

CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Parte 3 – Aquisição de imagens utilizando microscopia eletrônica de transmissão.

NOTA TÉCNICA

Maio 2020



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PARA A AQUISIÇÃO DE IMAGENS UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

SUMÁRIO

- 1 Objetivo
- 2 Campo de aplicação
- 3 Responsabilidade
- 4 Documentos de referência
- 5 Definições
- 6 Recomendações gerais
- 7 Predefinição das posições na grade
- 8 Escolha da magnificação
- 9 Procedimento para aquisição das imagens
- 10 Referências bibliográficas
- 11 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, apenas serve como um guia para a aquisição de imagens por microscopia eletrônica de transmissão.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Os procedimentos apresentados neste documento são aplicados para a aquisição das imagens utilizando um microscópio eletrônico de transmissão, devidamente alinhado e calibrado mediante algum protocolo adequado para tipo de microscópio e configurações de câmera [5-8].

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
MET	microscópio/microscopia eletrônica de transmissão
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

O método usado para gerar as micrografias deve ser microscopia eletrônica de transmissão de feixe paralelo também chamado de microscopia eletrônica de transmissão convencional (embora possa servir também para microscopia eletrônica de varredura). O microscópio deve estar calibrado e alinhado. A calibração da magnificação pode ser realizada usando um material de referência apropriado (nanopartículas MR/MRC, redes de difração óptica etc.). Como a ampliação (zoom) da magnificação geralmente é não linear, a porcentagem da incerteza na escala pode ser diferente para cada magnificação. Recomenda-se, portanto, que a(s) magnificação(ões) usada(s) na(s) análise(s) esteja(m) calibrada(s).

É muito importante que todas as imagens a serem analisadas sejam adquiridas sob as mesmas condições de operação. O fundo (*background*) deve ser de intensidade uniforme e deve haver um bom contraste com as NP. Pode ser necessário executar a sequência do protocolo adquirindo algumas imagens teste antes de adquirir as imagens finais usadas na análise.

Nota – Quanto melhor forem as imagens adquiridas em relação ao contraste relativo e dispersão das NP, menos intervenções do operador serão necessárias no processamento das mesmas.

7 PREDEFINIÇÃO DAS POSIÇÕES NA GRADE

Para evitar a subjetividade do microscopista na seleção das partículas a serem analisadas, é recomendável pré-definir as posições da grade onde as imagens serão adquiridas. Quando a posição cair numa região obscurecida (pela grade, por impureza, etc.) ou numa região sem nada a observar, deve-se deslocar a amostra até achar uma região com NP. Em cada região devem ser adquiridas imagens suficientes para contabilizar um total de pelo menos 500 partículas por grade.

8 ESCOLHA DA MAGNIFICAÇÃO

A escolha da magnificação dependerá tanto do tamanho das NP analisadas como da configuração de cada microscópio e resolução da câmera. A faixa de trabalho útil é definida pelos limites de quantificação superior e inferior [11, 12]. O limite inferior é baseado no trabalho de Merkus [13], que mostrou que desvios sistemáticos nas medidas de tamanho podem ser evitados se a área da partícula for de pelo menos

100 pixels. O limite superior depende do campo de visão, sendo restrito a um décimo do tamanho da imagem, como recomenda a ISO 13322 -1 [14].

Ou seja, para estabelecer qual é a melhor magnificação, duas magnificações devem ser determinadas:

- A menor magnificação M_S na qual a área da menor partícula analisada seja de pelo menos 100 pixels (critério de Merkus [13])
- A maior magnificação M_H de tal modo que a maior partícula do espécime seja, no máximo, um décimo do tamanho da micrografia (recomendação da ISO 13322 -1 [14]).

Quando M_H for maior que M_S , qualquer magnificação entre essas duas pode ser usada. Caso contrário as imagens devem ser adquiridas usando duas magnificações diferentes para evitar tendência (viés).

Nota – Pode acontecer que M_S seja maior do que M_H no caso de amostras com uma grande dispersão de tamanho entre as NP. Nessas situações, as imagens devem ser adquiridas usando duas magnificações.

9 PROCEDIMENTO PARA A AQUISIÇÃO DAS IMAGENS

9.1 Condições de operação

- Antes da análise deve-se escolher a voltagem de aceleração conforme a amostra a ser analisada deixando tempo suficiente para que estabilize.
- Estabelecer as condições de iluminação: abertura da condensadora, *gun lens* e *spot size*.
- Decidir se será necessária a introdução de uma abertura na lente objetiva.
- Escolher a(s) magnificação(ões) como explicado na seção 4

9.2 Aquisição de imagens

Para cada posição preestabelecida (ver seção 3) recomenda-se seguir os seguintes passos:

- Posicionar a amostra na altura eucêntrica, de forma que a corrente nas lentes objetivas e nas intermediárias fique sempre no mesmo valor.
- Usar a(s) magnificação(ões) escolhidas e ao alterar a magnificação, sempre fazê-lo no mesmo sentido.
- Aplicar, se for possível, uma função de relaxamento nas lentes após qualquer mudança.
- Corrigir astigmatismo.
- Focar (sugere-se foco Gaussiano para partículas de alto contraste, e foco de Scherzer para partículas com pouco contraste) [3].
- Adquirir e salvar cada uma das imagens em uma pasta dedicada e identificada.

- Incluir a informação da aquisição (tamanho da imagem, tamanho do pixel, condições de aquisição, tipo e marca do MET).

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NMIJ-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 29301:2017. *Microbeam analysis – Analytical transmission electron microscopy – Methods for calibrating image magnification by using reference materials having periodic structure*. 2010, ISO: Geneva, Switzerland.
- [6] J.A.W.M. van der Laak et al.: *Automated magnification calibration in transmission electron microscopy using Fourier analysis of replica images*. Ultramicroscopy 106, pp. 255–260, 2006 [DOI: 10.1016/j.ultramic.2005.08.001]
- [7] NIST: Bonevich, J.E. and W.K. Haller, *Measuring the size of nanoparticles using transmission electron microscopy (TEM)*, in NIST-NCL Joint Assay Protocol, PCC-7 Version 1.1, NIST, Editor. 2010, NIST-NCL: Washington, DC, United States
- [8] NPL: Boyd, R.D., et al., *Good practice guide for the determination of the size distribution of spherical nanoparticle samples*, in Measurement Good Practice Guide No. 119. 2011, National Physical Laboratory: Teddington, Middlesex, UK.
- [9] ISO/TS 80004-2:2015. *Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects*. 2015, ISO: Geneva, Switzerland.
- [10] L 275/38 Official Journal of the European Union 20.10.2011
- [11] Mast, P.-J. De Temmerman. Deliverable D 2.10 *Protocol(s) for size-distribution analysis of primary NM particles in air, powders, and liquids*. CODA-CERVA Veterinary and agrochemical research center. Documento público sob Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License. 2016.

- [12] P.-J. De Temmerman et al.: *Measurement uncertainties of size, shape, and surface measurements using transmission electron microscopy of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles*. J Nanopart Res 16:2177, 2014 [DOI: 10.1007/s11051-013-2177-1]
- [13] H.G. Merkus: *Particle size measurements: fundamentals, practice, quality*. Pijnacker: Springer, 2009. 533 p. ISBN 978-1-4020-9015-8
- [14] ISO 13322-1:2014. *Particle size analysis – Image analysis methods – Part 1: Static image analysis methods*. 2014, ISO: Geneva, Switzerland.

11 QUADRO DE APROVAÇÃO

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