

Brasília, DF
Dezembro, 2017

Autores

Valérya Carneiro Teles
Engenheira de alimentos,
mestre em Biotecnologia,
bolsista da Embrapa
Agroenergia, Brasília, DF,
valerya.teles@colaborador.
embrapa.br

Larissa Andreani
Química, doutora em Físico-
Química, analista da Embrapa
Agroenergia, Brasília, DF,
larissa.andreani@embrapa.br

Leonardo Fonseca Valadares
Químico, doutor em Físico-
Química, pesquisador da
Embrapa Agroenergia, Brasília,
DF, leonardo.valadares@
embrapa.br

Uso de Microscopia de Luz e Eletrônica como Técnicas de Análise Morfológica

Introdução

A história da microscopia é muito antiga, voltando até o início do século 17, quando a palavra “microscópio” foi usada pela primeira vez. Essa palavra tem origem do grego, da junção de *mikros* (pequeno) e *skopein* (examinar). Porém, o aperfeiçoamento do microscópio é atribuído ao holandês Antony van Leeuwenhoe que, em 1674, construiu um equipamento com capacidade de magnificação de cerca de 300 vezes do objeto analisado, permitindo a observação de bactérias (SOUZA, 2010). Desde então, diversos pesquisadores têm se dedicado ao desenvolvimento de novos equipamentos e novas aplicações das técnicas de microscopia, que têm permitido a observação de estruturas cada vez menores.

De maneira simples, a principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho nu o que for muito pequeno para tal. A microscopia, por sua vez, é o uso interpretativo do microscópio.

A microscopia envolve conceitos tais como magnificação, resolução e foco, e o domínio desses conceitos é de fundamental importância para o microscopista. A magnificação de um microscópio é o grau de aumento da imagem obtida em comparação com o objeto analisado, enquanto seu poder de resolução é definido como a menor distância entre dois pontos, os quais podem ser diferenciados na amostra em análise. Por fim, o conceito de foco diz respeito à distância da lente (ou espelho) onde os raios de luz convergem. O foco é importante, pois é necessário colocar a amostra nessa distância para que a sua imagem ampliada se apresente de forma definida.

Esta circular técnica visa à divulgação das técnicas de microscopia de luz e eletrônica de forma acessível, com indicações de aplicações nos campos da ciência de materiais e biologia.

Para tanto, a Figura 1 mostra um desenho esquemático com as principais partes ópticas do microscópio de luz e do microscópio eletrônico, em modo de transmissão.

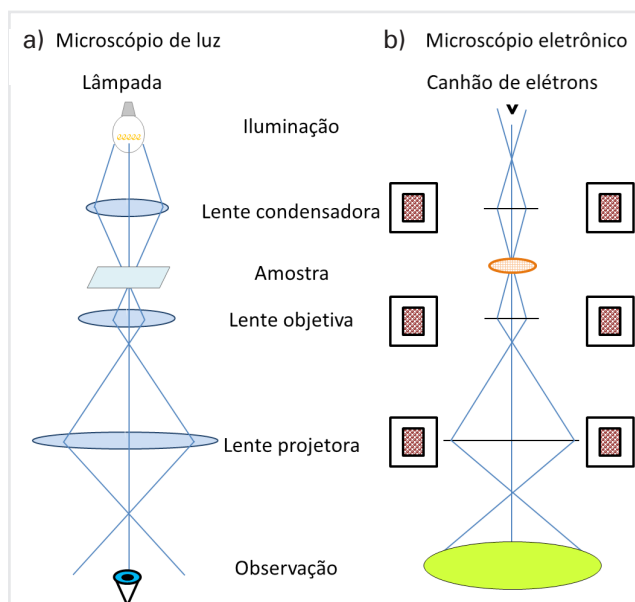


Figura 1. Esquema mostrando as principais partes ópticas do microscópio de luz e do microscópio eletrônico, em modo de transmissão. Esses tipos de microscopia têm os seguintes elementos em comum: iluminação (uma lâmpada ou um canhão de elétrons); lente condensadora, que direciona o feixe; a amostra, que é o objeto de análise colocado na posição correta em relação ao feixe; lente objetiva; lente projetora; observação e registros de imagens.

A seguir, será explicado como essas partes funcionam nos respectivos microscópios.

Microscopia de luz

No microscópio de luz, a fonte de iluminação é normalmente a luz visível (comprimento de onda de 3.900 Å a 7.000 Å), que é colimada (a fim de concentrar e direcionar os raios de luz) através de uma lente de materiais dielétricos (ou vidros óticos). Essa luz colimada incide na superfície do espécime, interage com as estruturas da amostra e atravessa as lentes objetiva e ocular, projetando uma imagem ampliada da superfície da amostra no olho do observador ou em câmera fotográfica (GOLDSTEIN et al., 1992). Assim, o microscópio de luz amplia a resolução de um objeto utilizando luz e lentes.

Os principais componentes desses microscópios, descritos na ordem em que se apresentam no caminho óptico, são:

- 1) Fonte de luz – é normalmente uma lâmpada incandescente, apesar de diversas outras fontes serem também usadas, como luz solar ou ambiente, lasers, lâmpadas led (*light-emitting diode*) ou lâmpadas UV.
- 2) Lente condensadora – tem a função de colimar o feixe de luz, aumentando a intensidade luminosa e tornando a iluminação uniforme na amostra.
- 3) Platina – é o local onde se colocam as lâminas de vidro.
- 4) *Charriot* – é o mecanismo mecânico, construído com botões e fusos com os quais se pode posicionar perfeitamente a platina e, conseqüentemente, a amostra em relação ao feixe, de modo que o operador pode colocar a amostra em foco e selecionar o campo a ser analisado.
- 5) Lente objetiva – é a lente responsável pela ampliação da amostra com resolução.
- 6) Lente ocular – amplia e projeta a imagem no olho do observador ou na câmera fotográfica.
- 7) Equipamento de registro de imagens – é uma câmera fotográfica analógica ou digital.

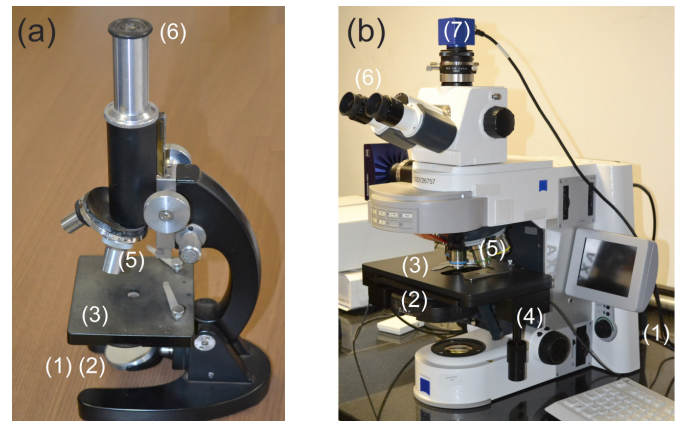


Figura 2. Fotografias mostrando (a) um microscópio de luz simples e (b) microscópio de luz contemporâneo. As seguintes partes estão mostradas: (1) fontes de luz, (2) lentes condensadoras, (3) platina, (4) *charriot* (fusos que movimentam a amostra), (5) lentes objetivas, (6) lentes oculares e (7) câmera fotográfica digital.

Fotos: Leonardo Fonseca Valadares

Cabe ressaltar que diversos avanços recentes da microscopia de luz têm origem nas câmeras fotográficas digitais e tratamentos de imagens por métodos computacionais. Por meio desses equipamentos, é possível registrar grande número de imagens, realizar tratamento de imagens digitais, identificar estruturas automaticamente, obter imagens com baixa iluminação, além da montagem de imagens em mosaico, varredura da profundidade da amostra em diversos focos e realização de séries temporais (vídeos) de objetos em movimento.

Existem dois fatores muito importantes na microscopia de luz. O primeiro é o poder de resolução, que nesse tipo de análise resolve objetos de dimensão de cerca de 1 μm . Ampliações superiores não fornecem informações adicionais. O segundo é o foco e, para que uma superfície possa ser analisada perfeitamente em foco, é necessário que seja bastante plana e esteja perfeitamente perpendicular ao eixo óptico. Assim, lâminas de vidro são utilizadas para planificar a amostra e deve-se tomar cuidados com o possível arredondamento dos cantos durante o polimento, para obtenção de uma boa amostra (COLPAERT, 2008).

Na microscopia de luz, para aumentar a resolução, pode-se utilizar uma radiação com comprimento de onda menor que a luz visível como fonte de iluminação do objeto, como a luz ultravioleta (UV). Além disso, a profundidade de campo é inversamente proporcional aos aumentos, sendo necessário, então,

um polimento perfeito da superfície a ser observada, o que às vezes é incompatível com a observação desejada (KESTENBACH, 1994).

Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica baseia-se no princípio de que o elétron possui comportamento ondulatório e, assim como a radiação eletromagnética da luz, o feixe eletrônico pode ser ampliado, colimado e guiado.

Como vantagem, o feixe eletrônico é gerado com comprimento de onda que é função da voltagem de aceleração dos elétrons, sendo possível obter feixes monocromáticos com comprimentos de onda muito menores que a luz visível, possibilitando melhor resolução dos equipamentos. Entretanto, o feixe eletrônico é bastante diferente da luz, pois não se propaga na matéria por seu baixo poder de penetração. Assim, a coluna do microscópio eletrônico opera a vácuo, as lentes são magnéticas e, para que o feixe seja transmitido, as amostras devem ser muito finas ($< 50\text{ nm}$), resultando em equipamentos mais caros e preparação de amostras mais complexas, quando comparado à microscopia de luz.

Embora existam técnicas que utilizem a varredura e a transmissão ao mesmo tempo, a microscopia eletrônica se divide em duas grandes categorias: a microscopia eletrônica de varredura – *Scanning Electron Microscopy* (SEM) – e a microscopia eletrônica de transmissão – *Transmission Electron Microscopy* (TEM). De modo simplificado, na SEM os elétrons (que são os sinais formadores das imagens) são coletados acima da amostra, possibilitando a análise de amostras espessas. Já na TEM, o feixe é coletado abaixo da amostra; assim, a fração do feixe que atravessa a amostra compõe o sinal formador da imagem.

Essas duas técnicas de microscopia eletrônica possuem diversos componentes em comum: canhão eletrônico, lentes magnéticas, *charriot*, anteparo fluorescente, câmera para registro de imagens, sistema de vácuo e tanque de alta tensão. A Figura 3 mostra uma fotografia de um microscópio eletrônico de varredura.



Figura 3. Fotografia mostrando um microscópio eletrônico contemporâneo.

Foto: Leonardo Fonseca Valadares

No microscópio eletrônico, o feixe eletrônico é gerado por um dispositivo chamado canhão de elétrons. No canhão de elétrons convencional, os elétrons são gerados por aquecimento resistivo de um filamento de tungstênio em forma de “V”, ao qual é aplicada a alta tensão; esse tipo de canhão de elétrons funciona por emissão termiônica. Já no canhão por emissão de campo – *Field Emission Gun* (FEG) –, os elétrons são gerados em uma ponta fina de monocristal de tungstênio, onde é aplicado um forte campo elétrico. A emissão de campo gera um feixe de menor diâmetro e de menor corrente, possibilitando melhor resolução quando comparado à emissão termiônica.

As lentes magnéticas são bobinas através das quais passa o feixe de elétrons. Quando uma corrente elétrica passa pela bobina, é gerado um campo magnético que colima o feixe. A corrente elétrica gera calor, sendo necessário um sistema de resfriamento para esse tipo de lente. Diferentemente da lente de vidro, a lente magnética muda a distância de foco, de acordo com o campo magnético.

O *charriot* tem a função de inserir, posicionar, deslocar e inclinar a amostra.

Para tornar visível o feixe eletrônico, é necessário um anteparo fluorescente ou uma câmera para registro de imagens. Assim, o efeito da interação do feixe com a amostra pode ser observado no anteparo impregnado com material fluorescente que, quando atingido pelo feixe, emite luz visível (normalmente verde). Uma lupa acoplada ao microscópio eletrônico

pode ser usada para facilitar a visualização. Câmeras fotográficas ou filmadoras podem ser usadas para captar e registrar as micrografias.

O sistema de vácuo é necessário nos microscópios eletrônicos. De modo geral, o sistema de vácuo é constituído de bombas de vácuo em cascata, sendo normalmente utilizadas as bombas mecânicas para a obtenção do baixo vácuo, e bombas difusoras e/ou turbomoleculares para o alto vácuo.

Já o tanque de alta tensão gera a diferença de potencial para o canhão de elétrons. No SEM a diferença de potencial está na faixa entre 100 V a 30.000 V. No TEM essa faixa normalmente encontra-se entre 50.000 V e 200.000 V.

A SEM utiliza um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, que explora a superfície da amostra ponto a ponto, por linhas sucessivas. Para tanto, o feixe de elétrons (λ entre 0,07 Å a 0,5 Å) é colimado por lentes magnéticas a fim de gerar um feixe de seção transversal circular e com o menor diâmetro possível. Esse feixe colimado atravessa um conjunto de lentes que tem a função de guiar o feixe de modo a traçar um padrão de varredura sobre a superfície da amostra. Um detector capta os feixes dos elétrons “refletidos” a cada instante e, com precisão eletrônica, forma uma imagem da superfície da amostra ampliada em milhares de vezes.

O desenvolvimento da SEM permitiu a geração de imagens com riqueza de detalhes, revelando a topografia dos espécimes com resolução espacial e profundidade de campo significativamente superior às obtidas nas lupas. Tais características contribuíram para a popularização da microscopia eletrônica (SOUZA, 2007).

Os parâmetros que mais influenciam na resolução da imagem em SEM são: a) tensão de aceleração dos elétrons, pois quanto maior a tensão menor o comprimento de onda do feixe; b) corrente da sonda: quanto maior a corrente, maior é o diâmetro do feixe; c) a distância de trabalho, que é a distância entre a amostra e a lente objetiva. Quanto menor a distância de trabalho, melhor será a resolução. Por outro lado, quanto maior a distância de trabalho, maior será a profundidade de campo obtida.

Preparação de amostras

A obtenção e a preparação de amostras de qualidade é um passo essencial para a obtenção de boas imagens e bons resultados de microscopia. Na verdade, o microscópio vai revelar a amostra. Para obter bons resultados, é necessário que a amostra esteja bem preparada e seja representativa.

A preparação de amostras é um tópico extenso que deve ser estudado caso a caso. Aqui, o texto pretende apresentar apenas alguns conceitos e pré-requisitos para a preparação de amostras. Para informações detalhadas e bons exemplos de preparação de amostras, recomenda-se os livros Souza (2007) e Souza (2010).

Na microscopia de luz, o porta-amostras comumente utilizado é a lâmina de vidro. Uma lâmina típica possui as dimensões de 76 mm × 25 mm × 1,1 mm, é extremamente plana e transparente. Sobre a lâmina, deposita-se a amostra sólida ou líquida sobre a qual se pode colocar uma lamínula de vidro, que tem a função de tornar a amostra mais plana e/ou tornar possível o uso da lente de imersão.

A preparação de amostra pode ser simples, como pulverizar a amostra sobre a lâmina, mas também pode ser laboriosa, como no caso dos cortes histológicos. Nesse caso, é necessário embutir (ou emblocar) a amostra em resina, para gerar um bloco que é cortado em fatias por um equipamento chamado micrótomo. Assim, cada fatia pode ser analisada no microscópio de luz.

Outro procedimento comum é o coramento das amostras. Assim, estruturas transparentes podem ser impregnadas com corantes: cromóforos que se fixam em estruturas específicas da amostra, revelando sua morfologia.

No caso da microscopia eletrônica, a preparação é bem diferente. Na maioria dos casos, a amostra precisa estar completamente seca e ser condutora de eletricidade. O porta-amostra é metálico para a condução de corrente e seu formato é compatível com o equipamento de SEM. Esse porta-amostra é conhecido como *stub*. Para fixar a amostra sobre a sua superfície, utiliza-se uma fita de carbono, que também é condutora.

Na SEM, a superfície da amostra precisa conduzir eletricidade. Assim, as amostras isolantes precisam ser recobertas com uma fina camada condutora, em um procedimento chamado metalização. A metalização é realizada pelo processo de deposição catódica a frio (*sputtering*), que permite depositar camadas extremamente finas (da ordem de poucos nanômetros) de ouro, platina, cromo, etc. Outra forma de metalização é a evaporação de carbono, em que um filamento de carbono em vácuo (para não combuster) é aquecido pela passagem de corrente elétrica, e o material evaporado recobre a superfície da amostra. Essa camada metálica permite a dissipação das cargas elétricas estáticas, oriundas do feixe e hoje existem diversos equipamentos destinados à metalização para a SEM.

Para a TEM, é importante que a amostra seja muito fina, menor que 50 nm, o que torna a preparação de amostra normalmente mais delicada. Na TEM a preparação de amostras é realizada em pequenas telas metálicas (ou *grids*) de 3 mm de diâmetro. Essas telas podem ser recobertas com filmes finos para suportar a amostra.

Há diversas formas de preparação, como a diluição de amostras coloidais e gotejamento sobre uma tela recoberta. Outra forma é a ultramicrotomia, que fatia a amostra com espessura menor que 50 nm, possibilitando a obtenção de bom contraste. Outra forma é a moagem de amostra para deposição sobre a tela. De todo modo, a forma de preparação de amostra irá ser o principal elemento para a obtenção de bons resultados e as técnicas empregadas possibilitam a análise morfológica de seus componentes específicos (SOUZA, 2007).

Aplicações

As técnicas de microscopia de luz e eletrônica, quando utilizadas conjuntamente com outros métodos de caracterização, são de grande valia para a definição de propriedades importantes de materiais – tais como polímeros, cerâmicas e metais – e para o estudo da anatomia vegetal, detecção de bactérias, localização *in situ* de genes, entre outras aplicações da área biológica. Deve ser levado em conta que a microscopia de luz apresenta um limite de resolução mais baixo que a microscopia eletrônica devido a efeitos de difração (HOLLER et al., 2009)

e, portanto, essas duas formas de microscopia são utilizadas em aplicações distintas.

Na área de ciência de materiais, a microscopia de luz permite a obtenção de informações a respeito da superfície de amostras. Por exemplo, He et al. (2015) utilizaram essa técnica para analisar compósitos de bambu e polianilina, o que permitiu identificar que as partículas de polianilina apresentavam-se distribuídas homogeneamente ao longo da estrutura do bambu, como demonstrado na Figura 4. Látex de base acrílica reforçado com polímeros de cristais líquidos foram preparados por Mehravar et al. (2017). Os autores utilizaram, entre outras técnicas, a microscopia de luz polarizada para demonstrar que a estrutura do polímero de cristal líquido é mantida no compósito formado. Já Moghaddasi et al. (2017) utilizaram a microscopia de luz para verificar o efeito de nanopartículas de óxido de zinco em raízes de pepino em solo adubado e não adubado. Essa técnica indicou que, em altas concentrações de nanopartículas, ocorreu a deformação radicular das plantas em solo não adubado, fator que pode levar à inibição do crescimento da planta e redução da absorção de nutrientes pela raiz.

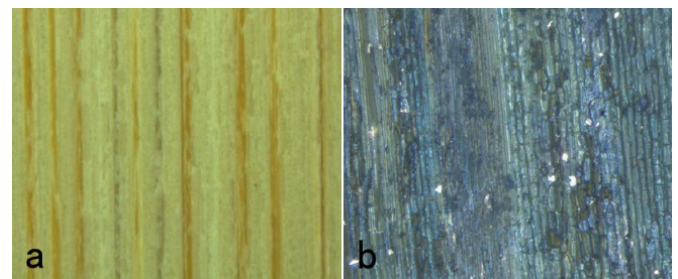


Figura 4. Microscopia de luz de (a) bambu não modificado e (b) compósito de bambu e polianilina (HE et al., 2015).

Mais relevante ainda é a aplicação da microscopia de luz para a biologia, por permitir o estudo de cortes histológicos e células após tratamentos específicos para sua visualização e, mais recentemente, a observação de células *in vivo* e análise de processos biológicos utilizando técnicas avançadas de microscopia de luz (SOUZA, 2010). Matias et al. (2016) determinaram a estrutura e histoquímica de 5 espécies de *Solanum* que ocorrem no cerrado com o objetivo de aumentar o conhecimento em plantas medicinais nativas. Esse tipo de estudo é importante, pois colabora na preservação de espécies medicinais do ecossistema brasileiro, e foi totalmente

baseado na microscopia de luz com coramento das amostras analisadas. Exemplos das imagens obtidas por esse grupo estão apresentados na Figura 5. A microscopia de luz também foi utilizada por Vasconcellos et al. (2017) em um estudo que indicou diferenças significativas entre a histologia cambial de paineiras da Floresta Tropical Atlântica crescidas em ambientes poluídos quando comparadas com paineiras crescidas em ambientes preservados.

Esses estudos citados acima utilizaram técnicas de preparação de amostras tais como coramento e fixação, ou seja, são métodos destrutivos. Mas a microscopia de luz também abre a possibilidade de estudos não destrutivos. Com o objetivo de estudar a morfogênese de plantas *in vivo*, Jerominek et al. (2014) desenvolveram um método observacional baseado em microscopia de luz com epi-iluminação (luz refletida). Utilizando essa técnica, os autores conseguiram acompanhar o meristema de uma planta em crescimento por 30 dias.

Em comparação com a microscopia de luz, a microscopia eletrônica possibilita a observação microscópica com resolução muito maior. Existem diversos métodos de microscopia eletrônica, entre os quais se destacam a microscopia eletrônica de

varredura e a microscopia eletrônica de transmissão como os mais relevantes (HOLLER et al., 2009). A microscopia eletrônica permite a obtenção de informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de materiais metálicos, ligas metálicas, cerâmicas, polímeros, materiais semicondutores, entre outros, tanto na sua forma bruta quanto partículas e fibras de alguns dos materiais citados (WILLIAMS; CARTER, 2009). Destacamos aqui a importância da microscopia eletrônica para o estudo morfológico de materiais preparados a partir de polímeros naturais. Alemdar e Sain (2008) publicaram um estudo em que descrevem o isolamento e caracterização de nanofibras de celulose a partir de palha de trigo e casca de soja, dois resíduos agrícolas. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a morfologia das fibras de celulose antes da sua conversão a nanofibras. Já a microscopia eletrônica de transmissão forneceu informações a respeito do diâmetro e comprimento das nanofibras obtidas. Os resultados de microscopia eletrônica (demonstrados na Figura 6), aliados a outros métodos de caracterização utilizados neste estudo, permitiram aos autores indicar aplicações potenciais para as nanofibras analisadas. Estudo similar foi publicado por Teixeira et al. (2011), porém utilizando bagaço

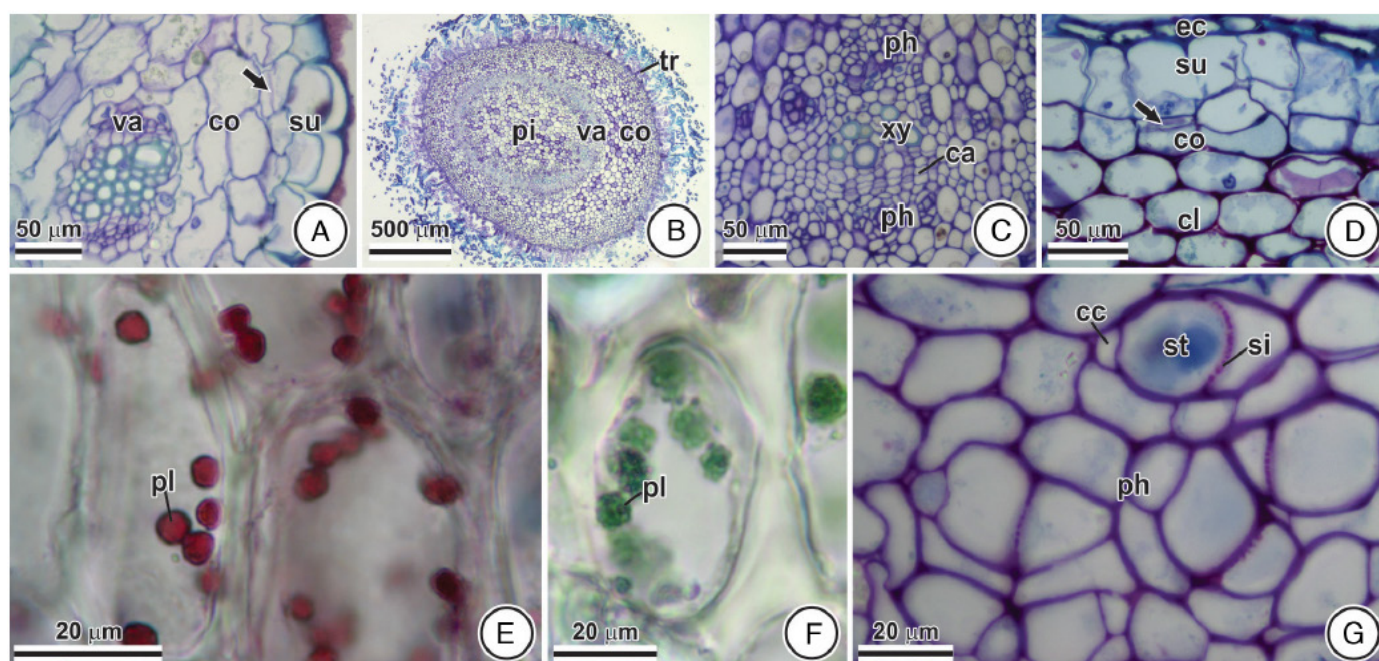
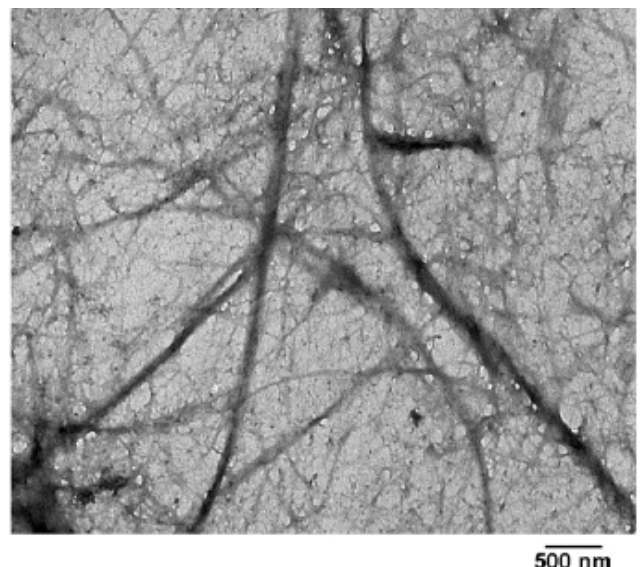
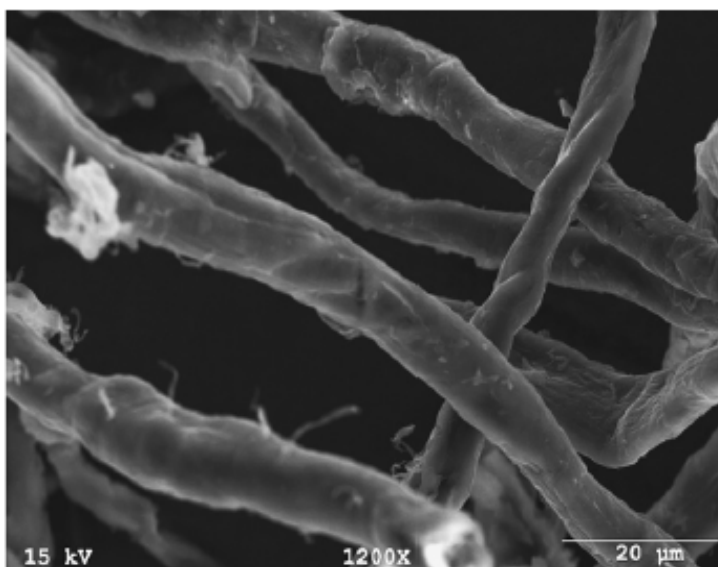


Figura 5. Características estruturais e histoquímicas da espécie *Solanum lycocarpum* observadas por Matias et al. (2016).

de cana-de-açúcar para a obtenção de *whiskers* (fibras de celulose de espessura nanométrica). A microscopia eletrônica de varredura por transmissão (STEM) forneceu informações sobre a estrutura das nanofibras formadas, que apresentaram formato de agulha, além de possibilitar a determinação do comprimento e diâmetro dessas fibras. Técnicas de microscopia eletrônica também foram utilizadas por Edathil et al. (2017) para caracterizar materiais preparados a partir da pirólise de alginato de cálcio, com o objetivo de efetuar a remoção de sulfeto de águas residuais. A estrutura formada após a pirólise foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão e a morfologia do material antes e após a adsorção de sulfeto foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Já Mor et al. (2017) realizaram a extração de nanopartículas de sílica de cinzas de casca de arroz, resultante do processamento desse resíduo agrícola. A microscopia eletrônica de varredura indicou a obtenção de partículas em formato esférico com pouca ocorrência de aglomeração; já a microscopia eletrônica de transmissão forneceu detalhes a respeito da morfologia interna das partículas e possibilitou a determinação da dimensão das esferas formadas.

No campo biológico, a microscopia eletrônica é uma ferramenta que auxilia no conhecimento da bioquímica, fisiologia e biologia molecular. Aqui, é essencial a utilização de técnicas de preparo do material para que sejam preservados o conteúdo iônico e demais características estruturais das amostras analisadas. Kovács reportou, em 2015, um método de preparação de amostras de *C. elegans* para estudos de autofagia utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. Segundo o autor, essa técnica de microscopia é de extrema importância para o estudo de processos autofágicos devido ao tamanho reduzido das estruturas celulares que participam desse processo. Leroy et al. (2017) utilizaram a microscopia eletrônica de transmissão para verificar a presença de hifas fúngicas no tecido da planta *Hirtella physophora* em um estudo que teve por objetivo investigar a participação do fungo *Trimmatostroma* sp. na transferência de nutrientes para o tecido da planta, que apresenta um mutualismo tripartido formiga-planta-fungo. Por meio da microscopia eletrônica, foi possível observar hifas no interior do tecido celular das plantas e, em combinação com outros métodos analíticos, os autores concluíram que há envolvimento direto do fungo na transferência de nitrogênio para a planta. Vindigni e Lopes (2017), por sua vez, apresentaram



Figuras 6. Microscopias eletrônicas de varredura e transmissão de fibras e nanofibras obtidas a partir de palha de trigo (ALEMDAR; SAIN, 2008).

um estudo em que combinam a microscopia eletrônica com outras técnicas de análise do DNA para obter informações a respeito do seu estresse de replicação. Em particular, micrografias eletrônicas como a da Figura 7 foram utilizadas na visualização de intermediários de replicação do DNA e podem ser utilizadas para detectar descontinuidades e perturbações na replicação do ácido desoxirribonucleico.

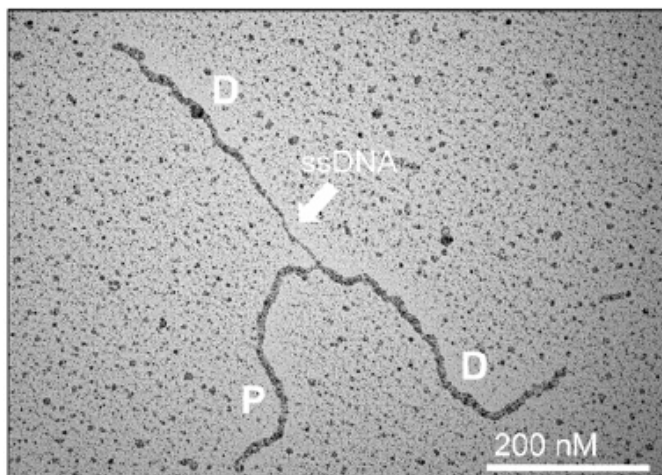


Figura 7. Micrografia eletrônica de um garfo de replicação obtido por Vindigni e Lopes (2017).

Resultados provenientes da utilização das diversas técnicas de microscopia de luz e eletrônica têm auxiliado pesquisadores em diferentes áreas de concentração. Os casos citados aqui representam apenas uma pequena parcela das aplicações em que essas técnicas podem ser utilizadas.

Referências

- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 99, n. 6, p. 1664-1671, 2008.
- COLPAERT, H. **Metalografia dos produtos siderúrgicos comuns**. 4. ed. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2008. 652 p.
- EDATHIL, A. A.; PAL, P.; BANAT, F. Alginate derived porous graphitic carbon for highly efficient remediation of sulfide from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Oxon, v. 5, n. 2, p. 1998-2009, 2017.
- GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY, D. E.; ECHLIN, P.; JOY, D. C.; ROMIG, Jr. A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-Ray microanalysis**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1992. 805 p.
- HE, W.; ZHANG, X.; YU, C.; HUANG, D.; LI, Y. Synthesis of bamboo/polyaniline composites by in situ polymerization and their characteristics. **BioResources**, Raleigh, v. 10, n. 2, p. 2969-2981, 2015.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.
- JEROMINEK, M.; BULL-HERENU, K.; ARNDT, M.; CLAÏEN-BOCKHOFF, R. Live imaging of developmental processes in a living meristem of *Davidia involucreata* (Nyssaceae). **Frontiers in Plant Science**, Lausane, v. 5, artigo 613, 2014.
- KESTENBACH, H. J.; BOTA FILHO W. J. **Microscopia eletrônica de transmissão e varredura**. São Paulo: ABM, 1994.
- KOVÁCS, A. L. The application of traditional transmission electron microscopy for autophagy research in *Caenorhabditis elegans*. **Biophysics Reports**, Berlin, v. 1, n. 2, p. 99-105, 2015.
- LEROY, C.; JAUNEAU, A.; MARTINEZ, Y.; CABIN-FLAMAN, A.; GIBOUIN, D.; ORIVEL, J.; SÉJALON-DELMAS, N. Exploring fungus-plant N transfer in a tripartite ant-plant-fungus mutualism. **Annals of Botany**, Oxford, v. 120, n. 3, p. 417-426, 2017.

MATIAS, L. J.; MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; ROYO, V. A.; RIBEIRO, L. M.; SANTOS, A. C.; FONSECA, J. M. S. Structure and histochemistry of medicinal species of *Solanum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 147-160, 2016.

MEHRAVAR, E.; ITURROSPE, A.; ARBE, A.; LEIZA, J. R.; ASUA, J. M. Acrylic-based composite latexes containing nano-sized liquid crystalline domains. **Polymer**, Oxon, v. 108, p. 288-300, 2017.

MOGHADDASI, S.; FOTOVAT, A.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H.; KARIMZADEH, F.; KHAZAEI, H. R.; KHORASSANI, R. Bioavailability of coated and uncoated ZnO nanoparticles to cucumber in soil with or without organic matter. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 144, p. 543-551, 2017.

MOR, S.; MANCHANDA, C. K.; KANSAL, S. K.; RAVINDRA, K. Nanosilica extraction from processed agricultural residue using green technology. **Journal of Cleaner Production**, Oxon, v. 143, p. 1284-1290, 2017.

SOUZA, W. de. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007. 357 p.

SOUZA, W. de. **Microscopia óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2010. 220 p.

TEIXEIRA, E. M.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 63-66, 2011.

VASCONCELLOS, T. J.; DA CUNHA, M.; CALLADO, C. H. A comparative study of cambium histology of *Ceiba speciosa* (A. St.-Hil.) *Ravenna* (Malvaceae) under urban pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 24, n. 13, p. 12049-12062, 2017.

VINDIGNI, A.; LOPES, M. Combining electron microscopy with single molecule DNA fiber approaches to study DNA replication dynamics. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 225, p. 3-9, 2017.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission electron microscopy: a textbook for materials science**. New York: Springer, 2009. 775 p.

Circular Técnica, 15

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº.
Ed. Embrapa Agroenergia.
Caixa Postal 40315.
CEP 70770-901, Brasília, DF.
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55(61)3448-1589
www.embrapa.br/www.embrapa.br/fale-conosco/sac



1ª edição
Publicação digitalizada (2017)
Disponível em:
www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes

Comitê de publicações

Presidente: Alexandre Alonso Alves.
Secretária-Executiva: Marcia Mitiko Onoyama Esquiagola.
Membros: André Pereira Leão, Bruno Galvêas Laviola, Emerson Leo Schultz, Luciane Chedid Melo Borges, Maria Iara Pereira Machado, Rosana Falcão, Sílvia Belém Gonçalves.

Expediente

Supervisão editorial e revisão de texto: Luciane Chedid Melo Borges.
Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos.
Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado.