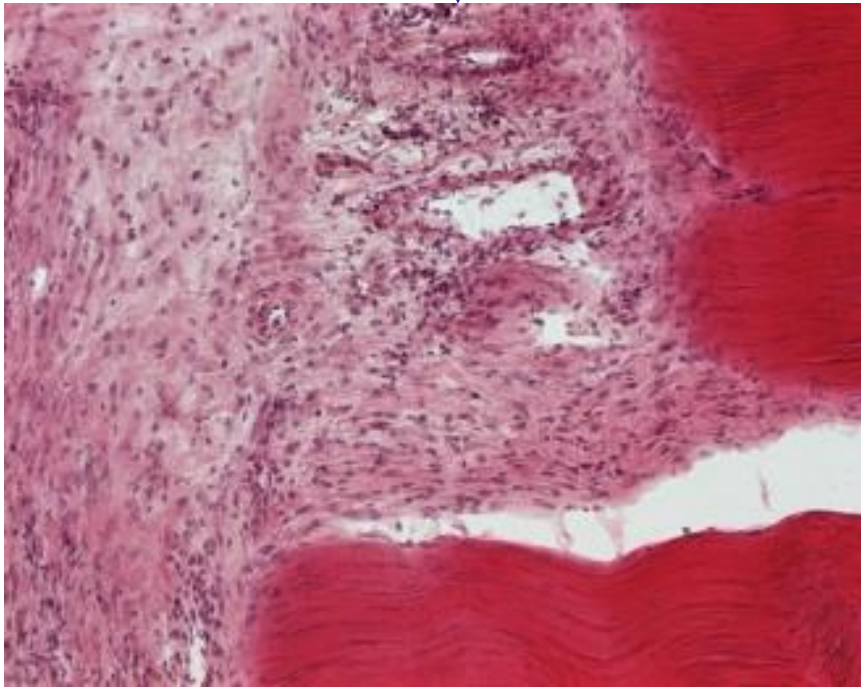


COLORANTI E COLORAZIONI In Microscopia

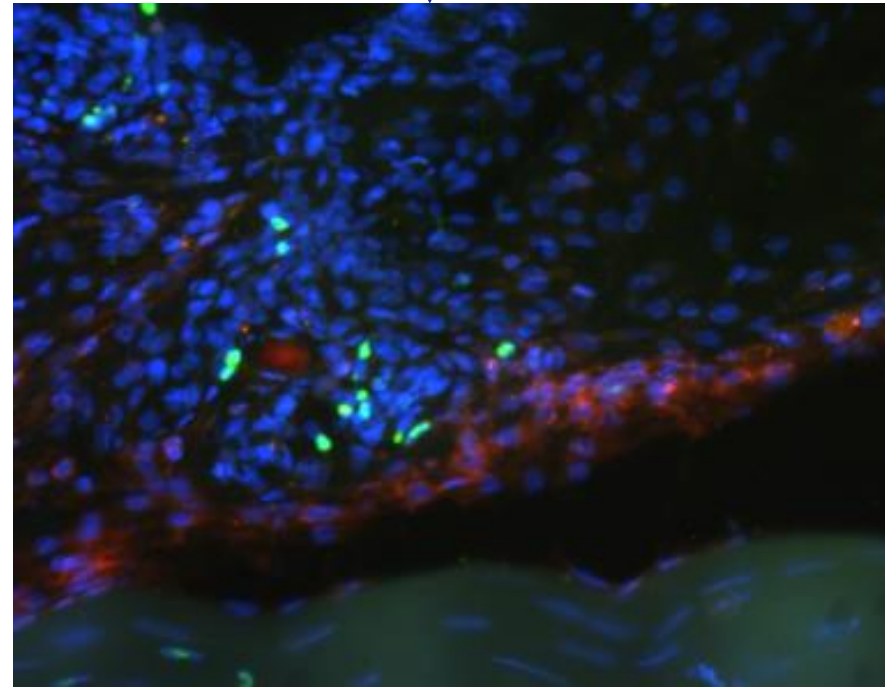
Osservazione Microscopica



M.OTTICO A LUCE TRASMESSA



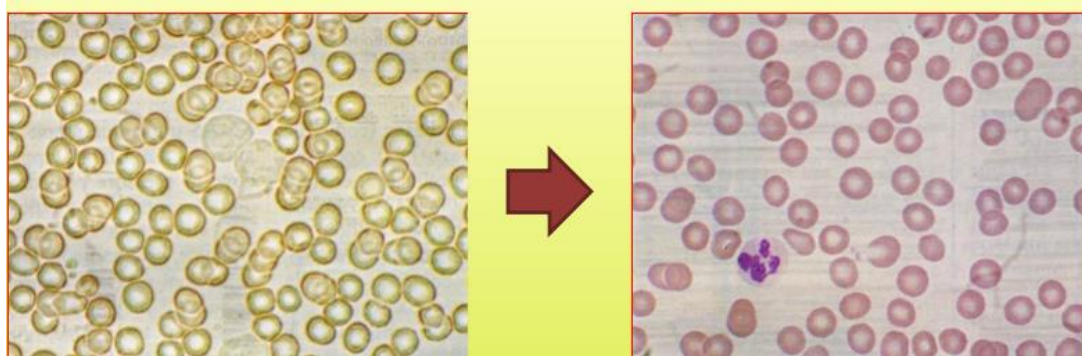
M. OTTICO A FLUORESCENZA



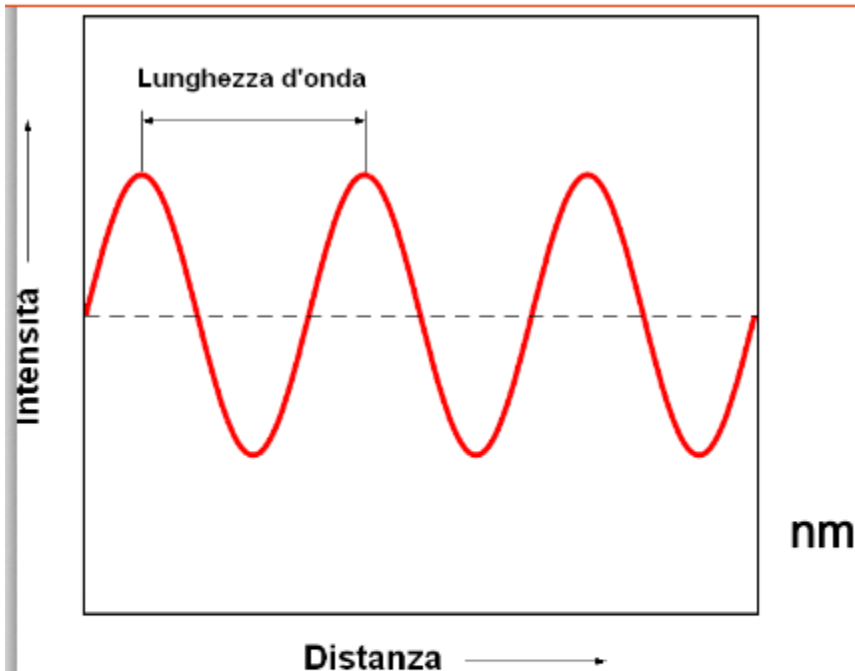
SCOPO DELLA COLORAZIONE

La colorazione è un procedimento che aumenta il contrasto tra diverse strutture cellulari, tale da permetterne il riconoscimento nelle sezioni istologiche.

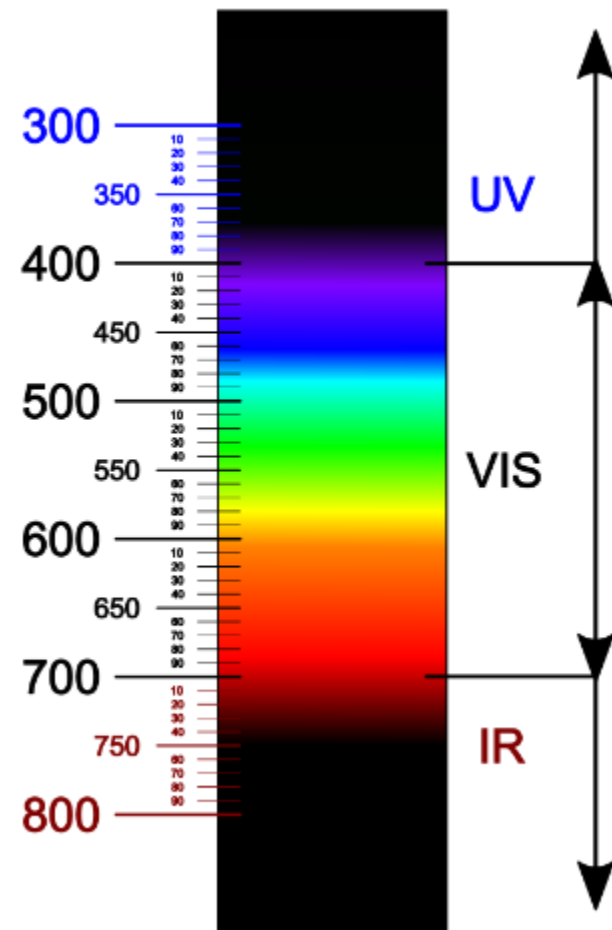
Il termine “colorazione” è anche usato in modo improprio anche in campo ultrastrutturale (per indicare i procedimenti con cui si rendono elettron-opache le strutture al M.E.) o nel campo della microscopia a fluorescenza (per indicare la procedura con cui le molecole fluorescenti si legano alle strutture cellula



Il **COLORE** è la percezione visiva generata dai segnali nervosi che i fotorecettori della retina inviano al cervello quando assorbono le radiazioni elettromagnetiche di determinate lunghezze d'onda e intensità nel cosiddetto **spettro visibile** o luce.



In [fisica](#) lo **spettro visibile** è quella parte dello [spettro elettromagnetico](#) che cade tra il [rosso](#) e il [violetto](#) includendo tutti i colori percepibili dall'[occhio](#) umano



Per “**colorante**” si intende una molecola solubile e fornita di colore proprio, capace di legarsi stabilmente a substrati cellulari e tessutali.

TUTTI I COLORANTI POSSONO ESSERE SUDDIVISI
PER LA LORO ORIGINE IN:

- **Naturali animali**

(es: il carminio ricavato dalla cocciniglia)



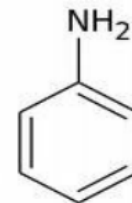
- **Naturali vegetali**

(es: l’ematossilina ricavata dal legno azzurro)



- **Artificiali**

(denominati anche colori di anilina)



Alcuni coloranti, detti **coloranti vitali**, vengono utilizzati direttamente su cellule vive (e quindi non sottoposte a preparazione istologica), per studiare direttamente al microscopio la localizzazione di determinate strutture cellulari o identificare particolari funzioni.

I coloranti vitali sono incorporati direttamente dalle cellule e si vanno a localizzare nelle strutture verso cui sono preposti.

Esempi di coloranti vitali:

Trypan Bleu (macrofagi, fagocitosi);

Verde Janus (mitocondri);

Blu di Metilene (fibre nervose).

STRUTTURA DEI COLORANTI

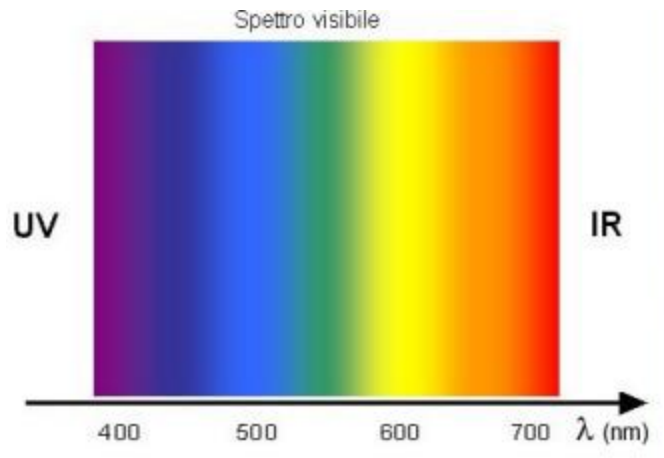
Il **cromoforo** (gruppo di atomi capaci di conferire colore a una sostanza) e l'**auxocromo** (gruppo chimico che introdotto in una sostanza colorata, la trasforma in sostanza in grado di colorare), formano insieme il colorante completo.

Nel caso di “**fluorocoloranti**”, si parla rispettivamente di **fluoroforo** e di **auxofluoroforo**.

STRUTTURA DEI COLORANTI

Il **cromoforo** è un composto capace di assorbire radiazioni elettromagnetiche visibili (lunghezze d'onda nel visibile, da 360 nm a 790 nm).

Il colore che esso riflette (o trasmette) è correlato a quello assorbito.



ESEMPI:

- 1) una sostanza che appare **giallo-arancione** ha spettro di assorbimento nel **blu-violetto**
- 2) una sostanza che appare **verde** ha uno spettro di assorbimento nel **rosso**.

STRUTTURA DEI COLORANTI

Proprietà del **cromoforo**

La presenza di più gruppi cromofori, aumenta l'intensità del colore

Il colore è dovuto all'assorbimento selettivo di alcune lunghezze d'onda della luce

La luce trasmessa o riflessa da una data sostanza, privata delle lunghezze d'onda che ha assorbito, appare colorata

il cromoforo, pur essendo colorato, non ha proprietà coloranti: è soltanto un cromogeno (generatore di colore)

perché il colorante acquisti la proprietà di colorare deve contenere anche un gruppo noto come **auxocromo**

STRUTTURA DEI COLORANTI

L' **auxocromo** è un gruppo chimico ionizzabile, unito covalentemente al cromoforo.

E' responsabile:

- 1) della **solubilità** in acqua del colorante
- 2) della sua **ionizzabilità**
- 3) della capacità di contrarre **legami stabili** con le sostanze tissutali o cellulari.

A seconda della carica assunta in soluzione, l'**auxocromo** può essere:

- **acido** (quando ionizza come anione)

auxocromi acidi sono il gruppo solfonico ($-\text{SO}_3\text{H}$), quello carbossilico ($-\text{COOH}$), quello idrossilico ($-\text{OH}$).

- **basico** (quando ionizza come catione)

auxocromi basici sono il gruppo amminico ($-\text{NH}_2$) ed i suoi derivati ed i metalli.

Questa caratteristica dell'auxocromo genera la fondamentale distinzione dei **coloranti istologici in acidi e basici**.

STRUTTURA DEI COLORANTI

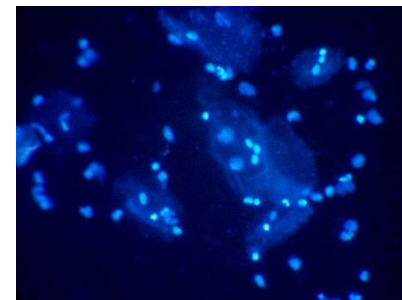
I “fluorocoloranti”

I **fluorocromi** sono sostanze coloranti la cui particolarità è quella di assorbire fotoni ad alta energia e a lunghezza d'onda corta (UV o blu) (*stato di eccitazione*) e ad emettere luce a bassa energia e a lunghezza d'onda lunga (es: verde o rosso) (*stato di emissione*) nello spettro visibile. Come effetto esibiscono **Fluorescenza**.

Fluorescenza



Osservazione con Microscopio Ottico
a Fluorescenza



Fluorocromo
DAPI

Sito di approfondimento su Fluorescenza e Fluorocromi

<http://www.fluorescencemicroscopy.it/>

I fluorocromi sono normalmente impiegati per ricerca biologica in μM di concentrazione

All probes for class are prepared ready to be diluted with their particular solvent. You will not be required to weigh anything.

Probe	Working concentration	Target	Ex/Em
Acridine Orange	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Bacteria vegetative cells and endospores, nuclei (when used at high concentration)	Blue / Green
Antifade solution	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Do Not use any antifade for SYTO BC)	NA	NA
Calcein AM	1 μM in water (stock is 1mM in acetone)	Viability test for animal cells. Fluoresces if cell is alive.	Blue / Green
Calcofluor M2R (Fluorescent Brightener)	2mg / ml in water for soil 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in water for cultures	Plant and fungal cell walls in soil and as cultured cells	UV / Blue
Chlorophyll	(intrinsic)	Chloroplasts in plants and algae	Green / Red
DAPI	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in water (dilute stock 1:1000)	DNA (nuclei)	UV / Blue

Da sito

<http://www.fluorescencemicroscopy.it>

I fluorocromi

Table 2 A Few Common Fluorescent Dyes and Their Targets

Target	Dye	Solvent	Stock	Dilution	Ex	Em
Nucleus	Acridine Orange	Water	0.1mg/ml	1:1000	480	520-650
	Bisbenzimidazole (Hoechst 33258, 33342)	Water	1 mg/ml	1:500	352	461
	DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)	Water	0.1 mg/ml	1:100	358	461
	Propidium iodide	Water	1 mg/ml	1:1000	493	630
	SYTO 11-17 (permeant)	DMSO	5 mM	1:5000	488-621	509-634
	SYTOX Green (impermeant)	DMSO	5 mM	1:300	504	523
Endoplasmic reticulum	DiIc ₆ , * DiIc ₁₆ , Rhodamine 6G	DMSO, mineral oil	1 mg/ml	1:100	547	571
	DiOC ₆ *	EtOH	0.5 mg/ml	1:500	484	507
Golgi	NBD Ceramide	DMSO (100%)	1 mg/ml	1:400	460	534
Mitochondria	CMXRos** ("MitoTracker")	DMSO (100%)	200 µm	1:400	594	608
	Rhodamine 123	DMSO (100%)	1 mg/ml	1:400	505	534
	DiOC ₇ *	DMSO (100%)	0.1 mg/ml	1:100	482	511
Viability (esterase activity, membrane integrity)	Fluorescein diacetate	DMSO	1 mM	1:250-1:1000	489	514
	Calcein AM	DMSO	1 mM	1:250-1:1000	496	520
	BCECF AM	DMSO	1 mM	1:250-1:1000	508	531
Callose	Aniline Blue	PO ₄ buffer, pH 9	0.1 mg/ml in DI or buffer	1:1000	UV	Blue
Cell wall (may also stain chitin)	Calcofluor White M2R	PO ₄ buffer, pH 7	0.1 mg/ml	1:1	UV	Blue
Chromosome banding	YOYO-1 SYTOX Green, Methyl Green	Water or PBS	1 mM	0.5 µM	491	509
Primary and secondary amines	Fluorescamine	Acetone, acetonitrile	0.4 mg/ml	1:1	381	470
pH indicators	SNAFL-1 (acid) (basic)	Water	NA	10-50 µm	479, 508 537	543 623
	SNARF-1 (acid) (basic)	Water	NA	10-50 µm	518, 548 579	567 640
	BCECF AM	Water	NA	10-50 µm	508	531
Calcium indicators [†]	Fura-2, Fura-PE3	Water	NA	10-50 µm	340 380	510
	Indo-1, FFP18	Water	NA	10-50 µm	350	405, 480
	Fluo-3	Water	NA	10-50 µm	490	525

Da sito

<http://www.fluorescencemicroscopy.it>

TIPI DI COLORANTI

Classificati per la natura cationica o anionica dei gruppi reattivi.

I coloranti possono essere suddivisi in:

- **Coloranti Acidi** (ad es. alizarina, trypan blu, eosina) gruppo auxocromo anionico (-), si legano a componenti basici (+) del tessuto e che per questo sono definiti acidofili per la loro affinità nei confronti dei coloranti acidi
- **Coloranti Basici** (ad es. blu di toluidina, blu di metilene, ematossilina, azzuo B) con gruppo auxocromo cationico (+), si legano a componenti acidi (-) del tessuto e che per questo sono definiti basofili per la loro affinità nei confronti dei coloranti basici
- **Coloranti Neutri** (ad es. rosso neurto, verde janus) non presentano dissociazione né come basi né come acidi perché sono privi di gruppi auxocromi. Interagiscono con substrati altrettanto privi di carica elettrica, come i lipidi, "sciogliendosi" in essi.
- **Mordenzanti** agiscono da intermediari tra il colorante e il tessuto. La maggior parte dei mordenzanti impiegati nelle tecniche istologiche sono ioni metallici (ferro o tungsteno) e/o ossidanti (acido cromico)

TIPI DI COLORANTI

Classificati per la natura cationica o anionica dei gruppi reattivi.

COLORANTI NEUTRI

Rosso neutro

COLORANTI BASICI (NH_3^+)  DNA, RNA (basofile)
(cationici)

Ematossilina, Blu di metilene, Blu di toluidina

COLORANTI ACIDI (COO^-)  citoplasma, proteine
(anionici) (acidofile)

Eosina, Trypan Bleu, blu pirrolo

Mordenti o mordenzanti

- Alcuni metodi di colorazione comportano la cosiddetta **mordenzatura**
- Questa operazione consiste nel **trattare il tessuto con un composto** capace di fissare su di esso dei **gruppi acidi o basici**, i quali a loro volta **potranno legarsi con un colorante basico o acido**
- Il composto che costituisce questo termine di **collegamento fra il tessuto e il colorante** si chiama **mordente**
- La maggior parte dei mordenti impiegati in istologia sono ossidanti
 - acido cromatico, acido fosfomolibdico, acido fosfotungstomolibdico, acido nitrico
 - cloruri di Pb, Zn, Hg
 - permanganato di potassio
 - iodio
 - ac. picrico, ecc.

CLASSIFICAZIONE DEI COLORANTI A SECONDA DEL CROMOFORO

- **Nitroso coloranti** (Fast Green)
- **Nitro coloranti** (Giallo naftolo)
- **Azoici**
 - Monoazoici** (Orange G), **diazoici** (Rosso Congo), **poliazoici**
- **Sali di diazonio** (Fast Red G)
- **Sali di tetrazolio** (Nitro Blu)
- **Stilbenici**
- **Derivati dell'arilmetano**
 - Difenilmetani**, **Diamminotrifenilmetani**, **Triamminotrifenilmetani**
- **Xantenici**:
 - Amminoxanteni** (Pironina G, Rodamina B), **Idroxanteni** (Eosina B)
- **Acridinici** (Arancio di acridina)
- **Chinone-imminici**
 - Indammine** (Blue di Toluidina), **Tiazine** (Blu di Metilene)
- **Antrachinonici** (Rosso di Alizarina)
- **Ftalocianine** (Alcian Blu)

LACCHE

- Le lacche costituiscono una classe particolare di **coloranti basici**
- Si tratta di coloranti basici in cui **l'auxocromo è un metallo**
- Hanno largo impiego per **l'intensità e la stabilità del colore**
- I metalli più usati nelle lacche per uso istologico sono **alluminio, ferro e cromo**
- Gli **allumi** (di potassio, di ferro ammoniacale) **formano lacche** con alcuni coloranti, come **l'emateina**, dando luogo a **complessi fortemente colorati**

Caratteristiche di alcuni COLORANTI

La METACROMASIA

E' un **particolare comportamento di alcuni coloranti basici** (blu di toluidina, blu di metilene, Azur I e II, cristal violetto, blu brillante di cresile).

Questo termine **indica un *cambiamento (o viraggio) del colore***, una volta che il colorante sia stato assunto da determinate sostanze, definite perciò cromotrope. **I coloranti metacromatici sono basici.**

N.B.: La metacromasia non deve essere confusa con l'allocromasia, dovuta alla distribuzione di determinati coloranti verso strutture tissutali o cellulari più affini, differenziando queste parti con un colore diverso da quello del resto del preparato.

Modalità di esecuzione delle colorazioni (1)

- **colorazioni in blocco**: è una colorazione di frammenti di tessuti prima che siano sezionati
- **colorazioni di sezioni**: è la colorazione che avviene dopo che il tessuto è stato sezionato

- **colorazioni dirette**: sono quelle in cui il preparato non richiede trattamenti particolari prima di essere immerso nel colorante
- **colorazioni indirette**: sono quelle in cui la colorazione deve essere preceduta da una mordenzatura (trattamento con sostanze chimiche per facilitare i legami)

- **colorazioni progressive** (ad esempio l'ematossilina di Ehrlich, di Mayer e di Harris): hanno una concentrazione più bassa di colorante e colorano selettivamente la cromatina nucleare senza intaccare le strutture citoplasmatiche. L'intensità è in funzione del tempo
- **colorazioni regressive** (ad esempio ematossilina di Harris, Giemsa o Papanicolaou): agiscono in modo intenso su tutte le strutture nucleari e citoplasmatiche. Per ottenere la risposta cromatica corretta, occorre rimuovere il colorante in eccesso dalla sezione di tessuto

Modalità di esecuzione delle colorazioni (2)

- **colorazioni semplici:** si usa un solo colorante
 - **colorazioni complesse:** si usa più di un colorante contemporaneamente o in successione l'uno dopo l'altro
- 

- **colorazioni vitali:** Sono quelle applicate ad animali viventi. Queste presuppongono l'intervento di processi vitali per l'assunzione delle molecole coloranti all'interno di cellule o nella sostanza intercellulare (ad esempio trypan blu, inchiostro di china).

- **colorazioni sopravitali:** quando il colorante è usato per trattare tessuti o cellule isolate, ancora vive (ad esempio il verde Janus per mitocondri).

fattori che influenzano l'azione dei coloranti

- L'azione differenziale dei coloranti dipende da fattori insiti nel tessuto:
 - **affinità chimica** fra i vari costituenti del tessuto e i coloranti
 - **concentrazione dei costituenti** che reagiscono con il colorante
 - **permeabilità dei costituenti**
 - **il pH**
 - **la forza ionica**
 - **la concentrazione del colorante**
 - **la temperatura del bagno di colorazione**
 - **la fissazione** cui è stato sottoposto il tessuto
 - La buona riuscita di molti metodi di colorazione **dipende proprio dal tipo di fissativo impiegato**
 - **Non è ben conosciuto il meccanismo** attraverso il quale il fissativo favorisce la successiva colorazione
 - Per questa la ragione, per ogni metodo di colorazione, si specifica il fissativo più adatto

COLORAZIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE PER L'OSSERVAZIONE OTTICA

Poiché la densità ottica delle diverse parti del campione biologico è pressoché identica, **la colorazione interviene per aumentare il contrasto**. Lo scopo è raggiunto sfruttando un'affinità differenziale per le molecole di colorante da parte di diversi costituenti cellulari ed extracellulari.

Le colorazioni, indipendentemente dal meccanismo d'azione del colorante, possono essere divise in due gruppi:



**COLORAZIONI TOPOGRAFICHE o
ISTOMORFOLOGICHE**



COLORAZIONI IMMUNOISTOCHIMICHE

COLORAZIONE di UN PREPARATO

Campioni da processare:

-CELLULE

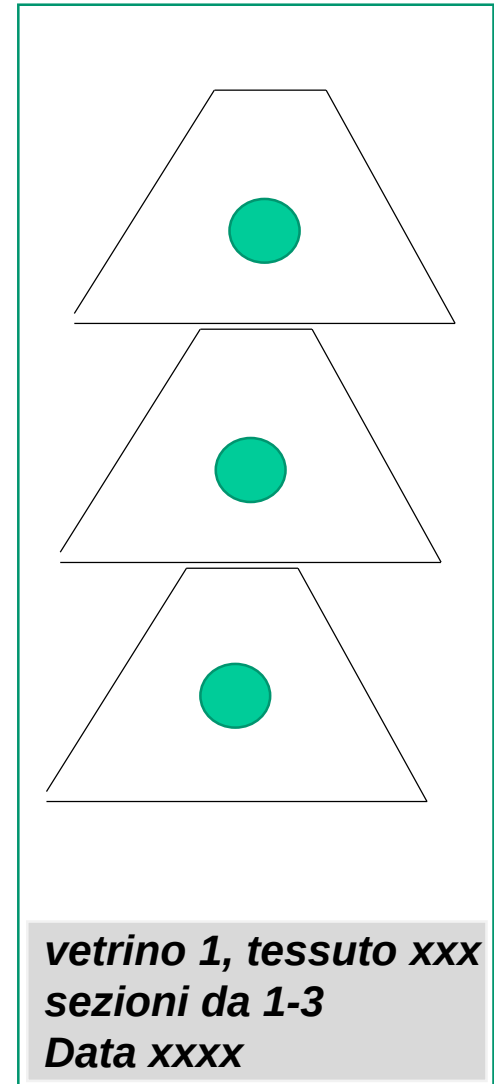
-LE SEZIONI RACCOLTE SUL VETRINO

- Incluse in Paraplast o Paraffina
- Criocongelate



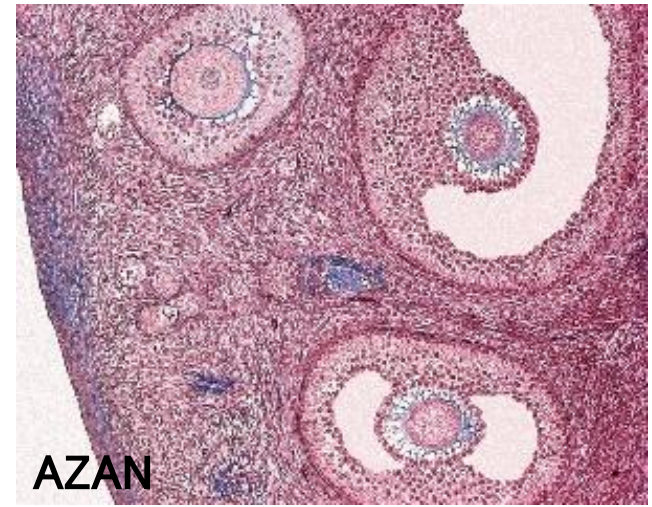
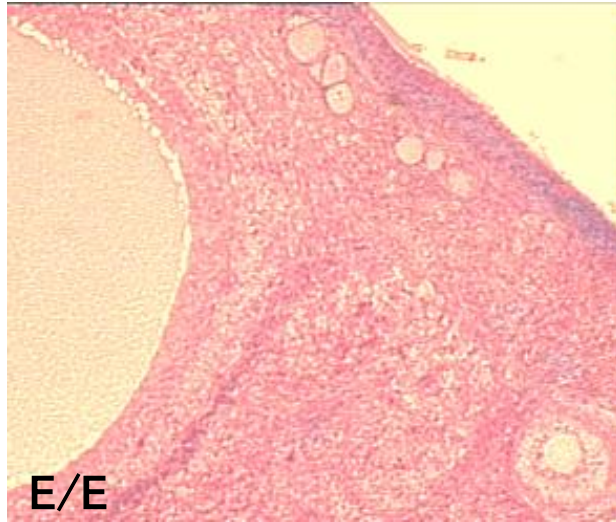
Colorazione
Montaggio
Osservazione

Sezioni

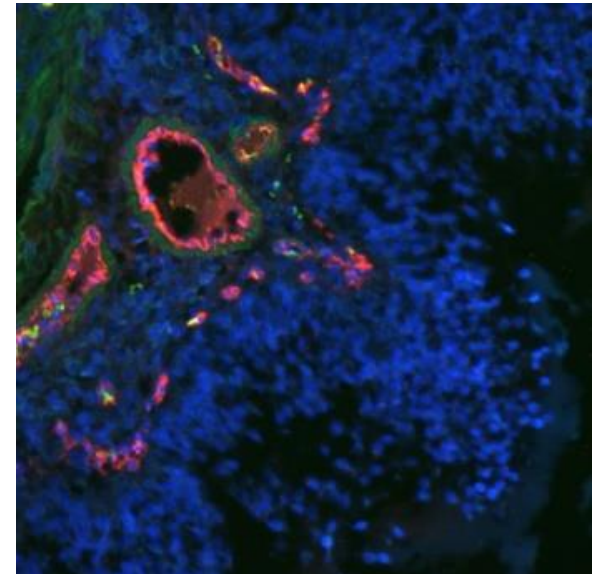
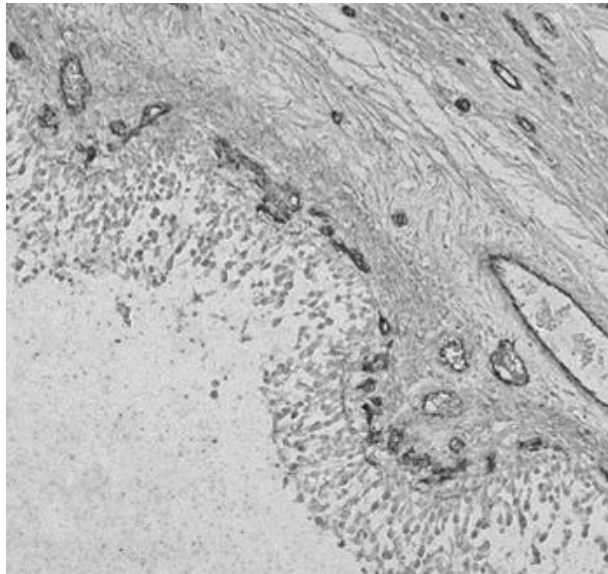




COLORAZIONI TOPOGRAFICHE



COLORAZIONI IMMUNOISTOCHIMICHE



COLORANTI



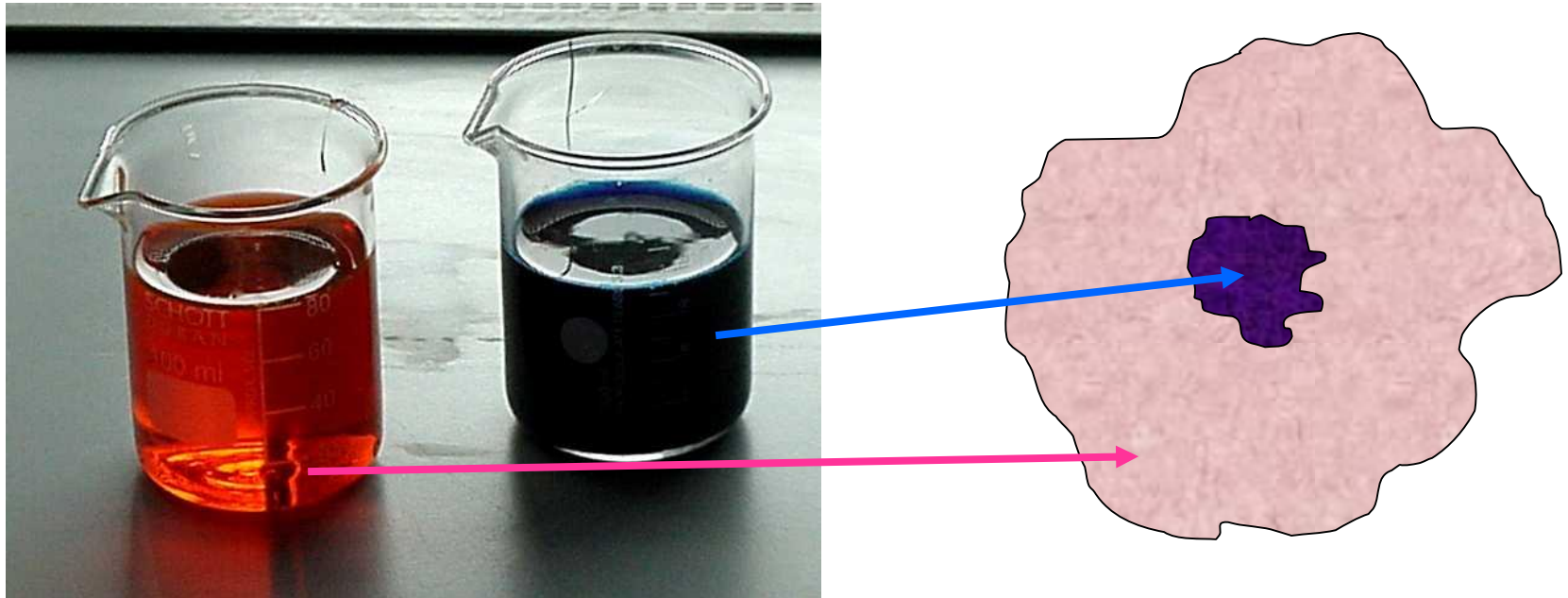
I coloranti normalmente utilizzati in istologia sono preparati in **soluzioni acquose** o in **soluzioni alcoliche** partendo da sostanze naturali (di origine animale o vegetale) o da composti sintetici.

In soluzione essi si scompongono in forma ionica e sono in grado di legarsi chimicamente ai costituenti organici delle cellule e dei tessuti

COLORANTI ACIDI E BASICI

colorante acido

colorante basico



I **coloranti basici** si legano ed evidenziano selettivamente le componenti **acide** o **basofile** delle cellule (cromatina nucleare e ribosomi).

I **coloranti acidi** viceversa svelano le componenti **basiche** o **acidofile** delle cellule (matrice citoplasmatica).

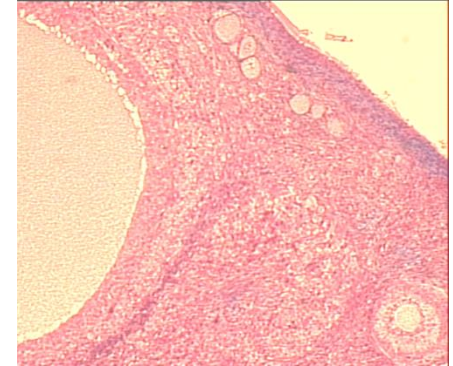
COLORANTI ACIDI E BASICI



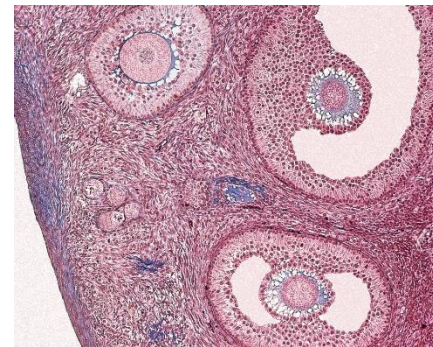
E' importante considerare che condizioni differenti (temperatura, pH, concentrazione del colorante, tempi, permeabilità delle strutture tingibili) controllano il risultato finale della colorazione..

COLORAZIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE: colorazioni topografiche

1) EMATOSSILINA EOSINA

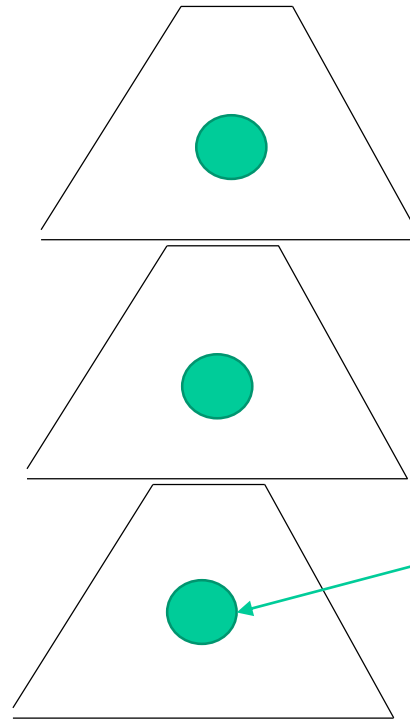


2) METODO AZAN



Prelievo
Fissazione
Lavaggio
Disidratazione
Chiarificazione
Inclusione
Sezionamento
Reidratazione
Colorazione
Disidratazione
Montaggio
Osservazione

Sezioni seriali

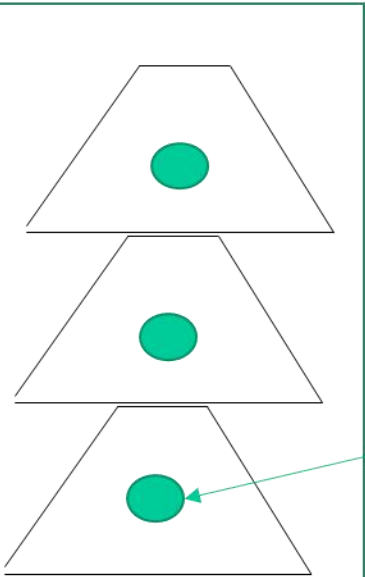


Reidratazione

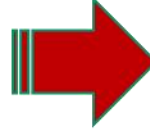
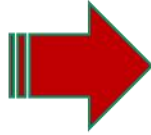
*vetrino 1, tessuto xxx
sezioni da 1-3
Data xxxx*

Le sezioni seriali incluse raccolte sul vetrino per essere sottoposte a procedura di colorazione, previa **Reidratazione**. Infatti, poiché i coloranti per la maggior parte sono acquosi, è necessario reinserire H₂O all'interno del tessuto incluso nella Paraffina che è apolare e idrofoba.

Reidratazione



vetrino 1, tessuto xxx
sezioni da 1-3
Data xxxx



Le sezioni sono poste in
solvente di transizione *Xilene*
per essere sparaffinate

- Alcool etilico 100° (due cambi)
- Alcool etilico 95°
- Alcool etilico 90°
- Alcool etilico 80°
- Alcool etilico 70°
- Alcool etilico 50°
- H₂O distillata



Le sezioni sono ora pronte
per la Colorazione

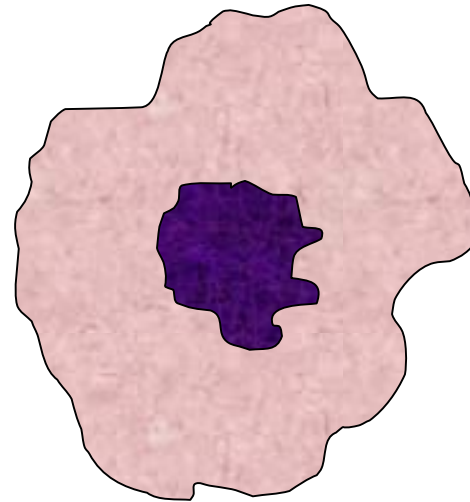
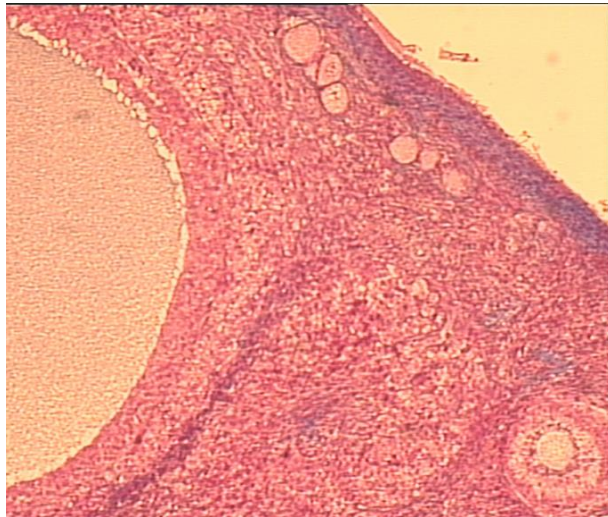


COLORAZIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE:

Colorazioni topografiche

1) EMATOSSILINA EOSINA

E' la colorazione più utilizzata in istologia. E' basata sulla successiva applicazione di un **colorante basico** (denominato impropriamente "**ematossilina**") e di un **colorante acido** ("**eosina**").



COLORAZIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE: Colorazioni topografiche

1) EMATOSSILINA EOSINA

Reattivi

Emallume di Mayer

sciogliere a caldo in ½ lt d'acqua distillata 1 gr di ematossilina e 50 gr di allume di potassio. Una volta raffreddato aggiungere 0,2 gr di iodato di sodio sciolto in 50 cc di acqua distillata, 50 gr di cloralio idrato ed i gr di ac. citrico sciolto in 450 cc di acqua distillata. Filtrare con carta bibula.

Soluzione di eosina

Eosina blaulich gr 0.5 in 100 cc di alcol 50°
o eosina gr 1 in 100 cc di acqua distillata

Metodica

Dall'acqua immergere le sezioni in emallume per 2'-4'; sciacquare in acqua di fonte e lasciare in sosta per 10' fino al viraggio al blu. Sciacquare in acqua distillata ed immergere in eosina per 1'-2' e senza lavare serie ascendente di alcoli; poi xilolo e montaggio.

LA COLORAZIONE EMATOSSILINA - EOSINA

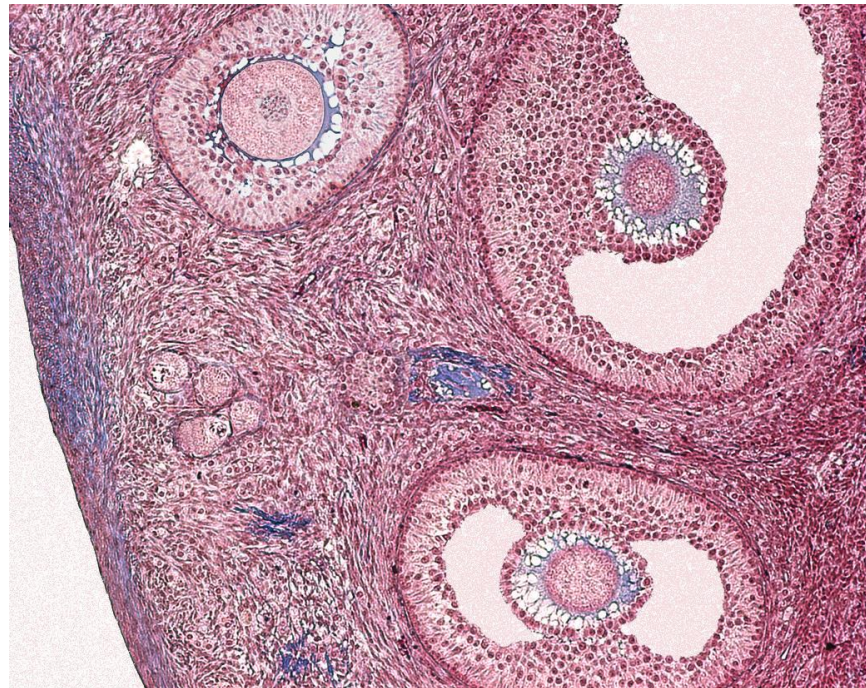
Le fasi della colorazione	Osservazioni
Sparaffinare le sezioni e portarle all'H ₂ O attraverso la serie discendente degli alcoli.	Poiché i coloranti sono in soluzione acquosa occorre prima togliere la paraffina intorno alle fette e poi reidratarle fino all'acqua distillata.
Passare i vetrini in Emallume di Mayer per 1 minuto e 30 sec.	Qui i vetrini soggiornano nel colorante immersi in un apposito recipiente detto copling jar.
Virare per 1 minuto e 30 sec in acqua di fonte.	In questa fase, eseguita allo scopo di stabilizzare il colorante, si ha il <u>viraggio</u> del colorante a blu dando stabilità ai legami.
Passare in Eosina per 30 secondi.	Anche qui i vetrini soggiornano nel colorante immersi nel copling jar.
Sciacquare brevemente in Acqua Distillata.	10 - 15 secondi.
Disidratare velocemente nella serie ascendente degli alcoli.	Occorre eseguire passaggi veloci nella serie ascendente degli alcoli in quanto, soprattutto negli alcoli a bassa gradazione, viene rimossa l'eosina. Ci si può fermare solo in alcool assoluto.
Montare con balsamo.	Poiché il balsamo è insolubile sia in acqua che in alcool ecco lo scopo della disidratazione delle fette successiva alla colorazione e il loro passaggio in un solvente del balsamo (xilene).

COLORAZIONE DELLE SEZIONI ISTOLOGICHE:

Colorazioni topografiche

2) METODO AZAN

E' un buon metodo per colorare il connettivo ed anche per allestire preparati d'insieme. I nuclei risulteranno colorati in rosso, il citoplasma in arancio ed il connettivo in blu.



METODO AZAN

Le fasi della colorazione	Osservazioni
Sparaffinare le sezioni e portarle all'H ₂ O attraverso la serie discendente degli alcoli.	Poiché i coloranti sono in soluzione acquosa occorre prima togliere la paraffina intorno alle fette e poi reidratarle fino all'acqua distillata.
Passare i vetrini in Azocarminio e ac. Acetico 1% in stufa a 56° C per 45 minuti.	Qui i vetrini soggiornano nel colorante capovolti in un apposito recipiente chiuso detto copling jar.
Lasciare raffreddare per 10 min e poi sciacquare brevemente in Acqua Distillata .	In questa fase, togliamo l'eccesso di colorante.
Passare in Olio di Anilina 0,1% in EtOH 90° per 10min.	Anche qui i vetrini soggiornano nel colorante capovolti nel copling jar per <u>differenziare i nuclei</u> .
Lavare per 1 min in EtOH 95° e ac. Acetico 1%	Anche qui i vetrini soggiornano nella soluzione capovolti nel copling jar <u>per mordenzare la colorazione</u> .
Passare in Ac.fosfowolframico (o ac. fosfotungstico) per 1h.	Per moderare l'attività di alcuni coloranti specifici per le fibre collagene quale il Blu di Anilina.
Colorare i vetrini nella miscela di Azan per 30 min.	Diluire la miscela in proporzione 1:3 con Acqua Distillata.
Differenziare in EtOH 95° .	Controllare il grado di differenziazione con un MO.
Disidratare velocemente nella serie ascendente degli alcoli e <u>Montare con balsamo</u> .	Poiché il balsamo è insolubile sia in acqua che in alcool ecco lo scopo della disidratazione delle fette successiva alla colorazione e il loro passaggio in un solvente del balsamo (xilene).

Montaggio delle sezioni colorate

- Dopo la colorazione, il preparato viene montato,
- in tale modo il tessuto viene imbibito da una sostanza con lo stesso indice di rifrazione del vetro
- inoltre viene racchiuso tra due strati di vetro (portaoggetto-coprioggetto), con il mezzo di montaggio interposto
- Ciò fa sì che la luce non venga rifratta nel passaggio attraverso i vari strati.
- Il vetrino portaoggetto è più spesso, di forma rettangolare
- il vetrino coprioggetto è più sottile

Mezzi di montaggio non idrosolubili

i mezzi di montaggio possono essere non idrosolubili o idrosolubili

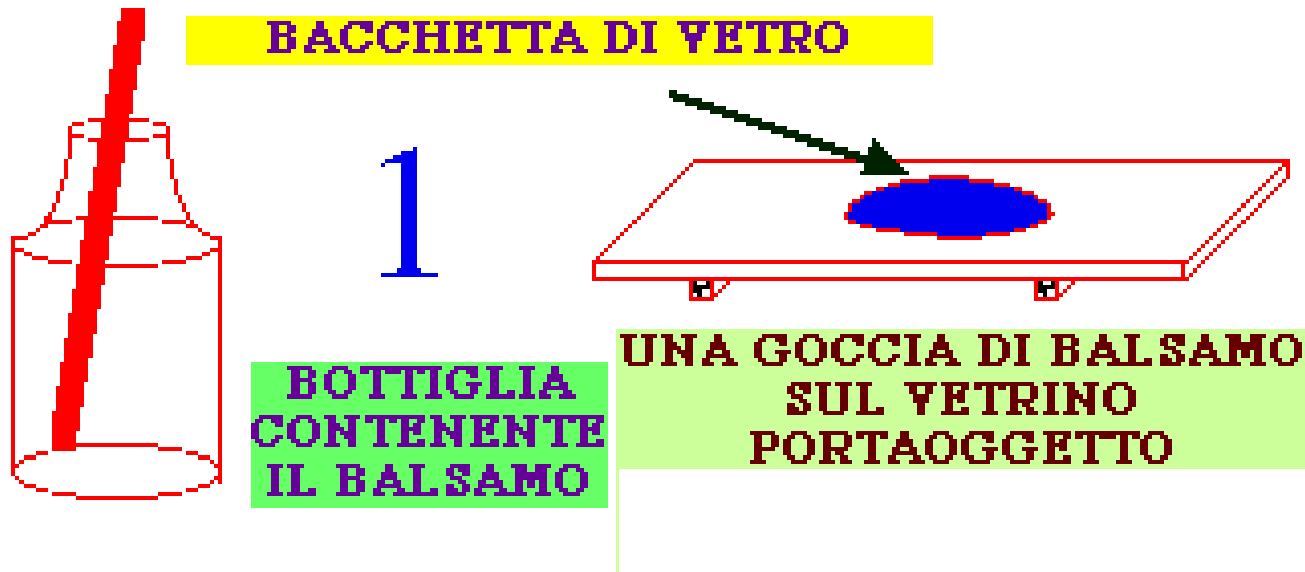
- I mezzi di montaggio **non idrosolubili** sono usati **più frequentemente**
- si tratta per lo più di **resine sintetiche** che garantiscono preparati stabili, al riparo dalla polvere e dall'essiccamento, con mantenimento nel tempo del colore del preparato
- **Naturali :**
 - balsamo del Canada (terpeni, ac. Carbossilico ed esteri),
 - Balsamo dammara
 - Camsal, Euparal
- **Sintetici**
 - Composti stabili inerti solubili in xilolo; prodotti commerciali: Permunt Picolite, Klermount , DPX, Clearmount, Polymount

Mezzi di montaggio idrosolubili

- I mezzi di montaggio **idrosolubili** si impiegano allorché la **natura del substrato** (ad esempio, lipidi) o il mezzo di colorazione **non consentano la disidratazione e la diafanizzazione**
- molto usato è il **glicerolo**, da **solo** o **in soluzione con gelatina**.
- Vengono usate insieme anche altre **sostanze che solidificano in acqua** (gomma arabica, gelatina) oppure **aumentano l'indice di rifrazione** (Sali o zuccheri) o **impediscono lo sviluppo di muffe** (fenolo, timolo)
- I preparati montati con mezzi idrosolubili **vanno lutati**, cioè sigillati lungo il bordo del vetrino coprioggetto (con **ceralacca** o altro mezzo analogo), per impedire l'essiccamento e l'insudiciamento del mezzo di montaggio.
- **Esempi:** Sciroppo di Apathy, Gelatina di Heringa
- **Commerciali:** Acquamount, Karion, Glicerol.gelatine

Il Montaggio dei Vetrini

Mentre i vetrini colorati soggiornano nell'ultimo recipiente contenente Xilolo, si preparano i coprioggetto. Con le pinze si prende il vetrino dallo Xilolo, il cui eccesso viene fatto sgocciolare via tenendo il vetrino verticale sul recipiente che lo conteneva. Successivamente i vetrini colorati vengono adagiati su appropriati supporti, e dal recipiente contenente il "balsamo" se ne preleva una piccola quantità con una bacchetta di vetro e si pone una goccia, o più secondo le dimensioni dei coprioggetti da montare, alla periferia e al centro del portaoggetto:



Il Montaggio dei Vetrini

Tenendo il vetrino coprioggetto angolato di 45° rispetto al portaoggetto lo si avvicina alla goccia di balsamo finchè il suo bordo arriva a toccarla e lo si adagia senza che rimangano bolle d'aria. Si lascia asciugare :

