

Los lípidos se colorean de rojo con el reactivo Sudán III ó Sudán IV

Reactivos:

1. solución saturada de Sudán III ó Sudán IV en alcohol 80.
2. Alcohol 70.

Técnica:

1. Colocar el material en cortes delgados sobre el portaobjeto.
2. Agregar una gota de reactivo y dejar actuar durante 10 minutos. El sudán se emplea en soluciones alcohólicas saturadas (alcohol etílico 80). Filtrar siempre en el momento de usar.
3. Lavar rápidamente con alcohol 70. Las grasas y los aceites se tiñen de rojo como así también la cutina y suberina.

c.- Para detectar lignina (Prueba de floroglucina clorhídrica):

Fundamento:

La lignina se tiñe de color rojo al ser tratada con una solución de floroglucina en presencia de HCl.

Reactivos:

1. solución de floroglucina al 1% en alcohol 96
2. Ácido clorhídrico al 25 %



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

Técnica:

1. Colocar el material sobre el portaobjetos y agregar una gota de la floroglucina en solución alcohólica.
2. Colocar el cubreobjetos y flamear suavemente.
3. Retirar de la llama y colocar por el borde del cubreobjeto una gota de ácido clorhídrico al 25 %, al ponerse en contacto con las paredes con lignina se colorea de rojo violáceo.

d.- Para detectar mucílagos (Azul de cresil al 1%):

Fundamento:

Los mucílagos son de fácil reconocimiento en cortes de materiales frescos por su carácter viscoso y tratados con azul de cresil dan una coloración azul Francia.

Reactivos:

azul de cresil al 1 %

Técnica:

1. Se hacen cortes de material fresco (hoja de aloe) o desgarrado (de la epidermis de la semilla de lino, *Plantago* sp.) y se los coloca en un portaobjeto con unas gotas de agua para que se hinchen.
2. Absorber el agua con papel de filtro y agregar una gota de reactivo. Los mucílagos dan una coloración azul Francia.

e.- Para detectar alcaloides (Ácido pícrico)

Fundamento:

Los alcaloides con el ácido precipitan dando sales cristalinas características, del picrato correspondiente al alcaloide.

Reactivos:

Ácido pícrico

Técnica:

1. Colocar el material en una caja de petri.
2. Agregar aproximadamente 3 gotas de ácido pícrico y dejar actuar.
3. Eliminar el ácido con papel de filtro y montar en agua.

f.- Para detectar resinas (solución saturada de sulfato de cobre o acetato de cobre)

Fundamento:

La resina se colorea verde esmeralda.

Reactivos:

Solución saturada de sulfato de cobre o acetato de cobre

Técnica:

1. Hacer cortes, preferentemente longitudinales, de plantas que contengan sustancias resinosas (Pináceas, Umbelíferas, Araliáceas) y colocarlas en una caja de petri.
2. Agregar unas gotas de la solución saturada de sulfato de cobre, dejar actuar unos minutos.
3. Flamear la caja de petri sobre la llama. Montar en agua.

g.- Para detectar taninos (cloruro férrico al 10 % y carbonato de sodio)

Fundamento:

Una coloración azul verdosa indica la presencia de taninos.



CÁTEDRA FARMACOBOTÁNICA APOYO TEORICO

Reactivos:

Solución acuosa de cloruro férrico al 10 %.

Solución acuosa de carbonato de sodio (al 2 % como mordiente)

Técnica:

1. Colocar los cortes de material fresco sobre un portaobjetos.
2. Agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10 % con una pequeña cantidad de carbonato de sodio.
3. Dejar actuar 2 a 3 minutos.
4. Lavar con agua destilada. Una coloración azul verdosa indica la presencia de taninos.

h.- Para detectar aleurona (Xilol)**Fundamento:**

El xilol hace muy evidente el globoide, el cristaloides no se distingue.

Reactivos:

Xilol

Técnica:

1. Ubicar el material sobre el portaobjetos (por ej. realizar un aplastado de una muy pequeña porción de semilla de ricino o de zapallo, sin la cubierta seminal).
2. Adicionar dos o tres gotas de xilol y colocar el cubreobjeto.

i.- Para detectar oxalato de calcio (ácido clorhídrico)**Fundamento:****Reactivos:**

Ácido clorhídrico

Técnica:

1. Colocar el material en el cual previamente se halla determinado la presencia de cristales (por ejemplo, cortes transversales de hoja de aloe o jaborandi) en una caja de petri.
2. Adicionar ácido clorhídrico y dejar actuar.
3. Eliminar el ácido y montar en agua.
4. El oxalato de calcio es disuelto por el ácido.

BIBLIOGRAFIA:

- D'Ambrogio de Argüeso Ana, Manual de técnicas de histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur. S.A. 1986.
- Gattuso, M. & Gattuso, J. 1999. Manual de Procedimientos para el análisis de Drogas en Polvo. U.N.R.
- Gonzalo Gaviño De La Torre. Técnicas selectas de Laboratorio y de campo.
- Farmacopea Argentina. 2002-20037º Ed. Vol I
- Instituto Argentino de Racionalización de Material. Normas IRAM Nº 37500, 37501, 37507, 37508
- Kraus, J. & M. Arduin. 1997. Manual Básico de Métodos em Morfología Vegetal. EDUR. Editora Universidad Rural. RJ. Brasil.