

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 019</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/9
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante para In'clusão Rápida e Limpeza Local		Vigência: 08/03/2021

## \*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 033; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por:  <b>Suely Aparecida Pinheiro Palomino Joyce Kawakami</b>  Biologistas	27/07/2015	Aprovado por:  <b>Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi</b> Pesquisadora	15/03/21
--	------------	--	----------



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Número:  
**POP TEC 019**

Edição: 05

**Área:** Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 2/9

**Assunto:** Microscopia Eletrônica  
Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante  
para In'clusão Rápida e Limpeza Local

Vigência: 08/03/2021

### 1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de Soluções, Tampões, Fixadores e Corantes, utilizados na Técnica de Inclusão rápida de material biológico, analisados pelo Microscópio Eletrônico.

### 2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

### 3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem a Técnica de Inclusão rápida para a Microscopia Eletrônica

### 4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável

### 5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A Técnica de Inclusão de Material Biológico para a análise pelo Microscópio Eletrônico, necessita de Soluções, Tampões, Fixadores e Corantes, que serão preparados pelos profissionais do Laboratório.

### 6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **Tampão Fosfato de Sódio 0.2 M pH7,3, usado nos fixadores Glutaraldeído e Ósmio.**

- 6.1.1 Preparar 2 Soluções Estoque, A e B

- 6.1.1.1 **Solução A** : Fosfato de Sódio monobásico 0.2 M ( Tabela 01)

Tabela 01

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Fosfato de Sódio Monobásico .	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	137,99	1,3799 grs
Água de Injeção dissolver em 30 ml e completar com o volume			50 ml
Homogenizar até dissolver o Sal			



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Número:  
**POP TEC 019**

Edição: 05

**Área:** Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 3/9

**Assunto:** Microscopia Eletrônica  
Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante  
para In'clusão Rápida e Limpeza Local

Vigência: 08/03/2021

### 6.1.1.2 Solução B : Fosfato de Sódio dibásico 0.2 M ( Tabela 02)

Tabela 02

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Fosfato de Sódio Bibásico .	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358,14	10,74 grs
Água de Injeção dissolver em 100 ml e completar com o volume.			150 ml
Homogenizar até dissolver o Sal			

### 6.1.1.3 Tabela 03:: Misturar a Solução A e Solução B, seguindo quantidades da tabela Acertar o pH

Sol. A ml	Sol. B ml	pH	Sol. A ml	Sol. B ml	pH	Sol. A ml	Sol. B ml	pH
93.5	6.5	5.7	68.5	31.5	6.5	23.0	77.0	7.3
92.0	8.0	5.8	62.5	37.5	6.6	19.0	81.0	7.4
90.0	10.0	5.9	56.5	43.5	6.7	16.0	84.0	7.5
87.7	12.3	6.0	51.0	49.0	6.8	13.0	87.0	7.6
85.0	15.0	6.1	45.0	55.0	6.9	10.5	90.5	7.7
81.5	18.5	6.2	39.0	61.0	7.0	8.5	91.5	7.8
77.5	22.5	6.3	33.0	67.0	7.1	7.0	93.0	7.9
73.5	26.5	6.4	28.0	72.0	7.2	5.3	94.7	8.0

### 6.1.4 Tabela 04 : A Osmolaridade é determinada na Faculdade de Medicina, Laboratório do Dr Césso

Concentração (M)	Osmolaridade (mOs)	pH Concentração (M)	Osmolaridade (mOs)
0,020	55	0.125	265
0.030	75	0.150	315
0.044	105	0.160	335
0.048	110	0.170	350
0.050	115	0.190	385
0.075	170	0.200	410

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 019</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/9
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante para In'clusão Rápida e Limpeza Local		Vigência: 08/03/2021

6.1.5 **Tabela 05:** Concentração de Glutaraldeído,, de acordo com a % necessária (1,0%,1,5%,2%,2,5%,3%),, em Tampão de Fosfato de Sódio pH7,3. O Glutaraldeído, é uma solução tóxica, que deve ser manipulado na Capela de Fluxo

Nome	Conc .1% ml	Conc 1,5% ml	Conc .2% ml	Conc. 2,5% ml	Conc. 3% ml	<b>Conc. 3% ml</b>
0.2 M Tampão Fosfato de Sódio pH 7.3 ( Tabela 01, Solução Final 01)	50	50	50	50	50	<b>23,33</b>
Glutaraldeído <b>25%</b> em água <b>OU</b>	4	6	8	10	12	<b>xxxx</b>
<b>Glutaraldeído 70% em água</b>	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	xxxx	<b>2,00</b>
Água de injeção qsp	100	100	100	100	100	<b>46,66</b>
Solução preparada, será fracionada em alíquotas de 1,0 ml em microtubos de 1,5 ml e guardadas no Freezer nº 10, na primeira gaveta em caixas identificadas.						

6.1.5.1 O Glutaraldeído usado, deverá ser próprio para Microscopia Eletrônica, em concentrações altas de 50 ou 70% e embalados em ampolas sobre o gás inerte, nestas condições, o Glutaraldeído, se mantém inalterado. A ampola de Glutaraldeído 70% (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> com PM=100,12), tem validade de alguns anos, sem alterações, estocado na geladeira Brastemp, de Reagentes Químicos nº7 -

## 6.2 **Soluções Estoques : Tetróxido de Ósmio 2%( Ósmio Reduzido - Tab 06) e Hexaferrocianeto de Potássio 3% ( Tab.07)**

6.2.1 Deixar preparadas as soluções estoque guardadas na Geladeira nº 6 na 2ª prateleira em recipiente fechado (4º C) e no momento de uso, misturá-las meio a meio.

Na preparação do Ósmio reduzido, usa-se concentração de 2%, para que a solução final tenha concentração de 1%.de Ósmio. O mesmo acontece com o Hexaferrocianeto que ficará numa concentração final de 1.5 %.Na preparação, colocar primeiro o Ferrocianeto e depois o Ósmio. Dessa forma temos a certeza de que todo o Ósmio foi reduzido, validade de 1 ano.

O preparo do Ósmio deve ser feito dentro da Capela de Exaustão utilizando luvas nitrílicas, porque a gordura das mãos inativa o Ósmio. Deixar a ampola de Ósmio e o

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 019</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/9
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante para In'clusão Rápida e Limpeza Local		Vigência: 08/03/2021

bastão de vidro, mergulhado com Solução de Sulfocrômica no próprio frasco onde será armazenado o Tetróxido de Ósmio por 24 horas. A seguir devolver a Solução de Sulfocrômica para o vidro estoque e enxaguar várias vezes com água de Injeção, escorrendo bem. Quebrar a ampola de Ósmio, com o auxílio de um bastão de vidro, adicionar a água de Injeção e esperar uma semana antes de usar. Vedar o vidro com parafilme para que os vapores de Ósmio não contamine a geladeira. Validade 1 ano

#### 6.2.1.1 Tabela.06 -Tetróxido de Ósmio 2%

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Tetróxido de Ósmio	$OSO_4$	254.20	1g
Água de injeção q.s.p			50ml
Tetróxido de Ósmio fica estocado em latas próprias dentro do armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica			

#### 6.2.1.2 Tabela 07 -Hexaferrocianeto de Potássio 3%, fica estocado dentro do armário de sais, para munohistoquimica e Microscopia Eletrônica.

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Hexaferrocianeto de Potássio	$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	422.39	3 g
Água de injeção q.s.p			100mL

#### 6.3 Tabela 08 - **Solução Salina 0,9% ,360 mOs, preparada( Verificado pela Joyce)**

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Cloreto de Sódio	NaCl	58,44	0,9 g
Sacarose (52mOS	$C_{12}H_{22}O_{11}$	343,3	1,78 g
Água de injeção qsp			100mL
Acertar o pH 7.4 com $NaHCO_3$ a 10%.. Validade de 1 ano a 4°C			

.. **OU**

#### 6.3.1 Tabela 09 - Solução de NaCl 0.9% comercial (solução fisiológica preparada 308 mOs).

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Cloreto de Sódio comercial	NaCl	58,44	500ml

**Área:** Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 6/9

**Assunto:** Microscopia Eletrônica  
Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante  
para In'clusão Rápida e Limpeza Local

Vigência: 08/03/2021

Sacarose (52mOS)	C12H22O11	343,3	8,9 g
Acertar o pH 7.4 com NaHCO <sub>3</sub> a 10%.. Validade de 1 ano a 4°C. estocados dentro do armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica.			

6.3.2 Tabela 010 - Solução de Bicarbonato de Sódio a 10% para acertar o pH

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Bicarbonato de Sódio	NaHCO <sub>3</sub>	84,01	1 g
Água de injeção	qsp		10 ml
Estocado dentro do armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica.			

6.3.3 Tabela 011 - Concentração e Osmolaridade da Solução Salina

Concentração (%)	osmolaridade (mOs)	Concentração (%)	osmolaridade (mOs)
0.18	60	1.10	350
0.34	115	1.18	375
0.40	130	1.84	595
0.46	145	1.88	595
0.77	245	1.98	625
0.92	290	2.30	725

6.4 Tabela 012 - **Acetato de Uranila 0.5% 0.4M** (usada na fixação e contrastação em bloco de materiais em processamento para MET).

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Acetato de Uranila	CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	424,14	0,5g
Sacarose	C12H22O11	343,3	13,3 g
Água de injeção	qsp		100ml
Dissolver a Uranila e Sacarose em 80 ml de Água de Injeção, completar o volume para 100ml.. Armazenar em frasco âmbar.. Validade de 1 ano a 4°C.			

6.5 Tabela 013 - **Etanol 70%** - Solução utilizada na desidratação das amostras.

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Etanol absoluto I	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,1	70ml
Água de injeção	qsp		100ml
Armazenar a 4°C. Validade 30 dias. Estoque na geladeira de Reagentes Químicos nº7-Brastemp			

6.6 Tabela 014 - **2,2 Dimetoxipropano acidificado (0,1N)**. Solução utilizada na desidratação das amostras



## PROCEDIMENTO OPERACIONAL

Número:  
**POP TEC 019**

Edição: 05

**Área:** Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 7/9

**Assunto:** Microscopia Eletrônica  
Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante  
para In'clusão Rápida e Limpeza Local

Vigência: 08/03/2021

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
2,2 Dimetoxipropanol	$(CH_3)_2C(OCH_3)_2$	104.15	100ml
Ácido clorídrico 1N	HCL	36,46	100µl

Armazenar a 4°C. Validade de 1 ano. Estocado dentro do armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica.

### 6.7 Tabela 015 - **Ácido clorídrico (HCl) 1N e 10N**

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade	
			1N	10N
Ácido clorídrico	HCL	36,46	8,2ml	82ml
Água de injeção q.s.p			100 ml	100 ml

Estocado dentro do armário azul corrosivo. Usar a Capela de Exaustão com uso de Luvas

### 6.8 Tabela 016 - **Sulfato de Cobre 4% em Acetona, utilizada para desidratação das Amostras**

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Sulfato de cobre anidro	CuSO4	159,6	4g
Acetona q.s.p	CH3(CO)CH3	58,08	100 ml

Armazenar a 4°C. Validade de 1 ano. Sulfato de Cobre estocado no armário de sais para Imunohistoquímica e Microscopia Eletrônica. Acetona estocada na Geladeira de Reagentes Químicos - Brastemp n° 7

### 6.9 Tabela 17 - **Resina Epon/Araldite**

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Epon 812	-----	-----	5ml
Araldite ( Resina GY 502)	-----	-----	5ml
DDSA	$C_{16}H_{26}O_3$	266.38	13ml
DMP-30	$C_{15}H_{27}N_{30}H$	265.0	0,5 ml

Homogenizar com o Agitador Ultra Turrax n°43, por aproximadamente 2 hs. Aliquotar em seringas de 5 , 10 e 20 ml e armazenar a -20°C. Lavar todo o material com Etanol Absoluto e depois Xilol. Validade de 1 ano. Araldite estocada no armário de reagentes para MEletrônica e Epon 812 dentro do dissecador, no armário branco embaixo da estufa de secagem

### 6.10 Tabela 18- **Resina Epon 812 /Sulfato de Cobre/Acetona 4, para infiltração das amostras.**

**Área:** Laboratório de Patologia Cardíaca

Página: 8/9

**Assunto:** Microscopia Eletrônica  
Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante  
para In'clusão Rápida e Limpeza Local

Vigência: 08/03/2021

Nome	Quantidade
Epon 812/Araldite (Tabela 9)	1 ml
Sulfato de Cobre 4%/Acetona, usar a parte superior (Tabela 14). Preparar na hora de uso	1 ml

**6.11 Citrato de Chumbo (Corante de corte fino). Protocolo segundo Reynolds et. Al., 1963. J Cell Biol 17:208**

6.11.1 Ferver, em um erlenmeyer, 100 ml de água de injeção por 5-10 minutos (para retirar o gás carbônico presente). Tampar o erlenmeyer e esfriar a água. Utilizar esta água em todas as soluções utilizadas.

6.11.2 Tabela 019 - Solução de Hidróxido de Sódio 1.0 N

Nome	Quantidade
Hidróxido de Sódio	1g
Água Injeção fervida	25 ml

6.11.3 Tabela 020 e Tabela 021 - A Solução de Citrato de Chumbo, pode ser preparada de duas maneiras.

Após a pesagem e diluição das Soluções, escolhidas, tampar e agitar imediatamente e vigorosamente durante 1 minuto. Continue agitando suave e intermitentemente por meia hora. A Solução se torna leitosa.

Junte 8 ml de Hidróxido de Sódio 1 N. ( NaOH P.M 40 Agite levemente e a solução se torna transparente. Completar para 50 ml com água de injeção fervida. Etiquetar e guardar em caixa escura com temperatura estável. Validade de 1 mês ou até precipitar:

6.11.3.1 Tabela 022 - Primeira Solução de Citrato de Chumbo, preparada em balão volumétrico de 50ml

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Citrato de Sódio - 3H <sub>2</sub> O	(Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) 3H <sub>2</sub> O	373,90	1.76 g
<b>ou</b>			
Citrato de Sódio - 5H <sub>2</sub> O	(Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) 5H <sub>2</sub> O		2,13g
Nitrato de Chumbo	(Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	331,21	1.33 g
Água Injeção Fervida			30 ml

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 019</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 9/9
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica Preparo de Soluções, Tampão, Fixadores e Corante para In'clusão Rápida e Limpeza Local		Vigência: 08/03/2021

6.11.3.2 Tabela 023 - Segunda Solução de Citrato de Chumbo, preparada em balão volumétrico de 50ml

Nome	Fórmula Química	P.M	Quantidade
Citrato de Chumbo	PB(C6H5O7)2.3H2O	1053,82	1.4 g
Água Injeção fervida			30 ml

6.12 **Limpeza :**

6.12.1 O local, deverá ser limpo antes e após o uso com gazes embebidas com Álcool 70°C , descartar o material usado

**6.13 EPIs:**

6.13.1 Luvas nitrílicas, óculos de proteção, avental

6.14 **EPC:**

6.14.1 Capela de exaustão

**7. FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável.

**8. ANEXOS**

8.1 Não aplicável.

**9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

9.1 Livro Practical Methods in ElectronMicroscopy, volume 3Part I pág.43, editado por Audrey M. Glauert - North-HollandPublusingCompany – Amsterdam 1975.

9.2 Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas, Antonio Haddad et al, 1998

9.3 Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica, Antonio Haddad et al, 1989