

CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Parte 2 – Preparação de amostras para microscopia eletrônica.

NOTA TÉCNICA

Maio 2020



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PARA A PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Campo de aplicação
- 3 Responsabilidade
- 4 Documentos de referência
- 5 Definições
- 6 Recomendações gerais
- 7 Deposição das NP no substrato
- 8 Referências bibliográficas
- 9 Quadro de aprovação

1 OBJETIVO

Este documento tem como objetivo principal apresentar ao profissional da área de microscopia eletrônica procedimentos para a implementação e interpretação adequadas da análise quantitativa do tamanho de nanopartículas, utilizando técnicas de microscopia eletrônica combinadas com análise de imagem. Foi desenvolvido e aprimorado ao longo de diversas comparações intra e interlaboratoriais sobre a caracterização dimensional, morfológica e estrutural de nanomateriais [1-4] realizadas por pesquisadores da Divisão de Metrologia de Materiais (Dimat) do Inmetro. Cabe destacar que não possui caráter compulsório ou taxativo.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Os procedimentos apresentados neste documento são aplicados para a preparação de amostras para caracterização por técnicas de microscopia eletrônica (MEV, MET, STEM, TSEM). As nanopartículas já deverão estar dispersas em meio líquido. Objetivando uma adequada aquisição de imagens e posterior análise, é preciso preparar amostras representativas do material, dispersar o nanomaterial evitando superposição e distribuir as nanopartículas uniformemente sobre o substrato.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela emissão, revisão e cancelamento do presente documento é da Dimat.

4 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Este documento foi redigido usando como base os seguintes documentos:

Nota Técnica Inmetro - 2017	Análise dimensional de nanomateriais utilizando microscopia eletrônica. 2017
NANoREG D2.10	<i>Protocol(s) for size-distribution analysis of primary NM particles in air, powders, and liquids.</i> http://www.nanoreg.eu/

5 DEFINIÇÕES

5.1 Siglas

NM	nanomaterial
NP	nanopartícula
MEV	<i>microscópio/microscopia eletrônica de varredura</i>
MET	microscópio/microscopia eletrônica de transmissão
TSEM	MEV usado no modo transmissão (<i>Transmission in Scanning Electron Microscope</i>)
STEM	modo varredura no MET (<i>Scanning in Transmission Electron Microscope</i>)
AFM	Microscopia de Força Atômica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado

5.2 Termos

- Nano-objeto: material com uma, duas ou três dimensões externas dentro da nanoscala. Definição baseada na ISO/TS 80004-2 [5].
- Nanopartícula: nano-objeto com as três dimensões externas dentro na nanoescala.
- Nanomaterial: material natural, incidental ou manufaturado que contém partículas livres ou agregadas ou aglomeradas e donde, para 50% ou mais da distribuição numérica de tamanho, uma ou mais dimensões externas está na nanoscala.

Nota – Esta definição está baseada nas recomendações da União Europeia no estabelecimento do marco regulatório para o uso de nanomateriais em produtos de consumo [6]. A importância desta definição é que a mesma determina que além de medir, devem-se contar os nano-objetos.

- Nanoscala ou escala nanométrica: escala que vai de aproximadamente 1 nm a 100 nm.
- Partícula primária: partícula individual e fonte original de agregados ou aglomerados [5].

- Agregado: partículas fortemente ligadas ou fundidas para as quais a área superficial externa é significativamente menor que a soma das áreas dos componentes individuais [5].
- Aglomerado: grupos de partículas ou agregados, ou mistura de ambos, unidos por ligações fracas, para os quais a área superficial externa é similar à soma das áreas superficiais dos componentes individuais [5].

6 RECOMENDAÇÕES GERAIS

Os NM são comumente apresentados em pó ou em suspensões. Os pós geralmente são dispersos em um meio líquido antes de depositá-los no substrato adequado para análise. Os métodos de dispersão dependem de cada material e deverão ser consultados previamente. Este documento descreve o preparo dos espécimes para microscopia eletrônica, partindo de suspensões de NP.

É recomendável que as suspensões sejam analisadas sem nenhum procedimento de sonicação, filtragem ou centrifugação, exceto quando especificamente indicado. Caso seja necessário, diluições podem ser realizadas, com muito cuidado, pois qualquer mudança na natureza do meio líquido pode provocar aglomeração das partículas. Para a subsequente análise por microscopia eletrônica, o NM deverá ser depositado sobre um substrato plano.

7 DEPOSIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS NO SUBSTRATO

7.1 Deposição das NP em superfícies de silício.

As NP depositadas em wafers de silício podem ser analisadas por SEM e AFM. O substrato deve ser preparado para receber as NP em dois passos [4]:

- Limpeza: a superfície do silício deve ser primeiramente limpa usando um agente de limpeza forte, tal como solução piranha.
- Silanização: a carga superficial do silício deve ser mudada de negativa a positiva para evitar aglomerações do NM. A superfície pode ser positivamente carregada usando uma solução de aminopropyltrimethoxysilane (APTES, 1 % w/v) dissolvido em etanol/água (95/5).

Assim, partículas negativamente carregadas ficarão aderidas na superfície do silício.

7.2 Deposição das NP em grades próprias para MET.

A vantagem de depositar o NM em grades de MET é que esta permite o uso da mesma amostra tanto na análise por MEV/TSEM, quanto por MET/STEM.

Os suportes mais comuns para MET consistem de uma grade de Cu, Ni, Au ou Mb, coberta com um filme suporte de carbono, óxido de silício ou grafeno. Para facilitar a análise das imagens, é recomendável que o filme seja contínuo a fim de se ter um fundo uniforme. O método de deposição das NPs na grade consiste em deixar em contato a suspensão de NPs com o filme da grade permitindo a interação entre ambos durante um determinado tempo. O excesso de líquido é drenado deixando algumas partículas fixadas ao filme da grade.

Em geral as grades com filme de carbono, que são as mais utilizadas, são hidrofóbicas. Se as NP tiverem carga negativa, elas não interagirão com o filme e tenderão a se aglomerar. Uma maneira simples de superar isso é dispersar as partículas num solvente menos polar, como etanol. Se não for possível, é recomendado realizar um pré-tratamento nas grades.

7.2.1 (Opcional) Pré-tratamento das grades

O pré-tratamento é um passo importante para evitar aglomerações, e visa adaptar a carga do filme da grade à carga das NP. Em geral as grades cobertas com filme de carbono, que são as mais utilizadas, são hidrofóbicas. Para introduzir carga positiva na grade aumentando assim a hidrofilia da mesma, descreve-se a seguir o tratamento com Alcian Blue [7].

- Fixar um pedaço de parafilme sobre uma superfície limpa.
- Pingar no parafilme uma gota de Alcian Blue diluído em água ultrapura a 1% (w/w)
- Colocar cuidadosamente a grade com o lado do filme de carbono sobre a gota de Alcian Blue. Deixar atuar durante uns minutos (1 min a 10 min).
- Retirar a grade e lavá-la transferindo-a sucessivamente para cinco gotas de água ultrapura colocadas sobre o parafilme. Retirar o excesso de umidade com papel absorvente sem fiapos.

Nota – Depositar as NP na grade (próximo passo) imediatamente após o tratamento.

7.2.2 Procedimento para deposição das NP na grade.

- Homogeneizar a dispersão com o nanomaterial por agitação ou pipetagem. Cada alíquota precisa ser retirada do vial utilizando-se uma micropipeta com ponteira plástica descartável e de uso único. Se desejado, também podem ser utilizadas pipetas descartáveis tipo Pasteur.
- Se as NP estiverem bem dispersas em um meio apolar ou com uma concentração muito baixa, o método *gota sobre grade* em geral é suficiente: uma gota (5µm -50µm) é pipetada sobre a grade e deixada secar.
- Se o NM estiver em meio aquoso, o método *grade sobre gota* é mais adequado: numa superfície limpa (por exemplo um pedaço de parafilme) pingar uma gota da suspensão (5µm -50µm) e sobre ela colocar cuidadosamente a grade com o lado do filme sobre a gota. Deixar interagir

durante uns minutos (de 1 min a 10 min). Remover o excesso de umidade deixando a grade em contato com papel absorvente sem fiapos.

Nota – Opcionalmente, a grade com o nanomaterial pode ser lavada colocando-a sobre uma gota de água pura por 30 s. Este passo reduz o sinal de fundo removendo o excesso de sais e material contaminante. Estender o tempo de lavagem pode resultar na perda seletiva das partículas maiores, o que deve ser evitado.

- Guardar as grades num local apropriado (caixa de grades, placa de Petri, eppendorf) devidamente identificadas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NMIIJ-PTB: *Bilateral comparison on nanometrology according to the rules of CCL key comparisons*; APEC ISTWG Project Interlaboratory Comparison on Nanoparticle Size Characterization, 2012
- [2] Projeto NanoValid, *Developing Reference Methods for Nanomaterials*, 2012-2015
- [3] NANoREG, *A common European approach to the regulatory testing on nanomaterials*, 2014-2017. Protocolos disponíveis em: <http://www.nanoreg.eu/>
- [4] C.P.Gouvêia, S.M. Landi, C.E. Galhardo, J.C. Damasceno. Nota técnica Inmetro: *Análise dimensional de nanomateriais utilizando microscopia eletrônica*, em http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/pdf/Analise_dimensional_de_nanomateriais_utilizando_microscopia_eletronica_-_Nota_Tecnica.pdf
- [5] ISO/TS 80004-2:2015. Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects. 2015, ISO: Geneva, Switzerland.
- [6] L 275/38 Official Journal of the European Union 20.10.2011
- [7] J. Mast and L. Demeestere: *Electron tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis*. Diagn Pathol 4, p.5, 2009 [DOI: 10.1186/1746-1596-4-5]

9 QUADRO DE APROVAÇÃO

Elaborado por	Sandra Marcela Landi	Pesquisadora -Tecnologista
Aprovado por	Oleksii Kuznetsov	Chefe da Dimat