

DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3971>



## Método alternativo de tinción ósea en peces juveniles empleando extracto de *Bixa orellana*\*

Yeferson Andrés Moreno Guerra<sup>a</sup> ■ Tatiana María Mira López<sup>b</sup> ■ José Ariel Rodríguez Pulido<sup>c</sup> ■ Victor Mauricio Medina Robles<sup>d</sup>

**Resumen:** Actualmente el método de doble tinción empleado con rojo de alizarina y azul de alcian para tinción ósea y cartilaginosa, respectivamente, genera costos elevados en la realización de protocolos para estudios de anatomía y sistemática en vertebrados. El objetivo del presente trabajo fue comparar y analizar el colorante extraído de semillas de *Bixa orellana* con el rojo de alizarina en la tinción ósea en peces juveniles de *Piaractus brachipomus*. Se utilizaron 70 peces juveniles de  $2 \pm 0,4$  cm de longitud total, los cuales fueron sedados utilizando 2 Fenoxi-etanol a concentración final de 500 mg/L y sacrificados en conformidad con las normas y procedimientos para el uso de animales de laboratorio. Posteriormente, se sometieron a una serie de fases para la conservación del tejido. Se distribuyeron 35 peces para cada tratamiento (rojo de alizarina y achiote) y se observaron e identificaron las estructuras óseas teñidas con cada uno de los colorantes. Además, se analizó la  $I_e$  (intensidad de luz emergente) y  $D_i$  (Densidad integral) en ejemplares diafanizados para cada tratamiento. No se observaron diferencias significativas para la  $I_e$  ( $P = 0,10$ ), a diferencia de la  $D_i$  ( $p < 0,05$ ) para columna vertebral y aleta dorsal. Concluimos que el colorante de *Bixa orellana* (achiote) presenta afinidad en estructuras óseas de peces juveniles y, por tanto, es una buena alternativa para la realización de la técnica de diafanización y estudios osteológicos de vertebrados a bajo costo.

**Palabras clave:** achiote; cachama blanca; diafanización; tinción

---

\* Artículo de investigación.

- a** Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad CES. Miembro del grupo de investigación en Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (Gritox), Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Correo electrónico: yeferson.moreno@unillanos.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3013-9965>
- b** Doctora en Ciencias Biológicas – Zoología de la Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Miembro del grupo de investigación en Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (Gritox), Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Correo electrónico: tmira@unillanos.edu.co. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2278-7997>
- c** Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad de los Llanos. Miembro del grupo de investigación en Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (Gritox), Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Correo electrónico: jarodriguez@unillanos.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6735-3885>
- d** Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad de los Llanos. Miembro del grupo de investigación en Reproducción y Toxicología de Organismos Acuáticos (Gritox), Instituto de Acuicultura, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. Correo electrónico: mauriciomedina77@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4871-2715>

**Recibido:** 27 de febrero de 2019

**Aceptado:** 26 de marzo de 2020

**Disponível em linha:** 14 de agosto de 2020

**Cómo citar:** Moreno Guerra, Y. A., Mira López, T. M., Rodríguez Pulido, J. A., y Medina Robles, V. M. (2020). Método alternativo de tinción ósea en peces juveniles empleando extracto de *Bixa orellana*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(2), 35-44. DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3971>

## *Alternative Bone Staining Method in Juvenile Fish Using Bixa Orellana Extract*

**Abstract:** Currently, the double staining method for bone and cartilaginous staining using alizarin red and cyan blue, respectively, generates high costs in the implementation of protocols for anatomy and systematic studies in vertebrates. The objective of this work was to compare and analyze the dye extracted from *Bixa Orellana* seeds and the alizarin red used in bone staining in *Piaractus Brachypomus* juvenile fish. 70 juvenile fish with  $2 \pm 0.4$  cm total length were used; they were sedated using 2-phenoxi-ethanol at a final concentration of 500 mg/L and slaughtered under the standards and procedures for laboratory animals. They subsequently underwent a series of tissue conservation phases. 35 fish were allocated to each treatment (alizarin red and annatto) and bone structures stained with each dye were observed and identified. IE (intensity of emerging light) and ID (integral density) were also analyzed in diaphanization specimens for each treatment. No significant differences were observed for IE ( $P = 0.10$ ), in contrast to the ID ( $p < 0.05$ ) for the vertebral column and dorsal fin. In conclusion *Bixa Orellana* (annatto) has dying affinity in bone structures of juvenile fish and is therefore a good alternative for the diaphanization technique and osteological studies of vertebrates at a low cost.

**Keywords:** Annatto; diaphanization; staining; white cachama

## *Método alternativo de coloração óssea em peixes juvenis empregando extrato de Bixa orellana*

**Resumo:** Atualmente o método de dupla coloração empregado com vermelho de alizarina e azul de Alcian para coloração óssea e cartilaginosa, respectivamente, gera custos elevados na realização de protocolos para estudos de anatomia e sistemática em vertebrados. O objetivo do presente trabalho foi comparar e analisar o colorante extraído de sementes de *Bixa orellana* com o vermelho de alizarina na coloração óssea em peixes juvenis de *Piaractus brachypomus*. Utilizaram-se 70 peixes juvenis de  $2 \pm 0,4$  cm de longitude total, os quais foram sedados utilizando 2 Fenoxietanol com a concentração final de 500 mg/L e sacrificados em conformidade com as normas e procedimentos para o uso de animais de laboratório. Posteriormente, submetem-se a uma série de fases para a conservação do tecido. Distribuíram-se 35 peixes para cada tratamento (vermelho de alizarina e de urucum) e observaram-se e identificaram as estruturas ósseas tingidas com cada um dos colorantes. Além disso, analisou-se a IE (intensidade de luz emergente) e DI (Densidade integral) em exemplares diafanizados para cada tratamento. Não se observaram diferenças significativas para a IE ( $P = 0,10$ ), diferente da DI ( $p < 0,05$ ) para coluna vertebral e barbatana dorsal. Concluímos que o colorante de *Bixa orellana* (urucum) apresenta afinidade em estruturas ósseas de peixes juvenis e, portanto, é uma boa alternativa para a realização da técnica de diafanização e estudos osteológicos de vertebrados a baixo custo.

**Palavras-chave:** urucum; pirapitinga; diafanização; coloração

## Introducción

El colorante rojo de alizarina, tiene su origen en la raíz de la planta *Rubia tinctorum*, nativa de la India oriental y cultivada en países como España y Francia por su interés comercial en el sector de la tintorería (Derksen y Van Beek, 2002; De Santis y Moresi, 2007). El pigmento de alizarina se produce a partir de un proceso de oxidación y acidificación de la raíz de la planta (De Santis y Moresi, 2007). Actualmente, este colorante natural fue sustituido por uno sintético mediante los trabajos realizados por Graebe y colaboradores en 1869 (Prakash, 2012). Al presente, este producto sintético (rojo de alizarina) se emplea regularmente para estudios de anatomía, biología celular, sistemática y filogenia de vertebrados (Smith *et al.*, 2018). Por otro lado, el colorante de achiote (*Bixa orellana*) se ha utilizado desde hace décadas en México y en la mayoría de países de Sur América donde se encuentra distribuida esta especie, teniendo aplicabilidad en el área textil, étnico-cultural, farmacéutico, tatuajes, barniz, nutrición, industria de lácteos y saborizante para alimentos (Marzal, Romero y Sánchez, 2002; Gómez-Ortiz *et al.*, 2010; Rivera-Madrid, Aguilar-Espinosa, Cárdenas-Conejo y Garza-Caligaris, 2016). Su color amarillo-rojo, se compone principalmente de orellina (amarillo), norbixina y bixina (naranja-rojo) (Pineda, Calderón y Saldarriaga, 2003). Al igual que la alizarina en estado natural, la bixina del achiote es sensible a la luz, insoluble en agua y se degrada ligeramente a altas temperaturas ( $> 57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Pineda *et al.*, 2003; Gómez-Ortiz *et al.*, 2010). Para ambos colorantes, se emplean técnicas de extracción muy similares siendo el KOH el solvente por excelencia y el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  el agente precipitante y acidificante (Pineda *et al.*, 2003).

El uso de la metodología de la doble tinción con azul de alcian y rojo de alizarina se ha implementado comúnmente en estudios de desarrollo esquelético de peces marinos y dulce-acuícolas, entre otros vertebrados (Springer y David, 2000; Cortés-Delgado, Pérez-Torres, y Hoyos, 2009; Tamayo, Suárez, Cano, y Brayian, 2012). Actualmente, esta técnica es utilizada en estudios óseos para sistemática, anatomía y biología del desarrollo, y

se ha empleado en acuicultura en la observación de anormalidades del tejido esquelético en larvas de peces (Darias, Lan Chow Wing, Cahu, Zambonino-Infante y Mazurais, 2010; Franz-Odendaal y Adriaens, 2014; Bohórquez-Cruz, Argüello y Silva, 2017).

La técnica de diafanización presenta grandes ventajas, principalmente para biólogos, sistemáticos y taxónomos, en la caracterización de especies y diferenciación de anormalidades óseas (Kihara, Ogata, Kawano, Kubota y Yamaguchi, 2002; Soliz y Ponssa, 2016; Vieira *et al.*, 2018). Además, permite entender la ontogenia y los cambios que tienen los elementos óseos durante el desarrollo de un espécimen (Vieira *et al.*, 2018). Esta técnica, propuesta por Simons y Van Horn, (1971), Dingerkus y Uhler (1977) consiste en una serie de procesos de aclaramiento de la muestra y tinción del tejido cartilaginoso y óseo.

En algunos pasos del procedimiento de aclaramiento es común recurrir al uso de la tripsina por su capacidad lítica y digestión del músculo (Dingerkus y Uhler, 1977; Atanasoff, 2017). Sin embargo, su valor comercial es elevado y requiere concentraciones altas para llevar a cabo este proceso (Hernández-Gil, Lara-Uc y Reséndiz, 2015). Como alternativa, se utiliza papaína, acetona o KOH para el proceso de digestión del músculo en medianos y grandes vertebrados (Chappard, Alexandre, Palled y Georges, 1985; Coronado, 2014; Hernández-Gil *et al.*, 2015).

Los reactivos de mayor valor comercial en la técnica de diafanización son la tripsina y el colorante rojo de alizarina. Por tanto, la técnica de diafanización tradicional es muy costosa (Coronado, 2014; Atanasoff, 2017) y posiblemente reduzca el número de investigaciones en el área de sistemática animal u osteología, pues en estos casos se demanda mayor gasto de reactivos. Debido a lo anterior, se han presentado modificaciones en la técnica de diafanización en cuanto a los tiempos (Potthoff, 1984), concentraciones (Coronado, 2014), reactivos y empleo de los colorantes azul de alcian y rojo de alizarina, según el tipo y tamaño de la muestra (McLeod, 1980; Cortés-Delgado *et al.*, 2009; Coronado, 2014). Además, otros autores han logrado sustituir el rojo de alizarina y azul de

alcian por rojo de carmín y azul de anilina obteniendo resultados satisfactorios (Rodríguez y Algarilla, 2012; Torres y Ramos, 2016). Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue comparar y analizar las estructuras óseas de peces juveniles (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818 - como especie modelo) teñidas con colorante de *B. orellana* y rojo de alizarina.

## Materiales y métodos

### 1. Obtención del colorante

El colorante de achiote (*B. orellana*) fue extraído siguiendo la técnica de Pineda *et al.* (2003) de la siguiente manera: se utilizaron 67 g de semilla de achiote provenientes de cápsulas secas, las cuales fueron pesadas por medio de una balanza analítica (Ohaus Ep214). Posteriormente se agregaron 200 ml de KOH 2 % como solvente en relación 1: 3 (peso de la semilla: volumen de KOH 2 %) dejando actuar por 18 horas y extrayendo la solución en un vaso precipitado. Se agregó nuevamente, mitad del volumen inicial de KOH 2 % a las semillas y se agitó a 140 rpm utilizando una plancha agitadora (Ika C-mag hs7) por 45 minutos. Finalmente se mezclaron las dos soluciones. Seguidamente se adicionó a la mezcla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % hasta observar una capa grumosa, la cual se filtró por gravedad hasta obtener una masa de colorante húmeda. El residuo se llevó a un horno (Fiicsa) a temperatura de 50 °C por 24 horas. Por último, se trituró la pasta para la producción del colorante en polvo, conservándose en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

### 2. Material biológico

Se utilizaron setenta peces juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de un mismo desove y pareja reproductora en condiciones de cautiverio presentando una longitud total (LT) de  $2 \pm 0,4$  cm. Los peces se sacrificaron de conformidad con las normas y procedimientos para el uso de animales de laboratorio, descritas por el Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources

- National Research Council, USA (1996). Previamente al sacrificio, los animales fueron sedados utilizando 2 Fenoxi-etanol a concentración final de 500 mg/L. Finalmente, los peces fueron fijados en formol 10 %, manteniéndolos a temperatura promedio de  $23 \pm 0,5$  °C por cinco días. Las estructuras evaluadas para ambos colorantes fueron: cráneo, mandíbula inferior y superior, costillas, opérculo, columna vertebral, aletas anal, caudal, dorsal, pélvica y pectoral.

### 3. Preparación de los ejemplares

Antes de realizar la técnica de diafanización, todos los peces fueron eviscerados y lavados con abundante agua.

### 4. Técnica de diafanización

Para el procedimiento de aclarado y tinción ósea, se utilizó la metodología propuesta por Potthoff (1984), Springer y David (2000) y Coronado (2014) con modificaciones en la concentración y exposición de los reactivos, siguiendo las sugerencias de dichos autores para aplicar la técnica de diafanización según el tamaño y tipo de muestra. Los tratamientos se realizaron en paralelo implementando la misma técnica de diafanización como se presenta a continuación:

#### 4.1. Aclarado y tinción ósea

4.1.1. Blanqueamiento: se adicionaron 149 ml de KOH 5 % + 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % a un recipiente plástico con tapa antifuído, dejando actuar la mezcla con la muestra por tres días.

4.1.2. Lavado: se realizaron tres lavados con agua, cada uno de tres minutos.

4.1.3. Tinción ósea: se emplearon 40 ml de KOH 2 % + 0,5 g de colorante dejando actuar en la muestra por dos días.

4.1.4. Decoloración y neutralización: se empleó una solución saturada de borato de sodio dejando sumergidas las muestras por un día.

4.1.5. Conservación: las muestras se conservaron en glicerina 87 % y KOH 1 % (10:1 respectivamente).

## 5. Análisis de imágenes

En el análisis subjetivo, se eligieron variables características anatómicas susceptibles de ser analizadas, observadas y controladas, como el color, diafanización del tejido y visualización ósea. Por otro lado, para el análisis objetivo de la técnica de diafanización en ambos tratamientos, se evaluó la transparencia de cada ejemplar (llamado más adelante como “intensidad de luz emergente –  $I_e$ ”) y la Densidad integral ( $D_i$ ). Para esto, se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Devaux, Sorel y Kerdiles (1993) y Russ y Neal (2015) para la toma y análisis de imágenes mediante Image-J (acceso libre en <https://imagej.nih.gov/ij/>).

Las imágenes se tomaron con ayuda de una caja para fotografía con luminosidad blanca (12v) constante y una cámara Lumix de 16 megapíxeles configurada a una sola apertura de luz y con las mismas condiciones de programación estándar (zoom 1 x, exposición y auto *bracket* neutro). Finalmente, cada una de las imágenes digitales fueron convertidas a escala de grises de 8 bits (presentando un rango de 0 a 255 píxeles) para medir la  $I_e$  en nivel de pixel de cada ejemplar mediante la herramienta *Analyze > Analyze particle* del programa anteriormente mencionado.

Dado lo anterior, se relaciona el rango de pixel como una medida de  $I_e$ , en la que 0 corresponde al color negro y 255 al blanco. Es decir, si la intensidad de luz emergente es nula o igual al incidente ( $I_i$ ), existe 0 o 100 % de transmisión de luz respectivamente, cuantificándose en el programa Image-J en 0 y 255 píxeles correspondientemente.

Por otro lado, para medir la  $D_i$  de cada estructura ósea por tratamiento, se utilizó la herramienta *Analyze < measure < Integrated density* del programa Image-J anteriormente mencionado. La  $D_i$  hace referencia a la cantidad de partículas y suma total de la intensidad (en unidades de pixel) de estas, presentes para cada una de las estructuras óseas. Por tanto, se entiende que, a mayor número de píxeles, mayor es la densidad integral del colorante.

Los valores obtenidos del programa Image-J para cada diseño experimental, fueron compilados en formato .txt y analizados estadísticamente en R (*software* libre en <https://www.rstudio.com/>).

## 6. Diseño estadístico

### 6.1. Comparación subjetiva y análisis estadístico del $I_e$ .

Para cada tratamiento se utilizaron 35 peces tomados al azar (luego de haber sido fijados en formol) con rojo de alizarina y colorante de achiote, y fueron expuestos a una misma técnica de aclarado. Durante la etapa de tinción ósea se empleó 0,5 g de colorante para cada tratamiento. Se identificaron cada una de las estructuras teñidas con rojo de alizarina (colorante patrón) en los peces juveniles y se compararon con los ejemplares teñidos con colorante de achiote. Posteriormente, se realizó un análisis del  $I_e$  con el *software* Image-J por ejemplar diafanizado para cada tratamiento. Mediante la plataforma estadística R (*software* libre en <https://www.rstudio.com/>), se ejecutó una T-student ( $\alpha = 95\%$ ) de muestras independientes para probar diferencias entre medias del  $I_e$  de los tratamientos.

### 6.2. Análisis de densidad integral ( $D_i$ ).

Por motivos técnicos del programa Image-J para procesar todas las estructuras teñidas por imagen, se tomaron aleatoriamente trece ejemplares diafanizados de cada tratamiento y ocho estructuras seleccionadas al azar (cabeza, boca, aleta anal, aleta dorsal, aleta caudal, costillas, columna vertebral y opérculo). Se analizó mediante el *software* image-J la  $D_i$  de cada una de las estructuras óseas previamente seleccionadas.

Mediante la plataforma estadística R (*software* libre en <https://www.rstudio.com/>), se ejecutó una T-student ( $\alpha = 95\%$ ) de muestras independientes para cada una de las estructuras, para probar diferencias entre medias de la  $D_i$  de los tratamientos.

## Resultados y discusión

No se observaron diferencias en transparencia y afinidad de los colorantes a estructuras óseas. Las estructuras teñidas con rojo de alizarina (tratamiento patrón) fueron las mismas que las del tratamiento con colorante de achiote (*Bixa orellana*) (ver Figura 1).



Por otro lado, el  $\Delta I$  en las muestras diafanizadas no fue estadísticamente significativo entre los colorantes (T student,  $P > 0,05 = 0,10$ ), presentando una media y desviación estándar ( $\Delta I$ ) del rojo de alizarina y colorante de achiote de  $170,03 \pm 15,3$  y  $175,91 \pm 13,68$  pixeles, respectivamente (ver Figura 2). Asimismo, el análisis comparativo de la  $\Delta I$  de cada colorante en las 8 estructuras óseas previamente seleccionadas no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), a excepción de la columna vertebral y aleta dorsal ( $p < 0,05$ ) (ver Tabla 1).

Evidentemente, para la técnica de coloración ósea, la calidad del colorante de achiote no presentó diferencias con la coloración tradicional del rojo de alizarina. Además, con respecto a los costos del colorante, producir 25 g de polvo de achiote, estos oscilan entre los 15.000 y 20.000 COP (aproximadamente 5 a 7 USD). Por el contrario, de acuerdo con el laboratorio Merck en 2019, (Merck, 2019) 25 g de rojo de alizarina fluctúan por encima de 395.000 COP (132 USD). Lo cual indica que el uso de colorante de achiote en la técnica de diafanización minimiza los costos presupuestales para la realización de estudios osteológicos.

Sin embargo, es necesario resaltar que el colorante rojo de alizarina es mucho más intenso que el del achiote, posiblemente porque la alizarina comercial es un producto liofilizado o sintético, haciéndolo mucho más concentrado. No obstante, no se observaron diferencias significativas de  $\Delta I$  entre tratamientos para cada una de las estructuras, a excepción de la columna vertebral y aleta dorsal. Sin embargo, se ha demostrado que, sin importar la intensidad del colorante, el achiote presenta buena resolución para la evaluación de caracteres morfológicos óseos.

Como se mencionó al principio, el colorante de achiote tiene actualmente diversas aplicaciones en la industria de alimentos, especialmente en la tinción de quesos (fábrica *cheddar*) obteniéndose coloración naranja-rojo. Por lo anterior, nosotros suponemos que la bixina presenta interacción con fuentes de calcio presentando el color característico naranja-rojo. Sin embargo, no podemos descartar posibles interacciones de la bixina con otros compuestos químicos como también lo es el rojo

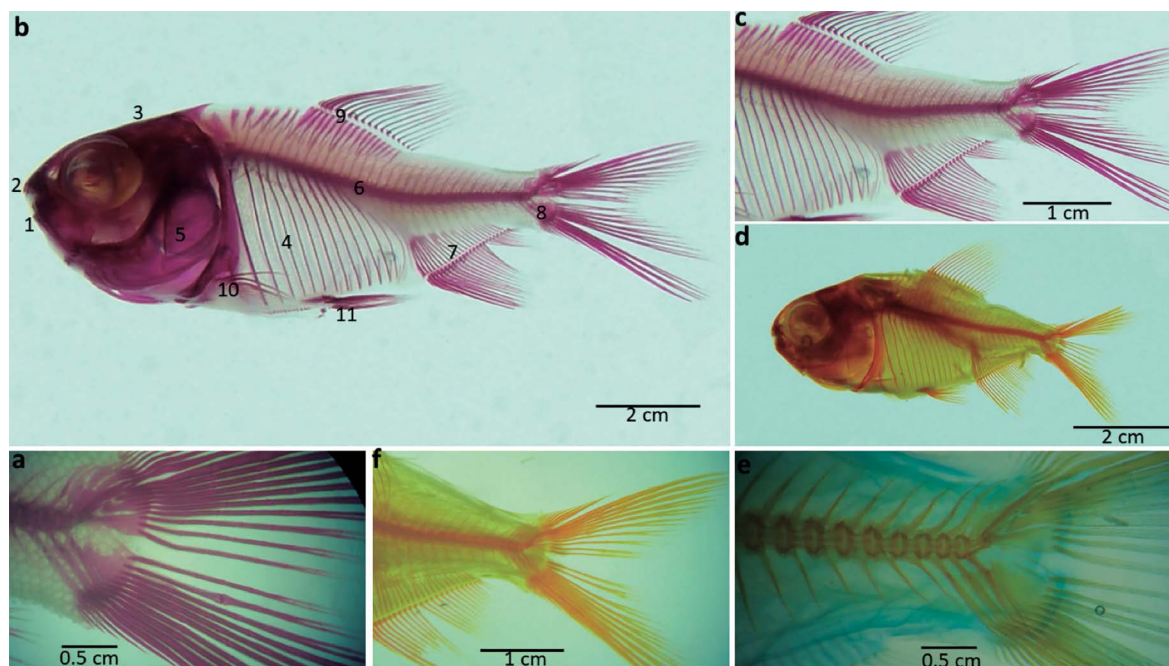
de alizarina, presentando interacción con sales de Ca y fuentes de Al, Sr, Ba, Sn, Zn, Cu, Mg, Fe, etc. (Holde, Susan, Meloan y Mary, 1969).

Por otro lado, este estudio consistió en comparar y analizar ambos colorantes en la técnica de diafanización usando ejemplares de *P. brachypterus* en cautiverio destinados a la producción cárnica y venta comercial.

Los resultados de este estudio pueden promover nuevas investigaciones en acuicultura para la evaluación y análisis de malformación ósea presentes en larvas de peces (lordosis y escoliosis, generalmente); además, las dietas suministradas a individuos reproductores en cautiverio pueden influenciar en la calidad de gametos y por ende en los procesos de desarrollo embrionario - larval y juvenil (Cahu, Zambonino y Takeuchi, 2003; Bohórquez-Cruz *et al.*, 2017; Labbé, Robles y Herreraez, 2017; Kriton *et al.*, 2018). También, es claro que los cambios ambientales y comportamiento alimenticio influyen sobre la expresión genética y fenotípica de los individuos (Adams, Woltering y Alexander, 2003; Amaral *et al.*, 2014), siendo considerada la epigenética un campo de estudio muy importante en peces para evaluar y demostrar dichos efectos sobre la metilación del ADN y expresión génica (Labbé *et al.*, 2017; Anastasiadi, 2018). Por tanto, las técnicas que involucran el uso de datos morfológicos de los individuos no son ampliamente usadas debido a la plasticidad fenotípica, lo cual hace que los caracteres evaluados no siempre puedan ser generalizados (Gracian-Negrete, González-Acosta, González-Isáis, Ortiz-Galindo y Del Moral-Flores, 2012; Mantiñan, 2011).

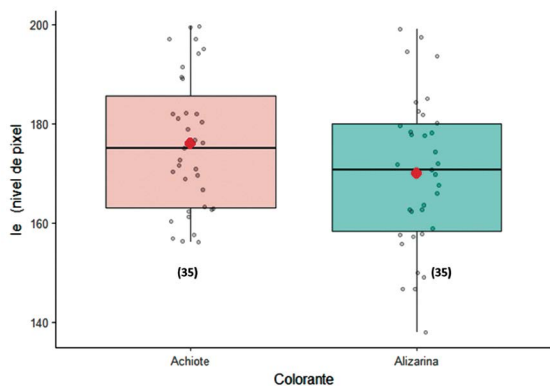
Técnicamente, se sugiere el uso de tripsina o alguna otra enzima digestiva en lugar del KOH para el proceso de aclarado en especímenes muy pequeños (< 1 cm de longitud); debido a la propiedad corrosiva del KOH, estos son degradados.

Finalmente, se recomienda no reutilizar las soluciones de KOH y  $H_2O_2$ , utilizados en ejemplares medianos y grandes, debido a que, en cada proceso de blanqueamiento y coloración, los reactivos pueden reducir la concentración o actividad química, prolongando el tiempo de cada fase.



**Figura 1.** Coloración ósea en peces juveniles de *Piaractus brachyomus*, empleando rojo de alizarina (a-c) y colorante de achiote (d-f). Las estructuras teñidas por rojo de alizarina fueron similares a las del colorante de *Bixa orellana*, a saber: mandíbula inferior y superior (1 y 2), cráneo (3), costillas (4), opérculo (5), columna vertebral (6), aleta anal (7), aleta caudal (8), dorsal (9), aleta pectoral (10) y aleta pélvica (11).

**Fuente:** elaboración propia.



**Figura 2.** Intensidad de luz emergente ( $I_e$ ) analizada en pixeles para muestras de peces juveniles de *P. brachyomus* teñidas con colorante de achiote y rojo de alizarina. Punto rojo indica la media de la muestra y puntos grises el valor de  $I_e$  de cada espécimen. Valor numérico entre paréntesis es el tamaño de muestra. La  $I_e$  para colorante de alizarina y achiote fue de  $170,03 \pm 15,3$  y  $175,91 \pm 13,68$  () pixeles, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0,05= 0,10$ ).

**Fuente:** elaboración propia.

**Tabla 1.** Densidad integral (pixel) para muestras de peces juveniles de *P. brachyomus* teñidas con colorante de achiote y rojo de alizarina

Estructura	Rojo de Alizarina (pixel)	Colorante de Achiote (pixel)	$\alpha = 0,05$
<b>Cabeza</b>	$1.387,888 \pm 662,573$	$980,108 \pm 532,888$	$p = 0,097$
<b>Boca</b>	$141,284 \pm 72,671$	$89,940 \pm 71,321$	$p = 0,092$

<b>Aleta anal</b>	1.152,574 ± 480,640	1.147,535 ± 272,806	p = 0,97
<b>Aleta dorsal</b>	1.110,040 ± 317,853	671,641 ± 179,292	p < 0,002
<b>Aleta caudal</b>	1.319,869 ± 462,838	1.297,047 ± 392,548	p = 0,893
<b>Costillas</b>	3.999,422 ± 1714656	3.721,607 ± 1003385	p = 0,613
<b>Columna vertebral</b>	369,817 ± 206,733	136,322 ± 84,254	p = 0,002
<b>Opérculo</b>	707,505 ± 345,765	468,878 ± 226,630	p = 0,050

**Fuente:** elaboración propia.

*Nota:* se analizaron ocho estructuras óseas a cada individuo (n = 13) y para cada tratamiento, siendo un diseño aleatorio. Los resultados reportados corresponden a la media ± desviación estándar ( $\bar{x} \pm s$ ).

## Conclusiones

El colorante de *B. orellana* presenta afinidad en estructuras óseas de peces juveniles de *P. brachyomus*, y puede ser una alternativa en la técnica de diafanización y posteriores estudios osteológicos a bajo costo.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al laboratorio de Química de la Universidad de los Llanos y funcionarios, por su servicio en la prestación de materiales y reactivos. Al Fondo Social de Educación Superior (FSES) de la Gobernación del Meta por el apoyo de manutención del joven investigador Yeferson Moreno y a la empresa piscícola Aquaprimavera Ltda. por aportarnos los ejemplares de *P. brachyomus* para este estudio.

## Referencias

- Adams, C. E., Woltering, C., y Alexander, G. (2003). Epigenetic regulation of trophic morphology through feeding behaviour in Arctic charr. *Salvelinus alpinus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 78(1), 43-49. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00126.x>
- Amaral, C. L., Crisma, A. R., Masi, L. N., Martins, A. R., Hirabara, S. M., y Curi, R. (2014). DNA Methylation Changes Induced by a High-Fat Diet and Fish Oil Supplementation in the Skeletal Muscle of Mice. *Lifestyle Genomics*, 7(4-6), 314-326. DOI: <https://doi.org/10.1159/000381777>
- Anastasiadi, D. (2018). Influencias intrínsecas y del medio ambiente sobre la metilación del ADN y la expresión génica en peces. *Revista Aquatic*, 0(48), 17-19. Recuperado de <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/324>
- Atanasoff, A. (2017). Elaboration of transparent biological specimens for visualisation of developing cartilage and bone. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(1), 27-32.
- Bohórquez-Cruz, M., Argüello-Guevara, W., y Silva, A. (2017). Cranial osteological development and abnormalities in northern palm ruff, *Seriolella violacea* (Guichenot, 1848), larvae and juveniles. *Aquaculture Research*, 48(2), 624-632. DOI: <https://doi.org/10.1111/are.12909>
- Cahu, C., Zambonino, J., y Takeuchi, T. (2003). Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227(1-4), 245-258. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)
- Chappard, D., Alexandre, C., Palled, S., y Georges, R. (1985). Permanent preservation of whole alizarin red s skeletons by clearing and embedding in polyester resins. *Stain Technology*, 61(3), 145-149. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520298609110724>
- Coronado J. (2014). *Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Cortés-Delgado, N., Pérez-Torres, J., y Hoyos, J. M. (2009). Staining Procedure of Cartilage and Skeleton in Adult Bats and Rodents. *International Journal of Morphology*, 27(4), 1163-1167. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-95022009000400032>
- Darias, M. J., Lan Chow Wing, O., Cahu, C., Zambonino-Infante, J. L., y Mazurais, D. (2010). Double staining protocol for developing European sea bass



- (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(2), 280-285. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01421.x>
- De Santis, D., y Moresi, M. (2007). Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. *Industrial Crops and Products*, 26(2), 151-162. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.02.002>
- Derksen, G. C. H., y Van Beek, T. A. (2002). *Rubia tinctorum* L. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26, 629-684. doi: [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(02\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(02)80016-3)
- Devaux, F., Sorel, Y., y Kerdules, J.F. (1993). Simple measurement of fiber dispersion and of chirp parameter of intensity modulated light emitter. *Journal of Lightwave Technology*, 11(12), 1937-1940. doi: <https://doi.org/10.1109/50.257953>
- Dingerkus, G., y Uhler, L. D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Biotechnic and Histochemistry*, 52(4), 229-232. doi: <https://doi.org/10.3109/10520297709116780>
- Franz-Odendaal, T., y Adriaens, D. (2014). Comparative developmental osteology of the seahorse skeleton reveals heterochrony amongst *Hippocampus* sp. and progressive caudal fin loss. *EvoDevo*, 5(1), 45. doi: <https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-45>
- Gómez-Ortiz, N. M., Vázquez-Maldonado, I. A., Pérez-Espadas, A. R., Mena-Rejón, G. J., Azamar-Barrios, J. A., y Oskam, G. (2010). Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94(1), 40-44. doi: <https://doi.org/10.1016/J.SOLMAT.2009.05.013>
- Gracian-Negrete, J. M., González-Acosta, A. F., González-Isáis, M., Ortiz-Galindo, J. L., y Del Moral-Flores, L. F. (2012). Osteología Comparada del Esqueleto Caudal de *Achirus lineatus* y *Achirus mazatlanus* (Pleuronectiformes: Achiridae). *International Journal of Morphology*, 30(2), 705-708. doi: <https://doi.org/10.4067/s0717-95022012000200058>
- Hernández-Gil, Y., Lara-Uc, M., y Reséndiz, E. (2015). Comparación de técnicas de diafanización para la observación de estructuras óseas de crías de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1824) (Reptilia, Cheloniidae). *Ciencia y Mar*, 24(56), 19-27.
- Holde, P., Susan, N., y Meloan, M. S. T. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red stains for calcium. *Histochemistry and Cytochemistry*, 17(2), 110-124. doi: <https://doi.org/10.1177/17.2.110>
- Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota, I., y Yamaguchi, R. (2002). Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212(1-4), 149-158. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00871-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00871-7)
- Kriton, G., Dimitra, K., Corraze, G., Jaume, P. S., Adorjan, A., y Zsuzsanna, J. S. (2018). Impact of Diets Containing Plant Raw Materials as Fish Meal and Fish Oil Replacement on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*), and Common Carp (*Cyprinus carpio*) Freshness. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-14. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/1717465>
- Labbé, C., Robles, V., y Herraes, M. P. (2017). Epigenetics in fish gametes and early embryo. Recent Adv. fish gametes embryo. *Aquaculture*, 472, 93-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.026>
- Mantianian, J. (2011). *Sistemática y distribución de peces de la subfamilia Cheirodontinae (Teleostei: Characiformes: Characidae) de la Argentina*. (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Marzal, M. M., Romero, C., y Sánchez, J. (2002). La religión entre los Chayahuita católicos de la Amazonia. En M. Marzal, C. Romero, y J. Sánchez (Eds.), *La religión en el Perú al filo del milenio* (pp. 381-407). Lima: Fondo Editorial PUCP.
- McLeod, M. J. (1980). Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology*, 22(3), 299-301. doi: <https://doi.org/10.1002/tera.1420220306>
- Merck. (2019). Rojo de Alizarina S, sal monosódica (C.I. 58005) CAS 130-22-3 | 106278. Merck. Recuperado de [http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Alizarin-red-S-mono-sodiumsalt-C.I.-58005,MDA\\_CHEM-106278#overview](http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Alizarin-red-S-mono-sodiumsalt-C.I.-58005,MDA_CHEM-106278#overview)
- Pineda, J., Calderón, D., y Saldarriaga, L. (2003). Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (*Bixa orellana*). *Revista Universidad EAFIT*, 39(131), 8-22. doi: <https://doi.org/Vol.39.No.131>
- Potthoff, T. (1984). Clearing and staining Techniques. En *Ontogeny and systematics of fishes: based on an international symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom* (pp. 35-37). Lawrence: Allen Press Inc.
- Prakash, K. (2012). *Indigo Plantations and Science in Colonial India*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y., y Garza-Caligaris, L. E. (2016). Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1406. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01406>

- Rodríguez, F. R., y Algarilla, D. G. (2012). Diafanización: Técnica modificada por solución rojo de carmín. *Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. Primera jornada científica de la cátedra Santiago Ramón y Cajal*. San Juan Argentina.
- Russ, J. C., y Neal, F. B. (2015). *The Image Processing Handbook (7 edition)*. Boca Raton: CRC Press.
- Simons, E. V, y van Horn, J. R. (1971). A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica*, 8(4), 281-292.
- Smith, W. L., Buck, C. A., Ornay, G. S., Davis, M. P., Martin, R. P., Gibson, S. Z., y Girard, M. G. (2018). Improving Vertebrate Skeleton Images: Fluorescence and the Non-Permanent Mounting of Cleared-and-Stained Specimens. *Copeia*, 106(3), 427-435. DOI: <https://doi.org/10.1643/CG-18-047>
- Soliz, M., y Ponssa, M. L. (2016). Development and morphological variation of the axial and appendicular skeleton in hylidae (Lissamphibia, Anura). *Journal of Morphology*, 277(6), 786-813. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmor.20536>
- Springer, V. G., y David Johnson, G. (2000). Use and Advantages of Ethanol Solution of Alizarin Red S Dye for Staining Bone in Fishes. *Copeia*, 2000(1), 300-301. DOI: [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2000\)2000\[0300:UAAOES\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2000)2000[0300:UAAOES]2.0.CO;2)
- Tamayo, L. J., Suárez, P. A., Cano, A. I., y Brayian, L. (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique □ Modelo didáctico del desarrollo embrionario del pollo usando la técnica modificada de Dawson para transparentación y tinción Modelo didáctico d. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(4), 620-624.
- Torres, M., y Ramos, E. (2016). A New Method for Staining Ligaments and Tendons of Small Vertebrates. *Copeia*, 104(3), 708-711. DOI: <https://doi.org/10.1643/OT-14-174>
- Vieira, L. G., Lima, F. C., Mendonça, S. H. S. T., Menezes, L. T., Hirano, L. Q. L., y Santos, A. L. Q. (2018). Ontogeny of the Postcranial Axial Skeleton of *Melanosuchus niger* (Crocodylia, Alligatoridae). *The Anatomical Record*, 301(4), 607-623. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.23722>