
Análise dimensional de nanomateriais utilizando microscopia eletrônica

NOTA TÉCNICA

Novembro 2017



Grupo de trabalho:

Cristol de Paiva Gouvêa
Sandra Marcela Landi
Carlos Eduardo Galhardo
Jailton Carreteiro Damasceno

Revisor:

Eveline De Robertis

Análise dimensional de nanomateriais utilizando microscopia eletrônica

Esta Nota Técnica resume a experiência de um grupo de trabalho do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e 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 nanomateriais, utilizando técnicas de microscopia eletrônica combinadas com análise de imagem. Os procedimentos aqui descritos foram desenvolvidos e aprimorados ao longo de diversas comparações intra e interlaboratoriais sobre a caracterização dimensional, morfológica e estrutural de nanomateriais [1-3], incluindo o conteúdo dos cursos de *Avaliação da incerteza de medição dimensional utilizando microscopia eletrônica*, oferecido pelos autores. Cabe destacar que tais procedimentos não possuem caráter compulsório ou taxativo: eles apenas servem como um guia para a preparação, aquisição e análise de imagens, avaliação da incerteza associada à medição e desenvolvimento do relatório final. Os profissionais que farão uso das diretrizes aqui apresentadas estão convidados a encaminhar suas contribuições técnicas, para o processo de sua melhoria contínua, e solicitações de esclarecimentos para a Divisão de Metrologia de Materiais (Dimat) da Diretoria de Metrologia Científica e Tecnologia (Dimci) do Inmetro.

SUMÁRIO

1	Objetivo	6
2	Referências normativas	6
3	Definições, termos e expressões	7
3.1	Vocabulário	7
3.2	Termos relacionados com métodos de aquisição e análise de imagem	8
3.3	Termos relacionados aos mensurandos	8
3.4	Termos relacionados à metrologia	10
4	Siglas	11
5	Considerações Gerais	11
6	Preparação de Amostras	12
6.1	Recomendações gerais	12
6.2	Deposição do NM no substrato	13
7	Aquisição de imagens	15
7.1	Amostragem	15
7.2	Escolha da magnificação	15
7.3	Procedimento para aquisição de imagens por SEM	17
7.4	Procedimento para aquisição de imagens por TEM	18
8	Análise de dados	20
8.1	Preparação das imagens	21
8.2	Estabelecimento do marco de medição	21
8.3	Seleção dos mensurandos	22
8.4	Tratamento das partículas em contato ou superpostas	22
8.5	Processamento das imagens	23
9	Avaliação da incerteza de medição	24
9.1	Abordagem <i>bottom-up</i>	24
9.2	Abordagem <i>top-down</i>	27
10	Relatório de Ensaio	29
10.1	Informações gerais	30
10.2	Informações da amostra	30

10.3 Preparação da amostra	30
10.4 Descrição do instrumento e método utilizado	30
10.5 Análises e resultados	31
11 Referências	31

1 Objetivo

Nesta Nota Técnica são apresentadas diretrizes gerais para análise das propriedades físicas de nanomateriais utilizando técnicas de microscopia eletrônica. Os procedimentos foram desenvolvidos ao longo de diversas comparações intra e interlaboratoriais sobre a caracterização dimensional, morfológica e estrutural de nanomateriais [1-3].

2 Referências normativas

As normas, os guias e outros documentos relacionados a seguir contêm disposições que, ao serem citadas neste texto, constituem prescrições para esta Nota Técnica. As edições indicadas são as que estão em vigor na época da publicação desta edição. Como todo documento normativo está sujeito à revisão, recomenda-se àqueles que se baseiem nesta Nota Técnica que verifiquem a conveniência do uso de edições mais recentes das normas, guias, etc. citados nele.

ISO/TS 80004-1: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms [4]

ISO/TS 80004-2: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects [5]

ISO/TS 80004-6: Nanotechnologies – Vocabulary – Part 6: Nano-objects characterization [6]

ISO/TS 17200: Nanotechnologies – Nanoparticles in powder form – Characteristics and measurements. [7]

ASTM E2456 – 06: Terminology for Nanotechnology [8]

NPL Good Practice Guide 119: Good Practice Guide for the Determination of the Size and Size Distribution of Spherical Nanoparticle samples [9]

NIST - NCL Joint Assay Protocol, PCC-7: Measuring the Size of Nanoparticles Using Transmission Electron Microscopy (TEM) [10]

ISO 16700: Microbeam analysis – Scanning electron microscopy – Guidelines for calibrating image magnification [11]

ISO 29301: Microbeam analysis – Analytical transmission electron microscopy – Methods for calibrating image magnification by using reference materials having periodic structure [12]

ASTM E766 – 14e1: Standard Practice for Calibrating the Magnification of a Scanning Electron Microscope [13]

ISO 13322-1: Particle size analysis – Image analysis methods – Part 1: Static image analysis methods [14]

ASTM E2578 – 07: Standard Practice for Calculation of Mean Sizes/Diameters and Standard Deviations of Particle Size Distributions [15]

ISO 9276-2: Representation of results of particle size analysis – Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions [16]

ISO 9276-3: Representation of results of particle size analysis – Part 3: Adjustment of an experimental curve to a reference model [17]

ISO 9276-6: Representation of results of particle size analysis – Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology [18]

ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração [19]

Norma NIT-Dicla-035: Princípios das Boas Práticas de Laboratório – BPL [20]

ISO 21748: Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation [21]

3 Definições, termos e expressões

Para os propósitos deste documento aplicam-se os termos e expressões relacionados a seguir.

3.1 Vocabulário

3.1.1 **Nano-objeto:** material com uma, duas ou três dimensões externas dentro da nanoscala. Definição baseada na ISO/TS 80004-2 [5].

3.1.2 **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 (3.3.1.2), uma ou mais dimensões externas está na nanoscala.

Esta definição está baseada nas recomendações da União Europeia no estabelecimento do marco regulatório para o uso de nanomateriais em produtos de consumo [22]. A importância desta definição é que a mesma determina que além de medir, devem-se contar os nano-objetos.

3.1.3 **Nanoscala ou escala nanométrica:** escala que vai de aproximadamente 1 nm a 100 nm.

3.1.4 **Partícula primária:** partícula individual e fonte original de agregados ou aglomerados [5].

3.1.5 **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].

3.1.6 **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].

Para exemplificar, na figura 1 estão esquematizados os tipos de agregados, aglomerados e partículas primárias.

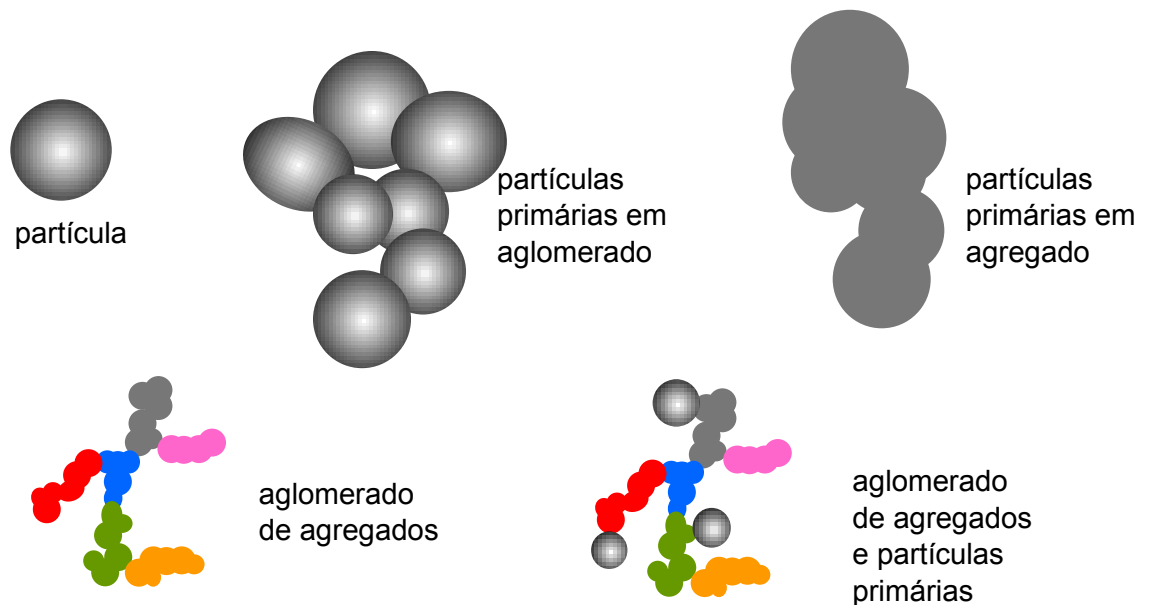


Fig. 1 – Esquema dos tipos de agregados, aglomerados e partículas primárias [5]

3.2 Termos relacionados com métodos de aquisição e análise de imagem

3.2.1 **Marco de medição:** área selecionada dentro da imagem em que as partículas são medidas e contadas [14].

3.2.2 **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.

3.3 Termos relacionados aos mensurandos

3.3.1 Descritores de tamanho

3.3.1.1 **Tamanho da partícula:** dimensão linear de uma partícula determinada por um método específico de medição e sob condições específicas de medição [6].

3.3.1.2 **Distribuição de tamanho da partícula:** distribuição estatística de partículas em função do tamanho da partícula [6].

3.3.1.3 **Diâmetro circular equivalente - ECD** (x_A ou d_{ECD}): diâmetro de um círculo que tem a mesma área que a área projetada (A) da partícula.

$$x_A = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$$

- 3.3.1.4 **Diâmetro de Feret** (x_F ou d_F): distância entre duas linhas paralelas tangentes ao perímetro da partícula.
- 3.3.1.5 **Diâmetro mínimo de Feret** (x_{Fmin} ou d_{Fmin}): mínima longitude de um objeto qualquer que seja a orientação.
- 3.3.1.6 **Diâmetro máximo de Feret** (x_{Fmax} ou d_{Fmax}): máxima longitude de um objeto qualquer que seja a orientação.
- 3.3.1.7 **Diâmetro do máximo círculo inscrito**: diâmetro do maior círculo de tamanho suficiente para caber dentro da forma da área projetada da partícula.
- 3.3.1.8 **Fecho ou envoltório convexo** (*convex hull*): é a menor região convexa contendo um dado objeto geométrico.

3.3.2 Descritores de forma

- 3.3.2.1 **Relação de aspecto** (*aspect ratio*, AR) [18]: razão entre o diâmetro mínimo e máximo de Feret. Indica quão alongada é a partícula.

$$AR = \frac{x_{Fmin}}{x_{Fmax}}$$

- 3.3.2.2 **Fator de forma** (*shape factor*) [14]: razão entre o diâmetro máximo e mínimo de Feret. Indica quão alongada é a partícula. É a inversa da relação de aspecto.

- 3.3.2.3 **Convexidade**: é a relação entre o perímetro do fecho convexo que envolve a área projetada da partícula e o perímetro da mesma (P). Fornece informações sobre a rugosidade da borda da área projetada da partícula.

$$C_x = \frac{P_c}{P}$$

- 3.3.2.4 **Circularidade**: indica o quanto a área projetada da partícula é similar ao círculo, considerando a rugosidade/suavidade do perímetro (P) e a área projetada da partícula (A).

$$C = \sqrt{\frac{4 \cdot \pi \cdot A}{P^2}}$$

- 3.3.2.5 **Solidez** (*solidity*): é a relação entre a área projetada (A) e a área do fecho convexo (A_c). Indica quão compacta é a imagem da partícula.

$$S = \frac{A}{A_c}$$

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

3.4 Termos relacionados à metrologia

Os termos aqui descritos foram extraídos do Vocabulário Internacional de Metrologia VIM-2012 [23].

3.4.1 **Exatidão de medição:** grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando.

NOTA: A exatidão de medição não é uma grandeza e não lhe é atribuído um valor numérico. Uma medição é dita mais exata quando fornece um erro de medição menor.

3.4.2 **Precisão de medição:** grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.

NOTA: A precisão de medição é utilizada para definir a repetibilidade de medição, a precisão intermediária de medição e a reprodutibilidade de medição.

3.4.3 **Veracidade de medição:** grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência.

NOTA: A veracidade de medição não é uma grandeza e, portanto, não pode ser expressa numericamente. Está inversamente relacionada ao erro sistemático, porém não está relacionada ao erro aleatório.

3.4.4 **Repetibilidade de medição:** precisão de medição sob um conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo.

3.4.5 **Precisão intermediária de medição:** precisão de medição sob um conjunto de condições, as quais compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo de um período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas a mudanças.

3.4.6 **Reprodutibilidade de medição:** precisão de medição conforme um conjunto de condições, as quais incluem diferentes locais, diferentes operadores, diferentes sistemas de medição e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares.

3.4.7 **Incerteza de medição:** parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas.

3.4.8 **Incerteza-padrão combinada:** incerteza padrão obtida usando-se as incertezas-padrão individuais (e as covariâncias conforme apropriado), associadas às grandezas de entrada em um modelo de medição.

3.4.9 **Incerteza de medição expandida:** produto de uma incerteza-padrão combinada por um fator maior do que o número um.

NOTA: O fator depende do tipo de distribuição de probabilidade da grandeza de saída em um modelo de medição e de uma probabilidade de abrangência pré-definida.

4 Siglas

NM	Nanomaterial
NP	Nanopartícula
SEM	<i>Scanning Electron Microscope(y)</i> (microscópio/microscopia eletrônica de varredura, MEV).
TSEM	<i>Transmission in SEM</i> (MEV usado no modo transmissão)
TEM	<i>Transmission Electron Microscope(y)</i> (microscópio/microscopia eletrônica de transmissão, MET)
STEM	<i>Scanning in TEM</i> (modo varredura no TEM)
FEG	<i>Field emission gun</i> (canhão de feixe de elétrons por emissão de campo)
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)
ECD	<i>Equivalent circular diameter</i> (diâmetro circular equivalente)
MICD	<i>Maximal inscribed circular diameter</i> (diâmetro do máximo círculo inscrito)
HFW	<i>Horizontal field of view</i> (campo de visão horizontal)
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de Luz Dinâmico)
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (Análise de Rastreamento de Nanopartículas)
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado

5 Considerações gerais

Os nanomateriais (os quais incluem NP, nanotubos, nanofitas, entre outros) são materiais promissores para uma sociedade moderna por apresentarem propriedades únicas e singulares, geralmente não observadas na escala macro. A harmonização e o consenso nos métodos de medidas, provendo a capacidade de medição nesta escala, é uma necessidade iminente para a correta caracterização e consequente aplicabilidade destes materiais, garantindo, por exemplo, a segurança toxicológica em produtos médicos, de higiene pessoal, cosméticos e tintas.

A caracterização dimensional, morfológica e estrutural de nanomateriais faz-se fundamental para as suas corretas aplicabilidades, por estes serem parâmetros que influenciam drasticamente as propriedades finais dos produtos baseados em nanotecnologia, sendo utilizados, por exemplo, em aplicações opto-eletrônicas, termo-fluídicas, tribológicas e toxicológicas, entre outras.

Atualmente existe uma grande variedade de técnicas experimentais, algumas simples, outras muito sofisticadas, capazes de medir um conjunto de propriedades físico-químicas de diversos nanomateriais. Medidas de DLS e NTA são vastamente utilizadas para a determinação do tamanho hidrodinâmico de nanomateriais, por sua fácil aquisição e interpretação dos dados. Contudo, estas técnicas muitas vezes não representam o tamanho real do objeto em análise.

As caracterizações dimensionais e morfológicas por imagem são amplamente abordadas por meio de técnicas analíticas, por permitirem uma análise individual do nano-objeto. Dentre estas técnicas destacam-se SEM, TEM e AFM. Técnicas correlatas a estas também são vastamente utilizadas para fornecer uma caracterização físico-química em escala nano e sub-nanométrica.

Este documento contempla os procedimentos de preparação e caracterização de nanomateriais utilizando as técnicas de SEM e TEM. Estas metodologias foram redigidas baseadas na caracterização de NP metálicas (Au, Ag, entre outros) e óxidos (SiO₂, TiO₂, ZnO, CuO, entre outros), mas não limitados a estas, cujos procedimentos descritos a seguir foram desenvolvidos a partir de uma série de comparações intra e interlaboratoriais das quais a Divisão de Metrologia de Materiais vem participando ao longo dos anos.

Os procedimentos aqui apresentados foram desenvolvidos com ênfase na metodologia de preparação de amostra, aquisição e análise de dados, avaliação da incerteza das medições e no preenchimento do relatório de ensaio. Embora o documento tenha sido elaborado a partir do conhecimento adquirido nas comparações previamente mencionadas, foi o trabalho desenvolvido junto ao NANoREG [3] o que teve maior influência nas páginas a seguir.

6 Preparação de amostras

Os procedimentos apresentados nesta seção são aplicados para a preparação de amostras para caracterização por técnicas de microscopia eletrônica (SEM, TSEM, TEM, STEM).

6.1 Recomendações gerais

Os NMs 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. No caso de suspensões já prontas, é recomendável que 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.

A fim de se obter uma descrição representativa da distribuição das partículas, é necessário adquirir imagens e analisar um grande número de nanopartículas. A ISO 13322 [14] indica uma forma de calcular o número de NP a partir do tamanho médio e grau de confiança, mas é consensualmente aceito o valor de 500 NP na maioria dos testes interlaboratoriais [24]. O preparo das amostras é uma parte chave do procedimento. Objetivando uma adequada aquisição de imagens e respectivas interpretações, é preciso:

- preparar amostras representativas do material;
- dispersar as NP evitando superposição;
- distribuir as NP uniformemente.

Os efeitos de toxicidade oriundos dos materiais nanoestruturados ainda são alvos de diversas discussões científicas e por este motivo é altamente recomendável o uso de equipamentos de proteção individual adequados, tais como luvas, jaleco e máscaras. Estes cuidados também são favoráveis para minimizar contaminações externas à amostra. Além disso, sugere-se a manipulação dessas amostras com instrumentos limpos e em sala limpa ou em ambientes com controle de impurezas.

6.2 Deposição do NM no substrato

A maioria das superfícies (substratos e NM) tendem a estar negativamente carregadas, por isso, o simples método de pingar uma gota e deixar secar às vezes não pode ser usado. A seguir são descritos os métodos de deposição sobre os substratos mais comuns para análise em TEM e/ou SEM.

6.2.1 Deposição do NM 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:

- **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.

6.2.2 Deposição do NM em grades de TEM

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

As NP já dispersas num meio líquido são colocadas em contato com a grade, permitindo a interação entre ambas. O excesso de líquido é drenado deixando

algumas partículas fixadas à grade por algum tipo de interação, tal como eletrostática ou Van der Waals, entre outras. Esta interação dependerá fortemente das características físico-químicas tanto das NP, quanto da grade.

Os suportes mais comuns para TEM 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. 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 que seja realizado um pré-tratamento nas grades.

6.2.2.1 Pré-tratamento das grades

O pré-tratamento é um passo importante para evitar aglomerações, e visa adaptar a carga do suporte à carga das NP. Na tabela 1 é mostrada a relação entre grades e NP, dependendo da carga e os tipos de tratamento adequados.

Para introduzir carga positiva na grade aumentando assim a hidrofobicidade da mesma, descreve-se a seguir o tratamento com *Alcian blue* [25], pois muitas suspensões são preparadas em água. Como resultante tem-se uma grade carregada positivamente a qual interage atrativamente às NP.

Tabela 1 – Tratamentos recomendados segundo a relação NP/grade.

Carga das NP e tipo de meio	Tipos de grade	Tratamento
Partículas sem carga em meio hidrofóbico	qualquer	não é necessário
Partículas com carga negativa e meio polar	grades hidrofílicas, carga positiva	<ul style="list-style-type: none"> • tratamento com <i>Alcian blue</i> [25] (filmes suporte de carbono) • silanização (filmes de SiO₂) [10]
Partículas com carga positiva	grades com cargas negativas	<i>glow discharge</i> [26]
Carga do nanomaterial desconhecida	é preciso avaliar	

Fonte: SOP Nanoreg [27]

Pré-tratamento com *Alcian blue*: sobre uma superfície limpa deve se pingar uma gota de *Alcian Blue* diluído em água ultrapura a 1 % (w/w), e colocar a grade sobre a gota deixando o filme de carbono em contato com a solução entre 1 e 10 minutos. A grade deve ser logo lavada para retirar o excesso do *Alcian Blue* colocando-a sucessivamente em cinco gotas de água e removendo depois o excesso de umidade com papel absorvente.

Nota – Usar a grade imediatamente após o tratamento.

6.2.2.2 Procedimento de deposição do NM na grade

- Homogeneizar a dispersão com o nanomaterial por agitação ou pipetagem. Cada alíquota precisa ser retirada do recipiente original utilizando-se uma micropipeta com ponteira plástica descartável e de uso único. Se desejado, também podem ser utilizadas pipetas descartáveis tipo Pasteur.
- Se o NM está bem disperso em um meio apolar ou com uma concentração muito baixa, o **método gota sobre grade** (fig. 2a) em geral é suficiente: uma gota (5-50 μm) é pipetada sobre a grade e deixada secar.
- Se o NM estiver em meio aquoso, o **método grade sobre gota** (fig. 2b) é mais adequado: numa superfície limpa pingar uma gota da suspensão (5-50 μm) e sobre ela colocar a grade. Deixar interagir entre 1-10 minutos. Remover o excesso de líquido colocando gentilmente um papel absorvente na borda da grade.

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, *ependorf*) devidamente identificadas.

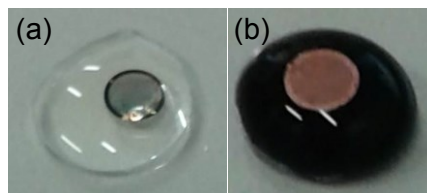


Fig. 2 – Métodos de disposição nas grades: (a) gota sobre grade e (b) grade sobre gota. Em ambos os métodos o filme de carbono da grade deve estar em contato com a suspensão.

7 Aquisição de imagens

O equipamento deve estar alinhado e calibrado utilizando-se algum protocolo adequado para o tipo de microscópio e configurações de câmera [11-13, 28].

7.1 Amostragem

Para evitar a subjetividade do microscopista na seleção das partículas a serem analisadas, as posições da grade onde as imagens serão adquiridas devem ser predefinidas (exemplo na figura 3). 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.

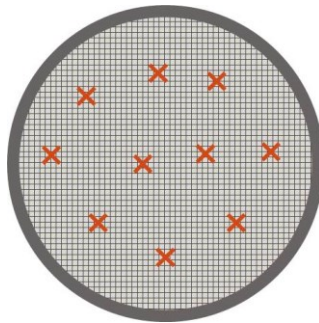


Fig. 3 – Algumas regiões predefinidas numa grade de TEM.

7.2 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 [27, 29]. O limite inferior é baseado no trabalho de Merkus [30], 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].

Em outras palavras, 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 [30])
- 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 (exemplo da figura 4), as imagens devem ser adquiridas usando duas magnificações diferentes para evitar tendência (viés).

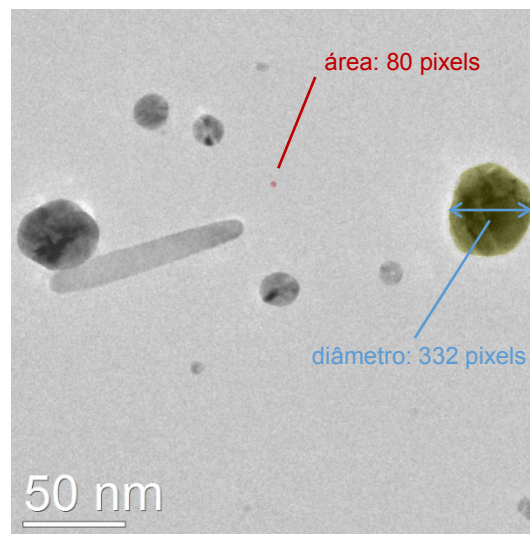


Fig. 4 – Este NM apresenta uma dispersão de tamanho tal que não é possível caracterizá-lo usando uma só magnificação para esta resolução da câmera. O tamanho da imagem em pixels é de 2048 x 2048. A NP indicada em vermelho tem uma área menor que 100 pixels e a partícula indicada em azul tem um diâmetro maior que os 10% de 2048, portanto ambas teriam que ser excluídas da análise. Para incluir essas partículas (e similares), duas magnificações diferentes devem ser utilizadas.

7.3 Procedimento para aquisição de imagens por SEM

Antes de tudo, é importante ressaltar que algumas NP são tão pequenas que muitos SEM não são capazes de resolver seu tamanho e morfologia.

7.3.1 Ajuste dos parâmetros

O microscópio deve estar alinhado de acordo com os procedimentos do fabricante. Diversos parâmetros podem ser definidos nos SEM para obter uma imagem com boa qualidade, ou seja, com alto poder de resolução:

- A magnificação e, conseqüentemente, o tamanho do campo de visão (HFW) devem ser escolhidos de tal forma que a imagem contenha a quantidade de pixels suficiente para um bom detalhamento dimensional da NP (ver item 7.2), ao mesmo tempo em que minimize a deposição de contaminantes induzida pela longa exposição do feixe sobre a partícula.
- O brilho/contraste da imagem deve ser definido a fim de prover o melhor detalhamento visual das NP e suas distinções do substrato.
- Recomenda-se fortemente não utilizar sistemas eletrônicos capazes de girar a aquisição de imagens (*scan rotation*) ou transladá-la (*beam shift*). Se estes forem indispensáveis é necessário analisar os efeitos causados sobre a dimensionalidade da NP e suas conseqüências na avaliação da incerteza associada a estes procedimentos.

7.3.2 Exemplo

Os parâmetros definidos aqui são apenas guias para os demais operadores, não representando necessariamente as melhores condições para todos os SEM. Diversas NPs têm sido observadas por meio de um equipamento estável, sem evidências de astigmatismo ou outro defeito óptico e focado, utilizando tensão de aceleração de 15 kV, com corrente de 100 pA e distância de trabalho em torno de 4 mm. As imagens foram adquiridas com resolução digital de (2048 x 1768) pixels e com tempo de aquisição de 10 a 30 μ s em cada pixel. Para este tipo de análise, os parâmetros acima resultam em imagens com boa relação sinal-ruído, resultando em uma resolução espacial do equipamento eficaz.

As imagens contidas na figura 5 são representativas e servem para guiar o operador a adquirir uma imagem apropriada para resolver a dimensão e os aspectos morfológicos das NP. Estas imagens foram adquiridas utilizando-se o equipamento SEM/FIB FEI Helios NanoLab 650, instalado no Inmetro/Dimat/Nulam, seguindo os procedimentos descritos acima.

7.3.3 Identificação

As imagens devem ser salvas em um diretório dedicado e identificado. Devem ser incluídas informações relevantes, tais como: modelo do equipamento, tamanho do pixel e do quadro, resolução da captura da imagem e condições de detecção.

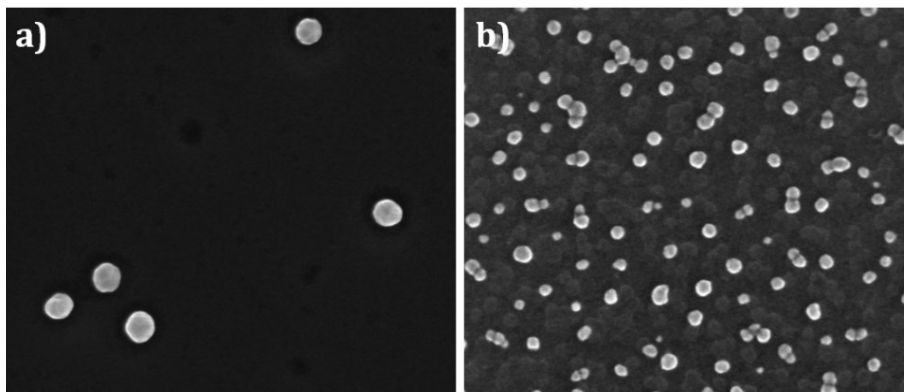


Fig. 5 – (a) MR NIST 8013 contendo NP de Au, com ECD médio de 54,9 nm. HFW de 995 nm. (b) MRC ERM-FD100 contendo NP de SiO₂ com ECD modal de 19,4 nm. HFW de 691 nm.

7.4 Procedimento para aquisição de imagens por TEM

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 o NM. Às vezes pode ser necessário executar a sequência do protocolo adquirindo algumas imagens antes da análise. Quanto melhor forem as imagens adquiridas, menos intervenções do operador serão necessárias no processamento das mesmas.

7.4.1 Calibração

O equipamento deve estar calibrado e alinhado. A verificação da correta operação do instrumento dentro das especificações do fabricante deve ser realizada periodicamente utilizando-se materiais de referência.

Como o zoom da magnificação geralmente é não linear, a porcentagem de erro na magnificação pode ser diferente em cada magnificação. Recomenda-se, portanto, que a(s) magnificação(ões) usada(s) na(s) análise(s) esteja(m) calibrada(s).

7.4.2 Operação do TEM

Antes da análise deve-se escolher a voltagem de aceleração conforme a amostra a ser analisada deixando tempo suficiente para que estabilize.

7.4.2.1 Escolha das condições de operação

Para se determinar os parâmetros ótimos de operação, pode-se utilizar uma grade extra com o NM, preparada para tal fim, ou, caso isso não seja possível, pode-se utilizar uma região da mesma amostra. Esses testes são necessários para:

- 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 no item 7.2

7.4.2.2 Aquisição de imagens

Para cada posição preestabelecida (figura 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).
- Adquirir e salvar cada uma das imagens.
- Incluir a informação da aquisição (tamanho da imagem, tamanho do pixel, condições de aquisição, tipo e marca do TEM).

7.4.3 Exemplo

As imagens da figura 6 são representativas e servem apenas como guia para o operador. Foram adquiridas seguindo os procedimentos descritos previamente neste guia utilizando-se os microscópios eletrônicos de transmissão FEI Tecnai

G² Spirit com filamento de LaB₆ (Fig. 6a) e FEI Titan 80-300, com FEG (Fig. 6b) instalados no Inmetro/Dimat/Nulam.

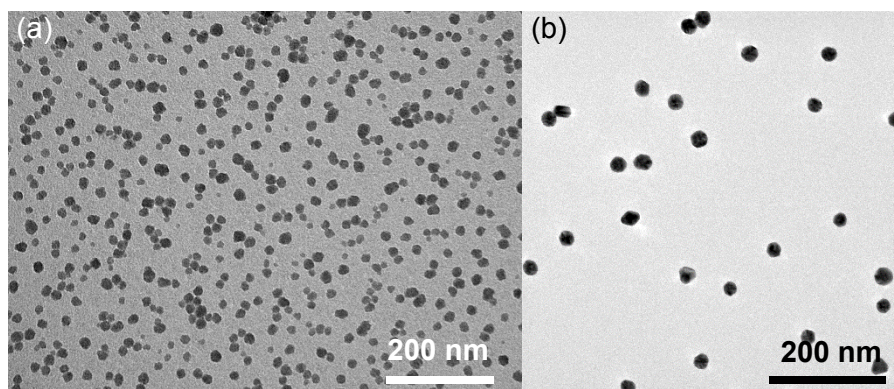


Fig. 6 – Imagens de TEM de (a) MRC ERM-FD100 contendo NP de SiO₂ com ECD modal de 19,4 nm; (b) MR NIST 8012 contendo NP de Au, com ECD médio de 27,2 nm.

7.4.4 Identificação

As imagens devem ser salvas numa pasta dedicada e identificada. Devem ser incluídas informações relevantes, tais como: modelo do equipamento, voltagem de aceleração usada, uso ou não de lentes objetivas e tamanho da abertura das mesmas, tamanho do pixel e do quadro, resolução da captura da imagem e condições de detecção.

8 Análise de dados

O procedimento para análise das imagens aqui descrito serve tanto para imagens obtidas por TEM como por SEM. Caso haja alguma etapa específica para alguma das técnicas, a mesma será indicada no texto.

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. O *software ImageJ* [<http://imagej.net/Welcome>] ou o pacote *Fiji* [<http://fiji.sc/>] que inclui o *ImageJ*, tem a grande vantagem de serem *softwares* abertos e gratuitos. 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 a de 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 NPs presentes na imagem, deve-se distingui-las do fundo. 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.

8.1 Preparação das imagens

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.

8.1.1 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.

8.1.2 Binarização

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.

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

8.2 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 [14]). O marco de medição pode ser definido de duas maneiras:

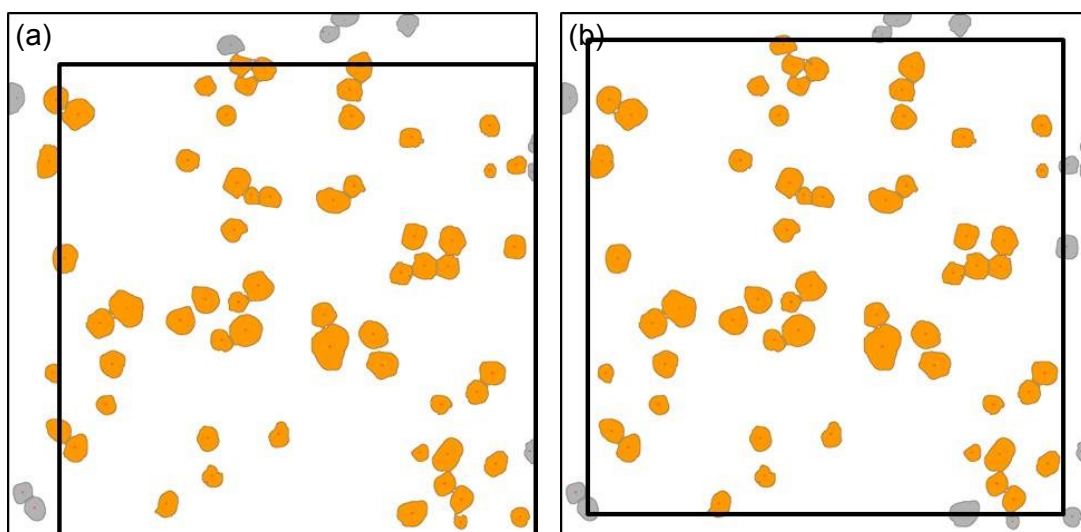


Fig. 7 – Exclusão das partículas com base em: (a) marco de medição, (b) posição das coordenadas X-Y do centro de massa das nanopartículas

8.2.1 NP excluídas de acordo com o marco de medição (figura 7a).

- 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.

8.2.2 NP excluídas de acordo com suas coordenadas X-Y do centro de massa (figura 7b).

- 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.

8.3 Seleção dos mensurandos

Distribuições de tamanhos requerem um único mensurando, enquanto que distribuições de forma requerem dois mensurandos. Desta forma, recomenda-se salvar os valores de todos os mensurandos que o *software* pode calcular. Assim, o operador fica com uma base de dados completa da amostra, visto que análises posteriores não poderão ser realizadas para complementar uma base de dados já existente. Alguns possíveis mensurandos estão descritos na secção 3.3. Para distribuições de tamanho, é importante levar em consideração que o diâmetro circular equivalente (ECD) geralmente é o valor certificado nos materiais de referência.

8.4 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 [31]. Recomenda-se que seja verificado que tais limites não alterem significativamente a distribuição de tamanho.

Quando a intenção é caracterizar as partículas primárias ou cristalitos que formam agregados, primeiramente as partículas primárias devem ser identificadas e separadas. A utilização de ferramentas para separação de objetos como o algoritmo “divisor de águas” (*watershed*) costuma subestimar o tamanho e mudar a forma das partículas, como é mostrado na figura 8.

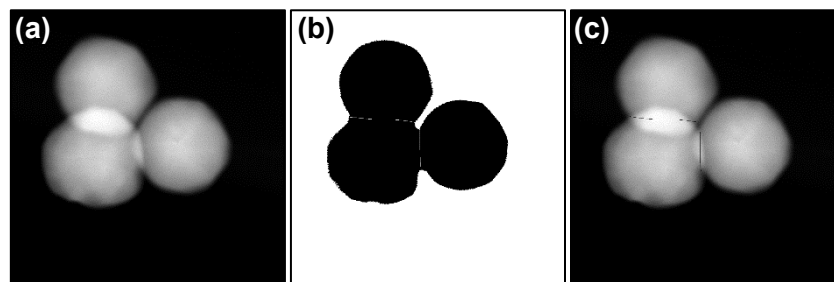


Fig. 8 – (a) Grupo de três partículas em contato, (b) binarização e separação das mesmas usando a ferramenta “divisor de águas” (*watershed*) (c) comparação com as partículas originais.

A técnica tradicional para se medir o tamanho das partículas primárias dentro de agregados e aglomerados envolve uma extensiva intervenção do operador em medidas manuais e na interpretação das micrografias. De Temmerman et al [32] propuseram um método usando um algoritmo de análise de imagem automático que combina a detecção das partículas primárias nas imagens binarizadas usando a segmentação *watershed*, com a medida de seus tamanhos a partir dos mapas de distância euclidiana EDM (*Euclidean distance map*). O EDM cria uma imagem em escala de cinza a partir da imagem binarizada atribuindo um valor de cinza a cada pixel. Esses valores correspondem à distância euclidiana do pixel ao pixel do fundo mais próximo.

8.5 Processamento das imagens

8.5.1 Análise das NP

É importante que todos os passos seguidos e métodos selecionados sejam registrados num relatório.

- Realizar o *thresholding* selecionando as partículas de interesse.
- A área da menor partícula considerada nos cálculos deve ser de 100 pixels (ver 7.2).
- Excluir as partículas seguindo algum dos critérios descritos no item 8.2.
- 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 (ver 8.4). Não usar a função *watershed*.
- Salvar as medições numa planilha.

8.5.2 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.

9 Avaliação da incerteza de medição

As incertezas associadas às análises quantitativas dimensionais das NPs, a partir das imagens adquiridas por SEM e TEM, podem ser avaliadas seguindo duas abordagens:

- Abordagem *bottom – up*.
- Abordagem *top – down*.

9.1 Abordagem *bottom–up*

Essa abordagem pressupõe um modelo matemático completo e está descrita na ISO GUM (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*) [33]. A incerteza de um resultado de medição é geralmente avaliada utilizando-se o modelo e a lei de propagação de incertezas. Dessa forma, as incertezas das grandezas de entrada são avaliadas e posteriormente combinadas na incerteza padrão da grandeza de saída. Esta abordagem normalmente segue o seguinte roteiro:

- Definição do mensurando e do seu modelo
- Identificação e quantificação das fontes de incerteza (construção do diagrama de Ishikawa)
- Cálculo dos coeficientes de sensibilidade
- Cálculo dos componentes de incerteza
- Cálculo da incerteza padrão combinada
- Cálculo do número de graus de liberdade efetivos
- Cálculo do coeficiente de abrangência (para uma determinada probabilidade de abrangência)
- Cálculo da incerteza expandida
- Declaração do resultado final indicando o valor do coeficiente de abrangência e a probabilidade de abrangência (geralmente igual a 95%)

9.1.1 Modelagem

Na maioria dos casos o mensurando z não é medido diretamente, mas é determinado a partir de outras grandezas, x_i , por uma função f :

$$z = f(x_1, x_2, \dots, x_N) \quad (1)$$

Uma medição pode ser modelada matematicamente até o grau imposto pela exatidão requerida na medição. Geralmente convém começar com o modelo mais simples possível para depois ir refinando-o, incluindo mais grandezas de entrada que influenciem no valor do mensurando.

9.1.2 Diagrama de Ishikawa

O diagrama de Ishikawa, ou espinha de peixe, é muito útil na construção do modelo e identificação das fontes de incerteza. Por exemplo, se o mensurando depende da medição das grandezas de entrada x_1 e x_2 , e do valor de outro parâmetro x_3 , o diagrama causa-efeito pode ser o da figura 9.

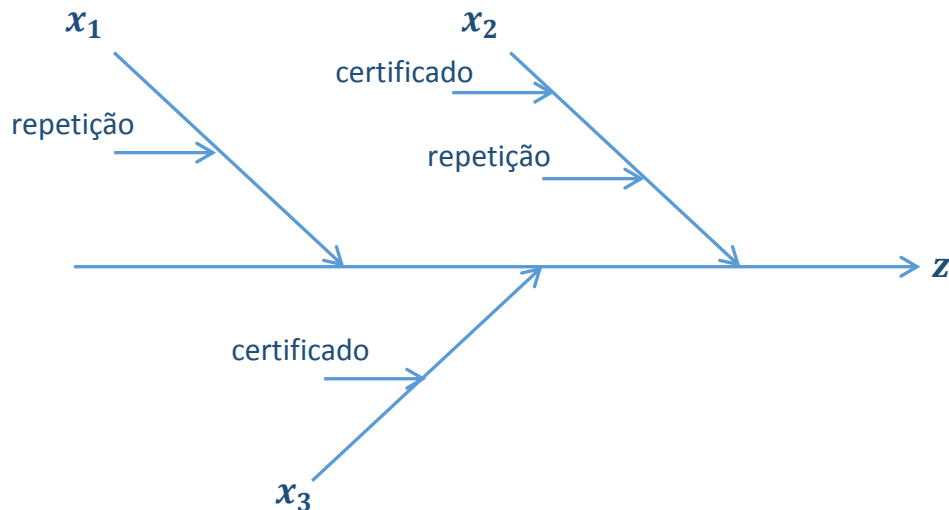


Fig. 9 – Diagrama de Ishikawa para um mensurando calculado a partir de três grandezas de entrada, com quatro fontes de incerteza.

9.1.3 Quantificação das fontes de incerteza

A incerteza de uma medição compreende, em geral, muitas componentes. Algumas destas componentes podem ser avaliadas com base na distribuição estatística dos resultados de séries de medições e podem ser caracterizadas por desvios-padrão experimentais. Outras componentes, que também podem ser caracterizadas por desvios-padrão, são avaliadas por meio de distribuições de probabilidade atribuídas com base na experiência do operador ou em outras informações que estejam disponíveis. As componentes de incerteza são classificadas em duas categorias dependendo do método de avaliação: incertezas do tipo A ou do tipo B. Ambos os tipos de avaliação são baseados em distribuições de probabilidade e os componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variâncias ou desvios-padrão.

9.1.3.1 Incerteza tipo A

É o método de avaliação de incerteza proveniente da análise estatística de uma série de observações. Na maioria dos casos essas observações têm uma distribuição normal, e a melhor estimativa é avaliada pela média aritmética.

A incerteza padrão da média u_x é calculada a partir do desvio padrão experimental S_x e o número de observações repetidas e independentes n :

$$u_x = \frac{S_x}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

9.1.3.2 Incerteza tipo B

É a incerteza avaliada por julgamento científico baseado em todas as informações disponíveis, histórico de medições, especificações do fabricante, dados fornecidos nos certificados de calibração ou outros certificados, dados de referência extraídos de manuais, etc. Dependendo do tipo de distribuição, serão os valores dos desvios-padrão. Seguem exemplos da avaliação das incertezas para as distribuições mais comuns.

- Distribuição retangular ou uniforme:

$$u_x = \frac{(b-a)}{\sqrt{12}} \quad (3)$$

sendo a e b os limites inferior e superior da distribuição.

- Distribuição triangular:

$$u_x = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (4)$$

para uma distribuição simétrica triangular de base $2a$.

- Distribuição proveniente de um certificado de calibração:

$$u_x = \frac{U}{k} \quad (5)$$

sendo U a incerteza expandida declarada e k o coeficiente de abrangência.

9.1.4 Lei de propagação das incertezas

Conhecendo-se o modelo (Eq.1) e as incertezas das grandezas de entrada u_{x_i} , é possível encontrar a incerteza da grandeza medida u_z por meio da lei da propagação das incertezas:

$$u_z^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u_{x_i}^2 + 2 \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \left(\frac{\partial f}{\partial x_j} \right) \text{cov}(x_i, x_j) \quad (6)$$

Onde as derivadas parciais são os coeficientes de sensibilidade c_{x_i} para cada fonte de incerteza:

$$c_{x_i} = \frac{\partial f}{\partial x_i} \quad (7)$$

9.1.5 Incerteza padrão combinada

Caso não haja correlação entre as grandezas de entrada, a Eq. 6 é simplificada perdendo seu termo de correlação, e a incerteza padrão combinada é obtida pela combinação de todos os componentes de incerteza (multiplicação do coeficiente de sensibilidade pela incerteza da grandeza de entrada: $c_{x_i}u_{x_i}$) segundo a seguinte equação:

$$u_c(z) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_{x_i}^2 u_{x_i}^2} \quad (8)$$

A incerteza padrão combinada corresponde apenas a um desvio-padrão, ou a um intervalo contendo 68% de todas as medidas, considerando-se uma distribuição final normal.

9.1.6 Incerteza expandida

Em aplicações comerciais, industriais e regulamentadoras, e quando a saúde e a segurança estão em questão, para dar maior confiabilidade é necessário definir um intervalo maior que o dado por u_c : um intervalo em torno do resultado da medição com o qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. Essa medida adicional de incerteza é denominada incerteza expandida U . A incerteza expandida é obtida multiplicando-se a incerteza padrão combinada u_c por um fator de abrangência k .

$$U(z) = ku_c(z) \quad (9)$$

Esse fator de abrangência geralmente varia entre 2 (95%) e 3 (99%) considerando-se uma distribuição normal.

O resultado de uma medição é então expresso como

$$z \pm U(z) \quad (10)$$

indicando-se o valor de k e da probabilidade de abrangência escolhida (normalmente 95%).

9.2 Abordagem *top-down*

Na ausência de um modelo matemático, deve-se planejar um experimento que contemple variação suficiente para avaliar a incerteza. Esta abordagem é uma forma direta para a determinação da incerteza de medição, baseada nos dados de desempenho do método inteiro. O procedimento de medição em questão é aplicado a objetos apropriados de referência (padrões, medidas de materiais, materiais de referência). Os resultados obtidos são comparados em condições de reprodutibilidade intralaboratorial.

Nesta metodologia, tanto a repetibilidade (variação dentro do mesmo dia), quanto à precisão intermediária (variação dia a dia) são avaliadas, primeiro com um material de referência, e depois com o NM que se quer caracterizar.

9.2.1 Esquema experimental

Deve-se desenhar um experimento de dois níveis como o esquema representado na figura 10. Com essa montagem é capturada a variabilidade da preparação da amostra, da aquisição da imagem, da análise da imagem e da análise dos dados, além da repetibilidade.

- Diferentes ampolas/alíquotas são analisadas em m dias diferentes;
- Em cada dia são analisadas n_r amostras preparadas a partir de uma única ampola;
- São realizadas imagens de ao menos 5 regiões separadas de cada amostra.

A repetibilidade indica a proximidade entre os resultados das medições, realizadas durante um curto período, utilizando-se o mesmo instrumento e realizadas pelo mesmo operador. A precisão intermediária fornece informações sobre as variações que acontecem dia a dia.

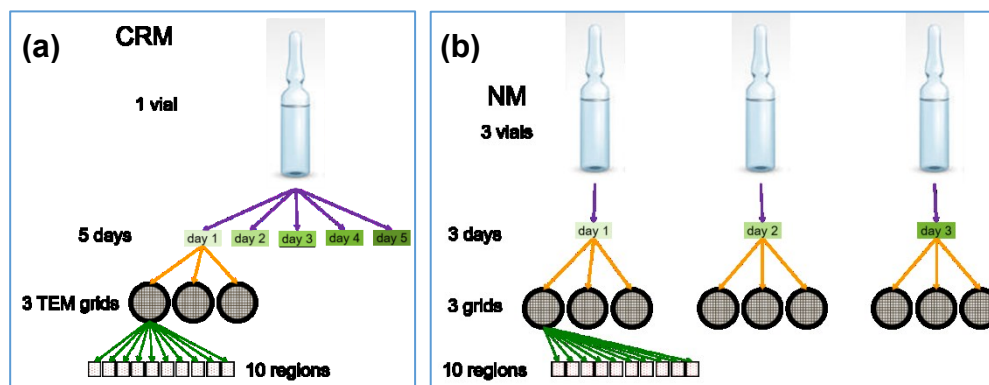


Fig.10 – Esquema experimental de medição na abordagem *top-down* usado nas comparações interlaboratoriais do NANoREG [27] (a) para material de referência: $m_{(MRC)} = 5$ e $n_{r(MRC)} = 3$; (b) para o NM $m_{(NM)} = 3$ e $n_{r(NM)} = 3$.

9.2.2 Avaliação da incerteza

Nesse esquema, a diferença entre o valor do mensurando y e o valor verdadeiro μ é dada pela tendência do laboratório B , a tendência do método δ e o erro aleatório e [34]:

$$y = \mu + B + \delta + e$$

A tendência do laboratório depende do sistema de medição e de outros fatores de precisão intermediária como o operador, preparo da amostra e condições ambientais. Para fins de simplificação neste documento, será definido que $B = 0$.

A incerteza associada à veracidade da medição, $u_t(\delta)$, é uma medida da tendência do método (a diferença sistemática entre o resultado medido e o valor de referência).

A incerteza associada ao termo aleatório engloba as incertezas relacionadas às variações não sistemáticas na preparação das amostras, aquisição de imagens, análise de imagens e análise de dados (incerteza tipo A). No esquema de dois níveis definido no item anterior, a incerteza relativa do termo aleatório, pode ser avaliada a partir das contribuições provenientes da repetibilidade do método, ou variações no mesmo dia, u_r , e das variações entre dias consecutivos, ou precisão intermediária, u_{ip} .

Outra fonte de incerteza que afeta a variabilidade do sistema de medição é a incerteza associada à calibração do instrumento u_{cal} (incerteza tipo B).

A incerteza relativa associada ao valor medido u_m pode ser obtida pela combinação quadrática das incertezas descritas anteriormente:

$$u_m^2(y) = u_t^2(\delta) + u_{ip}^2(y) + u_r^2(y) + u_{cal}^2 \quad (11)$$

Para avaliar a tendência do método (ou veracidade da medição) $u_t(\delta)$, a ideia é desenhar um experimento de dois níveis para capturar a variabilidade do método quando se mede um material de referência (ver fig. 10a) [21]. Assim:

$$u_t^2(\delta) = u_r^2(\delta) + u_{ip}^2(\delta) + u_{MRC}^2 \quad (12)$$

Sendo $u_r(\delta)$ a incerteza associada à repetibilidade e $u_{ip}(\delta)$ às variações em diferentes dias quando um MRC é medido (incertezas tipo A), e u_{MRC} a incerteza do valor certificado do MRC (incerteza tipo B).

A incerteza associada à repetibilidade é calculada a partir do conjunto de dados usando-se a Eq. 13.

$$u_r = \sqrt{\frac{MS_{within}}{m \cdot n_r}} \quad (13)$$

sendo MS_{within} a média da soma dos quadrados, m o número de dias e n_r o número de repetições.

A incerteza associada à precisão intermediária é determinada a partir da Eq. 14:

$$u_{ip} = \sqrt{\frac{MS_{between} - MS_{within}}{m \cdot n_r}} \quad (14)$$

sendo $MS_{between}$ a média da soma dos quadrados entre diferentes dias.

Calculando-se as contribuições da repetibilidade (Eq.13) e da precisão intermediária (Eq.14) para o material de referência obtém-se a incerteza associada à veracidade mediante a Eq. 12. Assume-se que todas as contribuições para a incerteza final estão cobertas pela incerteza associada à precisão intermediária e à repetibilidade para o NM, além das incertezas associadas à veracidade e à calibração. Então a incerteza da medição combinada pode ser avaliada a partir da Eq. 11. Supondo que a incerteza combinada está normalmente distribuída e que se requer um nível de confiança de aproximadamente 95%, a incerteza combinada pode ser multiplicada por um fator de abrangência $k = 2$ para se obter a incerteza de medição expandida $U(y)$ (ver Eq.10).

10 Relatório de ensaio

O relatório de ensaio é um instrumento formal capaz de descrever com clareza e detalhamento os procedimentos usados durante o experimento e seus respectivos resultados. O relatório deve conter informações sobre a identificação do operador, identificação da amostra e sua preparação para a técnica utilizada, a metodologia empregada na análise, os instrumentos e equipamentos utilizados e os resultados obtidos.

A seguir serão citadas algumas informações recomendadas a serem reportadas em um relatório de ensaio.

10.1 Informações gerais [19]

- Nome e endereço institucional do responsável pela amostra.
- Nome e endereço institucional do operador/usuário do equipamento.
- Identificação única da amostra.

10.2 Informações da amostra [14]

- Data de recebimento das amostras.
- Breve descrição das amostras e identificação das mesmas.
- Data da abertura do recipiente.
- Descrição completa do método de preparação usado, com detalhes quantitativos das massas nominais, volumes e composições dos produtos para amostras que precisam ser dispersadas ou diluídas.
- Data de preparação da amostra.

10.3 Preparação da amostra

- Data de preparo de cada espécime para microscopia.
- Método usado, incluindo limpeza e secagem.
- Tipo de substrato utilizado.

10.4 Descrição do instrumento e método utilizado

- Tipo e modelo de equipamento utilizado.
- Descrição do procedimento de calibração e data da última verificação do equipamento.
- Material de referência utilizado e incerteza da calibração.
- Frame da câmera (pixels).
- Descrição do método utilizado e condições experimentais.

10.5 Análises e resultados

- Data de realização do ensaio.
- Tamanho do pixel.
- Área da imagem.
- Área total analisada em cada amostra.
- Procedimento de exclusão de partículas da borda da imagem.
- Quantidade de NPs analisadas.
- Identificação do software utilizado para o processamento digital de imagem.
- Descrição de ajustes digitais na imagem (brilho, contraste, filtros, *threshold*).

- Resultados (média, moda e/ou mediana, razões de aspecto, distribuições e histogramas).
- Avaliação da incerteza associada à medição em relação à média, moda e/ou mediana do mensurando.

11 Referências

- 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- ISO/TS 80004-1:2015. *Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms*. 2015, ISO: Geneva, Switzerland.
- 5- ISO/TS 80004-2:2015. *Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects*. 2015, ISO: Geneva, Switzerland.
- 6- ISO/TS 80004-6:2013. *Nanotechnologies – Vocabulary – Part 6: Nano-objects characterization*. 2013, ISO: Geneva, Switzerland.
- 7- ISO/TS 17200:2013. *Nanotechnologies – Nanoparticles in powder form – Characteristics and measurements*. 2013, ISO: Geneva, Switzerland.
- 8- ASTM E2456-06 (2012). *Standard Terminology for Nanotechnology*. 2012. ASTM International, West Conshohocken, PA, United States. [DOI: 10.1520/E2456-06R12]
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- ISO 16700:2016. *Microbeam analysis – Scanning electron microscopy – Guidelines for calibrating image magnification*. 2016, ISO: Geneva, Switzerland.
- 12- ISO 29301:2010. *Microbeam analysis – Analytical transmission electron microscopy – Methods for calibrating image magnification by using reference materials having periodic structure*. 2010, ISO: Geneva, Switzerland.
- 13- ASTM E766-14e1. *Standard Practice for Calibrating the Magnification of a Scanning Electron Microscope*. 2014. ASTM International, West Conshohocken, PA, United States. [DOI: 10.1520/E0766-14E01]
- 14- ISO 13322-1:2014. *Particle size analysis – Image analysis methods – Part 1: Static image analysis methods*. 2014, ISO: Geneva, Switzerland.
- 15- ASTM E2578 – 07 (2012). *Standard Practice for Calculation of Mean Sizes/Diameters and Standard Deviations of Particle Size Distributions*. 2012, ASTM International, West Conshohocken, PA, United States. [DOI: 10.1520/E2578-07R12]

- 16- ISO 9276-2:2014. *Representation of results of particle size analysis – Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions*. 2014, ISO: Geneva, Switzerland.
- 17- ISO 9276-3:2008. *Representation of results of particle size analysis – Part 3: Adjustment of an experimental curve to a reference model*. 2008, ISO: Geneva, Switzerland.
- 18- 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.
- 19- ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. 2005, ABNT NBR.
- 20- Norma NIT-Dicla-035: *Princípios das Boas Práticas De Laboratório – BPL*. Rev. 02. 2011. Dicla/Cgcre.
- 21- ISO 21748:2017. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*. 2017, ISO: Geneva, Switzerland
- 22- L 275/38 Official Journal of the European Union 20.10.2011
- 23- VIM 2012: *Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados*. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, 2012. 94 p. [http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/vim_2012.pdf]
- 24- S.B. Rice, C. Chan, et al.: *Particle size distributions by transmission electron microscopy: an interlaboratory comparison case study*. *Metrologia* 50, pp. 663–678, 2013 [DOI: 10.1088/0026-1394/50/6/663]
- 25- 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]
- 26- E. Namork and B. V. Johansen: *Surface activation of Carbon film supports for biological electron microscopy*. *Ultramicroscopy* 7, pp.321-329, 1982 [DOI: 10.1016/0304-3991(82)90257-1]
- 27- J.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.
- 28- 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]
- 29- 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]
- 30- H.G. Merkus: *Particle size measurements: fundamentals, practice, quality*. Pijnacker: Springer, 2009. 533 p. ISBN 978-1-4020-9015-8
- 31- 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]

- 32- P.-J. De Temmerman et al.: *Semi-automatic size measurement of primary particles in aggregated nanomaterials by transmission electron microscopy*. Powder Technol. 261, p. 191–200, 2014 [DOI: 10.1016/j.powtec.2014.04.040]
- 33- ISO GUM 2008 (JCGM 100:2008) *Avaliação de dados de medição: Guia para a expressão de incerteza de medição*. ISBN 978-85-86920-13-4. Duque de Caxias, RJ: Inmetro/Cicma/Sepin 2012; 141 pág.
- 34- C.E. Galhardo, *Estudo RR no Curso Avaliação de incerteza de medição dimensional utilizando microscopia eletrônica*, Inmetro – Sisnano. Setembro de 2015
- 35- G. Roebben, S. Ramirez-Garcia, et al: *Interlaboratory comparison of size and surface charge measurements on nanoparticles prior to biological impact assessment*. J Nanopart. Res 13:2675–2687. 2011 [DOI: 10.1007/s11051-011-0423-y]