# CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

## Parte 4 – Análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.

NOTA TÉCNICA

Maio 2020

INMETRO

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PARA A ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.**

## SUMÁRIO

1 Objetivo
2 Campo de aplicação
3 Responsabilidade
4 Documentos de referência
5 Definições
6 Recomendações gerais
7 Preparação das imagens
8 Estabelecimento do marco de medição
9 Seleção dos mensurandos
10 Tratamento das partículas em contato ou superpostas
11 Processamento das imagens
12 Referências bibliográficas
13 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 o presente documento 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

O procedimento apresentado neste documento aplica-se para analisar as imagens adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão, mas serve também para imagens adquiridas usando um microscópio eletrônico de varredura.

## 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 | 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 – Non-Commercial – Share Alike 4.0 International License. 2016. |

## 5 DEFINIÇÕES

### 5.1 Siglas

| | |
|---|---|
| NM | nanomaterial |
| NP | nanopartícula |
| MET | microscópio/microscopia eletrônica de transmissão |
| MEV | microscópio/microscopia eletrônica de varredura |
| MR | Material de referência |
| MRC | Material de referência certificado |
| ECD | *Equivalent circular diameter* (diâmetro circular equivalente) |
| MICD | *Maximal inscribed circular diameter* (diâm. do máximo círculo inscrito) |

### 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 contem 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].
- Marco de medição: área selecionada dentro da imagem em que as partículas são medidas e contadas [7].
- Tamanho do pixel: é o tamanho de um pixel na imagem digitalizada de microscopia eletrônica. É expresso em nm/pixel a menos que outra unidade seja indicada.
- Tamanho da partícula: dimensão linear de uma partícula determinada por um método específico de medição e sob condições específicas de medição [8].
- *Threshold*: (limiarização): é um processo de segmentação de imagens que se baseia na diferença dos níveis de cor que compõem diferentes objetos de uma imagem. A partir de um limiar estabelecido de acordo com as características dos objetos que se quer isolar, a imagem pode ser segmentada e/ou binarizada em preto e branco.
- Binarização: é a conversão de uma imagem com níveis de cinza para uma imagem com representação binária (preto e branco).

## 6 RECOMENDAÇÕES GERAIS

Devido ao grande número de partículas a serem analisadas, é recomendado o uso de um software de análise de imagens. Quanto mais automatizado for o procedimento, menor será a influência do operador sobre o mesmo. Nossa experiência é utilizando o software *ImageJ* ([http://imagej.net/] ou o pacote *Fiji* [http://fiji.sc/] que inclui o *ImageJ*) que é um software aberto e gratuito. Mas qualquer outro software que permita uma análise da imagem fornecendo informações sobre o tamanho e forma do NM pode ser usado.

A principal função do processamento digital é fornecer ferramentas para facilitar a identificação e a extração das informações contidas nas imagens, para posterior interpretação. O resultado desse processamento é a produção de outras imagens, com informações específicas, extraídas e realçadas a partir das imagens originais. Nesse sentido, para obter informações sobre as NP presentes na imagem, deve-se distingui-las do fundo (*background*). Imagens com muito ruído, bordas das partículas pouco definidas ou fundo não homogêneo, requerem um processamento maior com uso de filtros, que podem comprometer a veracidade dos resultados. Por isso é recomendado um especial cuidado durante a aquisição das imagens (ver protocolo [9]), para que estas apresentem fundo de intensidade uniforme e bom contraste com as NP. É importante também que todas as imagens a serem analisadas tenham sido adquiridas sob as mesmas condições de operação.

# 7 PREPARAÇÃO DAS IMAGENS

As imagens adquiridas nas mesmas condições de iluminação podem ser agrupadas formando pilhas (*stacks*) para se trabalhar com todas as imagens juntas. Assim, o processamento realizado numa das imagens pode ser aplicado a todas as outras, otimizando-se o tempo de trabalho.

## 7.1 Preparação prévia

Algumas imagens precisarão de uma preparação prévia caso apresentem um fundo não homogêneo, pouco contraste ou bordas pouco definidas.

- Remover o background caso exista algum gradiente devido a uma iluminação heterogênea (isso deve ser evitado alinhando corretamente o microscópio e alargando o feixe).
- Corrigir a escala de cinza para maximizar o contraste.
- Caso seja necessário, aplicar um filtro gaussiano ou outro filtro apropriado para definir a borda das NP.

## 7.2 Binarização

O procedimento consiste em transformar uma imagem em escala de cinza para uma imagem binária, com partículas discretas e destacadas do fundo, a fim de determinar a distribuição de tamanho das partículas primárias.

- Aplicar o *threshold*, separando as nanopartículas do fundo.
- Binarizar a imagem e salvá-la na base de dados.

# 8 ESTABELECIMENTO DO MARCO DE MEDIÇÃO

Se todos os objetos que aparecem na imagem forem aceitos para a medição, a exatidão da distribuição final será prejudicada, pois alguns desses objetos estarão cortados pela borda da micrografia. Para prevenir isso, um marco de medição deve ser incluído (ISO 13322-1 [7]). O marco de medição pode ser definido das duas maneiras descritas abaixo.

## 8.1 NP excluídas de acordo com o marco de medição.

- As bordas superior e esquerda do marco são estabelecidas a partir de 10% das bordas superior e esquerda originais da micrografia. As bordas inferior e direita permanecem as mesmas.
- As partículas dentro do marco são incluídas na análise.
- As partículas que estão dentro da faixa dos 10%, mas tocando no novo marco, são incluídas.
- As partículas tocando a borda inferior ou direita são excluídas da análise.

### 8.2 NP excluídas de acordo com suas coordenadas X-Y do centro de massa.

- As coordenadas X-Y do centro de massa de cada partícula são determinadas.
- Partículas cujas coordenadas X-Y estão distantes em até 5% do tamanho da micrografia, de qualquer uma de suas bordas, são excluídas da análise

## 9 SELEÇÃO DOS MENSURANDOS

Distribuições de tamanhos requerem um único mensurando, enquanto que distribuições de forma requerem dois mensurandos. Algum deles são descritos a seguir.

Nota – Recomenda-se salvar os valores de todos os mensurandos que o software pode calcular. Assim, o operador fica com uma base de dados de resultados completa da amostra, visto que análises posteriores não poderão ser realizadas para complementar uma base de dados já existente.

### 9.1 Descritores de tamanho

- Diâmetro circular equivalente - ECD ($x_A$ ou $d_{ECD}$): diâmetro de um círculo que tem a mesma área que a área projetada da partícula.
- Diâmetro de Feret ($x_F$ ou $d_F$): distância entre duas linhas paralelas tangentes ao perímetro da partícula.
- Diâmetro do máximo círculo inscrito - MICD: diâmetro do maior círculo de tamanho suficiente para caber dentro da forma da área projetada da partícula.
- Fecho ou envoltório convexo (*convex hull*): é a menor região convexa contendo um dado objeto geométrico

Nota – Na seleção do mensurando para distribuições de tamanho, é importante levar em consideração qual é o mensurando certificado no MRC utilizado para comparação.

### 9.2 Descritores de forma

- Relação de aspecto (*aspect ratio,* AR) [10]: razão entre o diâmetro mínimo e máximo de Feret. Indica quão alongada é a partícula.
- Fator de forma (*shape factor*) [7]: razão entre o diâmetro máximo e mínimo de Feret. Indica quão alongada é a partícula. É a inversa da relação de aspecto.
- Convexidade: é a relação entre o perímetro do fecho convexo que envolve a área projetada da partícula e o perímetro da mesma. Fornece informações sobre a rugosidade da borda da área projetada da partícula.
- Circularidade: é a razão entre a área e o quadrado do perímetro. Indica o quanto a área projetada da partícula é similar ao círculo, considerando a rugosidade/suavidade do perímetro e a área projetada da partícula.
- Solidez (*solidity*): é a relação entre a área projetada e a área do fecho convexo. Indica quão compacta é a imagem da partícula.

- Arredondamento (*roundness*): é o quadrado da circularidade

## 10 TRATAMENTO DAS PARTÍCULAS EM CONTATO OU SUPERPOSTAS

Ainda havendo minimizado a aglomeração do NM durante o preparo das amostras, é comum encontrar partículas em contato ou superpostas nas imagens em análise. Quando a análise da imagem é realizada automaticamente, artefatos como produtos químicos secos ou partículas em contato são erroneamente incluídos como objetos identificados. A remoção dos mesmos pode ser realizada de forma manual ou automática. O descarte automático é baseado em critérios geométricos, estabelecendo-se limites em parâmetros como a circularidade, fator de forma, área, etc. [11]. Recomenda-se que seja verificado que tais limites não alterem significativamente a distribuição de tamanho.

Em termos gerais não é recomendada a utilização de ferramentas para separação de objetos como o algoritmo “divisor de águas” (*watershed*), pois essa utilização costuma levar a subestimação do tamanho e mudar o resultado da avaliação da forma das partículas.

## 11 PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

### 11.1 Análise das NP

- Realizar o *thresholding* selecionando as partículas de interesse.
- A área da menor partícula considerada nos cálculos deve ser de 100 pixels (ver a escolha da magnificação na referência [9]).
- Excluir as partículas seguindo algum dos marcos de medição (seção 8).
- Permitir que o programa usado identifique as partículas detectadas nas imagens com um número, e que este esteja relacionado com a base de dados gerada.
- Não usar a função *fill holes* nem incluir os buracos nas análises.
- Para análises de NP aproximadamente esféricas, descartar os agregados e aglomerados (seção 10). Não usar a função *watershed*.
- Salvar as medições numa planilha.
- Registrar todos os passos seguidos e métodos selecionados num relatório.

### 11.2 Planilha de dados

Gerar uma planilha de dados que contenha como mínimo:

- Valores dos mensurandos medidos de cada partícula analisada.
- Nome da imagem à qual pertence cada partícula.
- Número da partícula (o mesmo que a identifica nas imagens).
- Coordenadas X-Y do centro da área projetada da partícula.

## 12 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 nanomateriais*, 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] ISO 13322-1:2014. *Particle size analysis – Image analysis methods – Part 1: Static image analysis methods*. 2014, ISO: Geneva, Switzerland.

[8] ISO/TS 80004-6:2013. *Nanotechnologies – Vocabulary – Part 6: Nano-objects characterization*. 2013, ISO: Geneva, Switzerland.

[9] CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS. Parte 3 - *Aquisição de imagens utilizando microscopia eletrônica de transmissão*. Maio de 2020.

[10] ISO 9276-6:2008: *Representation of results of particle size analysis – Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology*. 2008, ISO: Geneva, Switzerland

[11] E. Verleysen et al.: *Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium dioxide nanomaterials by transmission electron microscopy*. Powder Technol. 258, p. 180–188, 2014 [DOI: 10.1016/ j.powtec.2014.03.010]

## 13 QUADRO DE APROVAÇÃO

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