

PROCESSAMENTO DE TECIDO VEGETAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PROTOCOLO PARA INCLUSÃO EM RESINA SPURR

PREPARAÇÃO DA RESINA

O Spurr é uma resina hidrofílica que penetra com facilidade em amostras mais compactas, como tecidos vegetais, fungos, helmintos e amostras mineralizadas. É uma mistura de resina epox que se mantém estável por várias semanas se mantida no congelador (-20°C). A resina é miscível tanto em etanol como em acetona. A resina deve ser polimerizada a 70°C. Devido a sua sensibilidade a água, em regiões muito úmidas podem ser necessárias adaptações.

Componentes	Padrão do fabricante
VCD (vinil ciclohexeno dióxido)	10,0g
DER-736 (diglicidileter de propilenoglicol)	8,0g
NSA (anidrido nonenil succínio)	26,0g
Catalisador DMAE (dimetillaminoetil)	0,4g
Tempo de polimerização 70 C	8h
Vida útil da mistura	60 a 90 días no freezer

Na capela de exaustão, pesar numa balança de topo os componentes da mistura em recipiente descartável. Num erlemyer, compatível com o volume de mistura a ser preparada, adicionar na sequencia o VCD, o DER, o NSA sob agitação lenta para não formar bolhas, em seguida adicionar o DME, gota a gota, sob agitação **sem aquecimento**. Agitar a mistura por cerca de 5 a 10 minutos. Cobrir a mistura com parafilme e armazenar no freezer.

PROCESSAMENTO DA INCLUSÃO

- # **Fixação**: Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M u(pH 7,2) 4 horas.
- # Lavar o material em tampão cacodilato de sódio (4x) 10 minutos cada.
- # **Pós-fixação** em tetróxido de ósmio 1% 2 horas, na geladeira (cobrir com papel alumínio)
- # Lavar o material em tampão cacodilato (4x) 15 minutos cada.
- # Desidratação série etanólica crescente:
- Etanol 30% 10 minutos;
- Etanol 50% 10 minutos;
- Etanol 70 %- 10 minutos;
- Etanol 90% 10 minutos;
- Etanol 95% 10 minutos;
- Etanol 100% (2x) 10 minutos cada;
- Acetona e álcool (proporção 1:1) 10 minutos;
- Acetona pura- 10 minutos;

Infiltração – resina Spurr:

- Resina Spurr + Acetona (proporção 1:5) 2 horas;
- Resina Spurr + Acetona (proporção 1:3) 2 horas;
- Resina Spurr + Acetona (proporção 1:1) 2 horas;
- Resina Spurr + Acetona (proporção 2:1) 2 horas;
- Resina Spurr pura overnight;
- Resina Spurr pura 4 horas;
- # INCLUSÃO em moldes de silicone devidamente identificados.
- # Polimerização em estufa a 70°C de 24 48 horas.

Protocolo para processamento no MEV

- # Fixação de pequenos fragmentos da amostra (aproximadamente 3x3mm) em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato ou cacodilato de sódio 0,1M (4h);
- # Lavar o material no tampão utilizado (fosfato ou cacodilato de sódio 0,1M) 2x 5 minutos
 - # Desidratação série crescente de acetona:
 - Acetona 50% 10 minutos
 - Acetona 60% 10 minutos
 - Acetona 70% 10 minutos
 - Acetona 80% 10 minutos
 - Acetona 90% 10 minutos
 - Acetona 100% 10 minutos
 - Acetona 100% 10 minutos
 - Acetona 100% 10 minutos
- # Ponto Crítico: o processo permite a retirada de toda a água do tecido e dura cerca de 40 minutos na câmara de ponto crítico (em inglês CPD Critical Point Dryer). Em seguida a amostra deve ser montada em "Stub" com fita dupla face de carbono.
- # Metalização: é depositada uma fina camada de ouro sobre à amostra com cerca de 20 a 30nm de espessura, através de um sistema de evaporação conhecido como "sputtering", utilizando o aparelho Sputter Coater SCD 050, BalTec.

#Observação do material no MEV.

Protocolo para inclusão em resina LR WHITE

Pré-fixação:

Glutaraldeido 3% em tampão CACODILATO OU FOSFATO 0,2M, sob vácuo, durante 15 minutos e em condição ambiente por 30minutos.

Lavagem:

No tampão Cacodilato ou fosfato lavar 3x de 15 minutos.

Pó-fixação:

Colocar no tetróxido de ómio 1% e deixar por 1 hora.

Lavagem:

Repetir a lavagem 3x de 15 minutos cada.

Desidratação:

Colocar no álcool a 30%, 50%, 70% e 90% por 15 minutos cada. No álcool de 100% 2x por 30 minutos e no superseco 2 x de 30 minutos cada.

Embebição:

Etanol	Resina LR WHITE	Tempo em repouso
3	1	2 horas
ì	1	2 horas
1	3	2 horas
Resina pura		Overnight
Resina pura		6 horas

Inclusão:

Colocar a reina em cápsulas de gelatina n°3, identificar e deixar na estufa a 60°C por 12 horas para polimerizar.