

SECRETARÍA DE ECONOMÍA

DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS

PROYECTO DE NORMA MEXICANA

PROY-NMX-R-21363-SCFI-2019

**NANOTECNOLOGÍAS - MEDICIÓN DE DISTRIBUCIONES
DE TAMAÑO Y FORMA DE PARTÍCULAS MEDIANTE
MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN DE ELECTRONES**

*Nanotechnologies — Measurements of Particle Size and Shape
Distributions by Transmission Electron Microscopy*

Prefacio

Este Proyecto de Norma Mexicana NMX-R-21363-SCFI-2019 fue elaborado por el Comité Técnico de Normalización Nacional en Nanotecnologías, de forma tal que es idéntico a la Norma Internacional ISO/IS 21363:2019 *Nanotechnologies — Measurements of Particle Size and Shape Distributions by Transmission Electron Microscopy*, salvo las aclaraciones contenidas en las NOTAS EXPLICATIVAS NACIONALES incorporadas en el texto del documento.

Se hace notar que las referencias bibliográficas se identifican entre corchetes [*autor*] en el texto, y se describen en la sección 10 Bibliografía.

En la elaboración de la presente Norma Mexicana participaron especialmente las empresas e instituciones siguientes:

- Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C.
- Centro Nacional de Metrología
- El Colegio de San Luis, A.C.
- Instituto Mexicano del Petróleo
- Ivonne Rosales Chávez
- Thermo Fisher Scientific Mexico

Prefacio de la norma internacional

ISO (la Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las Normas Internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en un tema para el cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en ese comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica. Los procedimientos aplicados para desarrollar este documento y los dirigidos a su mantenimiento se describen en la Parte 1 de las Directivas ISO, véase www.iso.org/directives. En particular deberían notarse los diferentes criterios para la aprobación de los diferentes tipos de documentos ISO. Este documento fue elaborado observando las reglas editoriales de la Parte 2 de las Directivas ISO.

Existe la posibilidad de que algunos de los elementos de este documento sea objeto de derechos de patente. ISO no es responsable de la identificación de alguno o todos los derechos de dichas patentes. Los detalles de los derechos de patente identificados durante el desarrollo del documento se encuentran en la Introducción o en la lista ISO de declaraciones sobre patentes que se hayan recibido.

La explicación del significado de los términos y expresiones ISO específicos relativos a la evaluación de la conformidad, y la información acerca de la adhesión de ISO a los principios de la Organización Mundial del Trabajo (WTO) en las Barreras Técnicas al Comercio (TBT) se encuentran en www.iso.org/iso/foreword.html.

El Comité técnico ISO / TC 229 *Nanotechnologies* es responsable de la elaboración del original de este documento.

Índice del contenido

Prefacio	2
Prefacio de la norma internacional	3
Índice del contenido	4
Introducción	6
1. Objetivo y campo de aplicación	8
2. Referencias normativas	8
3. Términos y definiciones, símbolos y abreviaturas	9
4. Necesidades de procedimientos de medida mediante TEM por las partes interesadas	26
5. Preparación de la muestra	27
5.1 Recomendaciones generales	27
5.2 Representatividad de la muestra	27
5.3 Disminución de la aglomeración de las partículas en la dispersión de la muestra	28
5.4 Selección del soporte del montaje	29
6. Factores instrumentales	29
6.1 Configuración del instrumento	29
6.2 Calibración	30
6.3 Configuración de las condiciones de operación del TEM para calibración	33
7. Captura de las imágenes	34
7.1 Generalidades	34
7.2 Procedimiento de medición	37
7.3 Revisión de los protocolos para la captura de imágenes	38
8. Análisis de partículas	38
8.1 Análisis de partículas individuales	38
8.2 Análisis automatizado de partículas	38
8.3 Ejemplo: procedimiento de análisis automatizado de partículas	39
9 Análisis de los datos	40
10 Informe de resultados	49
11. Concordancia con normas internacionales	53
Apéndice A (informativo) Casos de estudio, generalidades	54
Apéndice B (informativo) Partículas discretas esferoidales	56
Apéndice C (informativo) Mezcla de tamaños	59
Apéndice D (informativo) Mezcla de formas	71

Apéndice E (informativo) Agregados amorfos.....	75
Apéndice F (informativo) Agregados nanocristalinos.....	79
Apéndice G (informativo) Partículas de baja relación de aspecto.....	82
Apéndice H (informativo) Nanopartículas con hábitos cristalinos específicos....	87
12. Bibliografía.....	94
13. Vigencia.....	97

PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-R-21363-SCFI-2019

Nanotecnologías - Mediciones de distribuciones de tamaño y forma de partículas mediante microscopía de transmisión de electrones

Nanotechnologies — Measurements of Particle Size and Shape Distributions by Transmission Electron Microscopy

Introducción

Los procedimientos de caracterización de nanopartículas a menudo incluyen, pero no se limitan, al tamaño, la forma, estructura superficial y química de la superficie. Estas mediciones, combinadas con información sobre la fase como fase cristalina, describen la morfología del material. Este documento se enfoca en dos atributos de la morfología, las distribuciones del tamaño y de la forma para nano-objetos discretos, agregados o aglomerados. La microscopía por transmisión de electrones, una herramienta típica para medir en la nanoescala, produce imágenes bidimensionales de las proyecciones de las partículas en un plano. El flujo de trabajo para medir y evaluar las distribuciones de tamaño y forma a la nanoescala incluye, de manera general, la preparación de la muestra, los factores instrumentales, la captura de las imágenes, el análisis de las partículas, el análisis de los datos y el informe. Este documento incluye siete casos de estudio a fin de ilustrar la manera de aplicar este protocolo genérico a diferentes morfologías de partículas y tipos de muestra. Se discuten los reportes para tres clases de muestras de partículas discretas: esferoidales (nanoesferas de oro), una mezcla bimodal de tamaños de partícula (sílice coloidal), y una mezcla de formas de partículas (nanoesferas de oro y nanocubos de oro). Además, se reportan resultados de dos muestras de agregados: agregados aciniformes amorfos (negro de carbono) y agregados de cristales primarios de óxido de titanio. También se presentan métodos de medida para muestras de partículas de baja relación de aspecto y para nanopartículas con hábitos cristalinos específicos. Algunos de los casos de estudio están soportados por comparaciones entre laboratorios conducidas bajo los lineamientos de VAMAS – *Versailles Project on Advanced Materials and Standards*- [Roebben, 2017].

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: En algunos documentos se utiliza el término “titania” como otro nombre del óxido de titanio.

Este documento considera tres tipos de descriptores de tamaño y forma. Los descriptores de tamaño incluyen aquéllos determinados a partir de mediciones de longitudes o áreas. Los descriptores de forma incluyen descriptores de elongación, como el cociente de dos descriptores de longitud, y descriptores de rugosidad con los cuales se representan las irregularidades de la superficie.

El protocolo realza los análisis cualitativos y cuantitativos de la calidad de los datos, por parte del usuario. Las comparaciones cualitativas de conjuntos de datos incluyen la determinación de similitudes y diferencias entre descriptores univariados o multivariados. Las comparaciones cuantitativas de conjuntos de datos tienen su base en las diferencias y similitudes entre los parámetros de modelos de referencia ajustados

a las distribuciones de descriptores. Para definir la distribución de un descriptor son necesarios por lo menos dos parámetros con sus incertidumbres respectivas, uno de tendencia central como la media y otro de dispersión. En algunos casos no basta esta información para esta finalidad. Las técnicas de visualización de datos, tales como la desviación de residuales y los gráficos de cuantiles, y la correlación entre los datos, tales como parejas de tamaño y forma o análisis fractal, pueden ofrecer formas alternas para evaluar y diferenciar las muestras bajo prueba. En conjunto, las métricas cualitativas y cuantitativas de la calidad de los datos aunadas a las herramientas de visualización y correlación permiten al usuario ajustar el protocolo a sus objetivos tanto cualitativos como cuantitativos.

1. Objetivo y campo de aplicación

Este Proyecto de Norma Mexicana ofrece orientaciones sobre la manera de capturar, medir y analizar imágenes de microscopios de transmisión de electrones para obtener distribuciones de tamaño y forma de partículas en la nanoescala.

NOTA: Este Proyecto de Norma Mexicana se aplica ampliamente tanto a nano-objetos como a partículas cuyos tamaños excedan 100 nm. El rango de trabajo exacto del método depende de la incertidumbre requerida y del desempeño del microscopio de transmisión de electrones que se utilice, el cual debe evaluarse de acuerdo a los requisitos descritos en este documento.

2. Referencias normativas

Los siguientes documentos son indispensables para la aplicación de este documento. Solamente son válidas las ediciones que se indican cuando las referencias están fechadas. Cuando no se indica la fecha de la referencia, aplica su edición más reciente.

- ISO 9276-1:1998 Representation of results of particle size analysis - Part 1: Graphical representation
- ISO 9276-3:2008 Representation of results of particle size analysis - Part 3: Fitting of an experimental cumulative curve to a reference model
- ISO 9276-6:2008 Representation of results of particle size analysis - Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology.
- ISO 13322-1:2004:2013 Particle size analysis - Image analysis methods - Part 1: Static image analysis methods
- ISO 26824 Particle characterization of particulate systems - Vocabulary
- ISO 29301:2010 Microbeam analysis - Analytical transmission electron microscopy - Methods for calibrating image magnification by using reference materials having periodic structures.
- NMX-R-80004-1-SCFI-2013 Nanotecnologías – Vocabulario – Parte 1: Conceptos básicos
- NMX-R-27687-SCFI-2013, Nanotecnologías — Terminología y definiciones para nano-objetos - Nanopartícula, nanofibra y nanoplaca.
- NMX-R-80004-3-SCFI-2013 Nanotecnologías – Vocabulario – Parte 3: Nano-objetos de carbón
- NMX-CH-5725-1-IMNC-2006 ISO 5725-1:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición -Parte 1: Principios Generales y definiciones.
- NMX-Z-055-IMNC-2009 Vocabulario Internacional de Metrología-Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM), idéntica a ISO/IEC Guide 99:2007.
- NMX-CH-140-IMNC-2002 Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones, idéntica a ISO/IEC Guide 98:1995.
- PROY NMX-R-80004-4-SCFI-2017 Nanotecnologías - Vocabulario – Parte 4: Materiales nanoestructurados
- PROY-NMX-R-80004-6-2015 Nanotecnologías-Vocabulario-Parte 6: Caracterización de nano-objetos

3. Términos y definiciones, símbolos y abreviaturas

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Con la finalidad de facilitar la relación de las acepciones de los términos en español con los originales y evitar redundancias innecesarias, se muestran entre paréntesis y en *itálicas* los términos originales de aquéllos que NO provengan de otras normas mexicanas.

3.1 Términos esenciales: partículas

3.1.1 nano-objeto

material con una, dos o tres dimensiones externas en la nanoescala

NOTA: Término genérico para todos los objetos discretos en la nanoescala.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 2.2]

3.1.2 nanoescala

intervalo de dimensiones de 1 nm a 100 nm, aproximadamente

NOTA 1: En este intervalo aparecen, aunque no de manera exclusiva, propiedades que no son extrapolaciones de un tamaño mayor. Para tales propiedades los límites del intervalo se consideran aproximados.

NOTA 2: El límite inferior en esta definición (1 nm aproximadamente) se introduce para evitar la designación de átomos individuales y de pequeños grupos de átomos como nano-objetos o elementos de nanoestructuras, lo que podría deducirse en ausencia de un límite inferior.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 2.1]

3.1.3 partícula

pieza diminuta de materia con límites físicos definidos

NOTA 1: Puede describirse un límite físico como una interfaz.

NOTA 2: Una partícula puede moverse como una unidad.

NOTA 3: Esta definición de partícula general aplica a nano-objetos.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 3.1]

3.1.3.1 partícula primaria

partícula origen de aglomerados o agregados, o de mezclas de ambos

NOTA 1: Las partículas constitutivas de aglomerados o agregados pueden ser también partículas primarias, a un nivel apropiado, aunque a menudo las partículas constitutivas son agregados.

NOTA 2: Los agregados y aglomerados también se denominan partículas secundarias.

[Adoptada de ISO TS 80004-2:2015, definición 3.2]

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Esta definición es relevante para el entendimiento pleno de este documento.

3.1.4 **partícula constitutiva**

componente integral, identificable, de una partícula mayor

[Adoptada de ISO TS 80004-2:2015, definición 3.3]

3.1.5 **aglomerado**

conjunto de partículas, agregados o mezcla de ambos, débilmente unidas, en el cual la superficie externa resultante es similar a la suma de las áreas de la superficies de los componentes individuales

NOTA 1: Las fuerzas que mantienen unido un aglomerado son fuerzas débiles, por ejemplo, fuerzas de van der Waals, o un entramado físico simple.

NOTA 2: Los aglomerados también son llamados partículas secundarias y las partículas que los originan son llamadas partículas primarias.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 3.2]

3.1.6 **agregado**

partícula compuesta por partículas fuertemente enlazadas o fusionadas, en la cual la superficie externa resultante puede ser significativamente menor que la suma de las áreas superficiales calculadas de los componentes individuales

NOTA 1: Las fuerzas que mantienen unido a un agregado son fuerzas fuertes, por ejemplo enlaces covalentes, o fuerzas resultantes del sinterizado o de un entramado físico complejo.

NOTA 2: Los agregados también son llamados partículas secundarias y las partículas que los originan son llamadas partículas primarias.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 3.3]

3.1.7 **nanopartícula**

nano-objeto con las tres dimensiones en la nanoescala

NOTA: Si la diferencia entre el eje más largo y el más corto del nano-objeto difieren, entonces serán utilizados los términos nanobarra o nanoplaca en lugar del término nanopartícula.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 4.1]

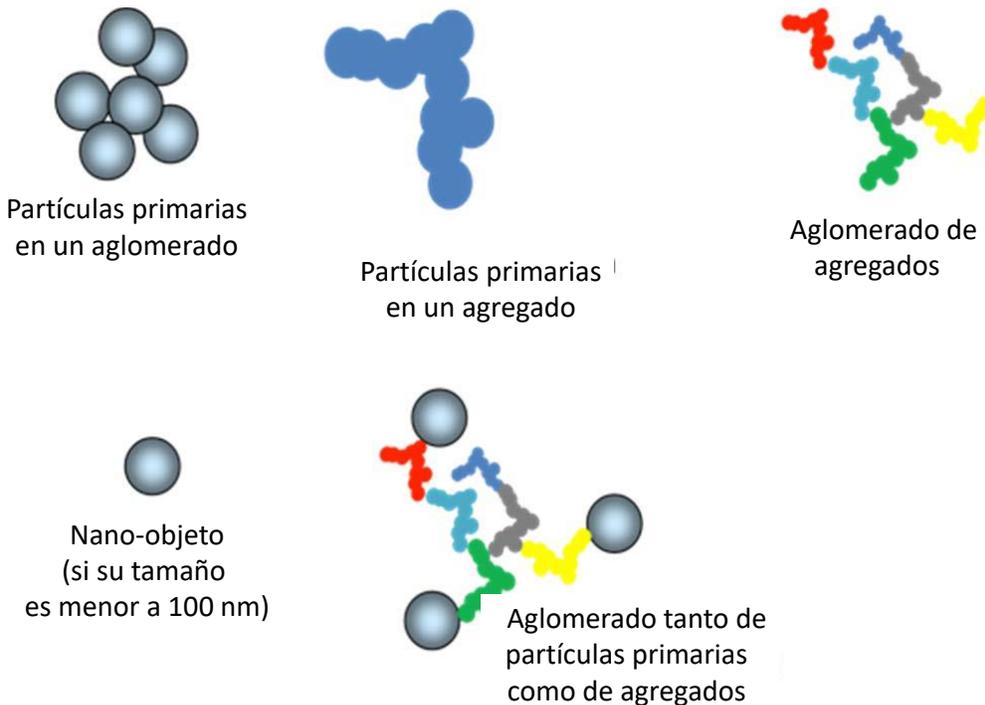


Figura 1 - Esquema de los tipos de agregados, aglomerados y partículas primarias.

3.1.8 nanobarra

nanofibra sólida

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 4.5]

3.1.9 nanofibra

nano-objeto con dos dimensiones externas similares en la nanoescala y la tercera dimensión significativamente mayor

NOTA 1: Una nanofibra puede ser rígida o flexible.

NOTA 2: Se considera que las dos dimensiones externas similares difieren entre sí en menos de tres veces, mientras que la dimensión externa significativamente mayor difiere de las otras dos en más de tres veces.

NOTA 3: La dimensión externa mayor no está necesariamente en la nanoescala.

[Adoptada de NMX-R-27687-SCFI-2014, definición 4.3]

3.1.10 nanodispersión

material en el cual hay nano-objetos (2.2) o una nanofase (2.12) distribuidos dentro de una fase continua de distinta composición.

[Adoptada de PROY-NMX-R-80004-4-SCFI-2018, definición 2.14]

3.1.11 tamaño de partícula

(*particle size*)

x

dimensión de una partícula determinado mediante un método de medida específico bajo condiciones específicas de medición

NOTA 1: Los diversos métodos de medida y de análisis están basados en distintas propiedades físicas. Independientemente de la propiedad de la partícula que se mida, el tamaño de la partícula puede expresarse como una dimensión lineal, un área o un volumen.

NOTA 2: El símbolo x se usa habitualmente para denotar la dimensión lineal. No obstante, reconociendo que el símbolo d también es ampliamente utilizado, puede reemplazarse x por d .

[Adoptada de ISO 9276:1998, definición 4.2]

3.1.12 distribución de tamaño de partícula, DTP

(*particle size distribution, PSD*)

distribución de partículas como función del tamaño de partícula

NOTA: La distribución de tamaño de partícula puede ser expresada como una función de distribución -distribución acumulativa- o una función de densidad de probabilidad -distribución de la fracción de partículas en una clase de tamaño dividida según el ancho de la clase-.

[Adoptada de PROY-NMX-R-80004-6-SCFI-2018, definición 3.1.2]

3.1.13 forma de la partícula

(*particle shape*)

forma geométrica externa de una partícula (2.9)

[Adoptada de PROY-NMX-R-80004-6-SCFI-2018, definición 3.1.3]

3.1.14 distribución de forma de partícula

(*particle shape distribution*)

distribución de un descriptor específico de forma de partícula, en una muestra de una población

3.2 Términos esenciales: métodos de análisis de imágenes

3.2.1 campo visual

(*field of view*)

campo visible en un dispositivo visualizador

3.2.2 campo de medición, micrografía (*measurement frame, micrograph*)

área seleccionada del campo visual en la cual se dimensionan y se cuentan las partículas para analizar sus imágenes

3.2.3 imagen binaria (*binary image*)

imagen digital compuesta por un arreglo de píxeles, cada uno de los cuales tiene un valor 0 ó 1, que son normalmente representados por regiones brillantes y oscuras en la pantalla o por el uso de colores distintos

[Adoptada de ISO 13322-1:2014, definición 3.1.2]

3.2.4 pixel (*pixel*)

elemento más pequeño de una imagen que puede procesarse individualmente, definido por sus coordenadas espaciales y codificado con valores de colores

[Adoptada de ISO 12640-2:2004, definición 3.6]

3.2.5 resolución pixelar (*pixel-resolution*)

número de imágenes de píxeles por unidad de longitud del detector

[Adoptada de ISO 29301:2010, definición 3.27]

3.2.6 cuenta de píxeles (*pixel count*)

número total de píxeles por archivo, longitud o área dependiendo de la unidad que se utilice

[Adoptada de ISO 19262:2015, definición 3.191]

3.3 Términos esenciales: símbolos y definiciones estadísticas

Símbolos

x	valor del descriptor o parámetro descriptor
\bar{x}	media del descriptor o parámetro descriptor
s	desviación estándar del descriptor, x , o del parámetro descriptor
C_v	coeficiente de variación
s_{rel}	desviación estándar relativa
p	estadístico obtenido de un análisis de varianza o de un análisis bivariado

NOTA: En ISO 9276-1:1998 se encuentran definidas medidas de cantidades y tipos de distribuciones.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Por apego al concepto, en este documento se ha adoptado la expresión “desviación estándar” como traducción de “standard error” en el original.

3.3.1 coeficiente de variación (*coefficient of variation*)

cociente de la desviación estándar entre la media aritmética, frecuentemente expresado en forma porcentual

Ejemplo: El coeficiente de variación para una media muestral es

$$\hat{C}_v = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

en donde \bar{x} es la media y s es la desviación estándar de varios conjuntos de datos. Estos descriptores, conocidos como “grandes estadísticos”, se utilizan para evaluar los descriptores en comparaciones entre laboratorios.

[Adoptada de ISO 27448:2009, definición 3.11]

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Por su utilización en este documento, se incluyen los términos varianza y desviación estándar adaptadas de las definiciones 2.136 y 2.37 de la norma NMX-CH-3534-1-IMNC-2008 Vocabulario y símbolos-Parte 1: Términos estadísticos generales y términos empleados en el cálculo de probabilidades.

3.3.1 a varianza

momento de orden 2 de la distribución de probabilidad centrada de una variable aleatoria

3.3.1 b desviación estándar

s
raíz cuadrada positiva de la varianza

3.3.2 desviación estándar en un ajuste (*standard error of estimation*)

medida de dispersión de la variable dependiente, o de salida, en una curva de mínimos cuadrados obtenida por ajuste de la curva o por análisis de regresión

NOTA 1: El estimado del error estándar es

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - k}}$$

Donde

n es el número de datos;

k es el número de coeficientes de la ecuación.

[Adoptada de ISO 772:2011, definición 7.31]

NOTA 2: El estimado de la desviación estándar de la media es la desviación estándar de la distribución de la muestra de un estadístico. El ejemplo es para una media muestral. Este valor disminuye cuando aumenta el tamaño de la muestra.

$$SE_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

3.3.3 desviación estándar relativa (*relative standard error*)

desviación estándar dividida por la media aritmética y expresada en forma porcentual

Ejemplo: La desviación estándar relativa es

$$s_{rel} = \frac{100 \cdot SE_{\bar{x}}}{\bar{x}}$$

3.3.4 sesgo de medida

valor estimado de un error sistemático

[Adoptada de NMX-Z-055-IMNC, definición 2.18]

NOTA 1: El sesgo de medida se presenta cuando un estadístico es sistemáticamente diferente al parámetro de la población que se está estimando.

NOTA 2: Se calcula como el valor absoluto de la diferencia entre un valor medido y el valor certificado correspondiente, $\Delta_m = |c_m - c_{crm}|$.

NOTA 3: El sesgo de medida de la media normal en un estudio sería el promedio de los valores absolutos de las diferencias individuales entre un valor medido y la media del material de referencia certificado, $sesgo = \frac{\sum_{i=1}^n \Delta_{m,i}}{n}$.

3.3.5 residual (*residual*)

diferencia entre el valor observado de la variable de respuesta y el valor estimado de la variable de respuesta

3.3.6 desviación estándar del residual (*residual standard deviation*)

descripción de la dispersión de los valores respecto a la línea de regresión determinada

NOTA: Es una figura de mérito que describe la precisión de la regresión.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: La Nota en el original se refiere a la "precisión de la calibración" debido a que el documento fuente se refiere a calibraciones.

[Adoptada de ISO 8466-1:1990, definición 2.5]

3.3.7 gráfico de cuantiles (*quantile plot*)

método gráfico para comparar dos distribuciones con la misma media y varianza, en el cual los cuantiles de la distribución de datos, empíricos, se grafican en el eje *y* en tanto los cuantiles de la distribución teórica, de referencia, se grafican en el eje *x*

3.4 Términos esenciales: mensurandos

Los mensurandos o los descriptores para medidas de tamaño y de forma pueden ser directamente proporcionales a la longitud (Categoría 1) o al cuadrado de la longitud (Categoría 2).

Descriptores y símbolos de tamaño – Categoría 1

<i>P</i>	longitud del perímetro
<i>P_c</i>	longitud del perímetro de la envolvente convexa que limita la partícula
<i>x_a</i>	diámetro equivalente en área de una partícula, ó diámetro del círculo equivalente
<i>X_{Fmax}</i>	diámetro máximo de Feret, correspondiente a lo “largo” de la partícula
<i>X_{Fmin}</i>	diámetro mínimo de Feret, correspondiente a lo “ancho” de la partícula
<i>X_{Lmax}</i>	longitud del eje mayor de la elipse de inercia de Legendre
<i>X_{Lmin}</i>	longitud del eje menor de la elipse de inercia de Legendre
<i>x_p</i>	diámetro equivalente en perímetro de una partícula $x_p = \frac{P}{\pi}$

Descriptores y símbolos de tamaño – Categoría 2

<i>A</i>	área de la partícula
<i>A_c</i>	área de la envolvente convexa que limita la partícula
<i>L²</i>	área calculada como el producto de dos longitudes NOTA: No se incluye el diámetro equivalente en volumen ni el diámetro equivalente en superficie, ya que son descriptores tridimensionales.

Descriptores y símbolos de forma – Categoría 1

<i>AR</i>	relación de aspecto
<i>ER</i>	relación de elípticidad

Descriptores y símbolos de forma – Categoría 2

<i>extensión</i>	extensión
<i>C</i>	circularidad
<i>compacidad</i>	compacidad
<i>convexidad</i>	convexidad
<i>FF</i>	factor de forma
<i>solidez</i>	solidez
<i>redondez</i>	redondez

3.4.1 mensurando
(*measurand*)

magnitud que se desea medir

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.3]

3.4.2 descriptor derivado de una imagen
(*image descriptor*)

descriptor obtenido de una imagen

[Adoptada de ISO/IEC 15938-13:2015, definición 2.1]

3.4.3 diámetro de Feret
(*Feret diameter*)

distancia entre dos tangentes paralelas en lados opuestos de la imagen de una partícula

[Adoptada de ISO 13322-1:2014, definición 3.1.5]

3.4.4 diámetro máximo de Feret

longitud máxima de un objeto, independientemente de su orientación

[Adoptada de ISO ISO/TR 945-2:2011, definición 2.1]

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Otra definición de máximo diámetro de Feret es: distancia máxima entre dos tangentes paralelas en lados opuestos de la imagen de una partícula.

3.4.5 diámetro mínimo de Feret

Feret_{min}

longitud mínima de un objeto, independientemente de su orientación

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Otra definición de mínimo diámetro de Feret es: distancia mínima entre dos tangentes paralelas en lados opuestos de la imagen de una partícula.

3.4.6 perímetro

longitud total del contorno de un objeto

[Adoptada de ISO ISO/TR 945-2:2011, definición 2.3]

3.4.7 diámetro equivalente en área, diámetro del círculo equivalente

D_{eA}, DEA

(*area equivalent diameter*)

diámetro de un círculo con un área A igual al área de la proyección de la imagen de la partícula

[Adoptada de ISO 13322-1:2014, definición 3.1.1]

$$D_{eA} = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}$$

3.4.8 diámetro equivalente en perímetro

D_{eP}

(*perimeter equivalent diameter*)

diámetro de un círculo con un perímetro igual al perímetro de la proyección de la imagen de la partícula

$$D_{eP} = \frac{P}{\pi}$$

3.4.9 casco convexo

(*convex hull*)

conjunto convexo mínimo que contiene un objeto geométrico dado

[Adoptada de ISO 19123:2005, definición 4.1.2]

3.4.10 relación de aspecto

(*aspect ratio*)

cociente del diámetro mínimo de Feret entre el diámetro máximo de Feret

$$\text{razón de aspecto} = \frac{X_{F\text{mín}}}{X_{F\text{máx}}}$$

[Adoptada de ISO 26824:2013, definición 4.5]

3.4.11 relación elíptica

(*ellipse ratio*)

cociente de las longitudes de los ejes de la elipse de inercia de Legendre

[Adoptada de ISO 26824:2013, definición 4.4]

3.4.12 compacidad

(*compactness*)

grado en el que el área proyectada A de la partícula es similar a un círculo, considerando la forma completa de la partícula con relación al diámetro máximo de Feret

[Adoptada de ISO 26824:2013, definición 4.9]

$$\text{compacidad} = \frac{\sqrt{\frac{4A}{\pi}}}{X_{F\text{máx}}}$$

3.4.13 convexidad
(*convexity*)

cociente del perímetro del casco convexo de la envoltura que limita la partícula entre su perímetro

$$\text{convexidad} = \frac{P_c}{P}$$

3.4.14 circularidad

factor de forma
(*circularity, form factor*)

grado en el cual el área proyectada de la partícula es similar a un círculo, en relación a su perímetro

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

[Adoptada de ISO 26824:2013, definición 4.12]

3.4.15 redondez

(*roundness*)

raíz cuadrada de la compacidad

[Adoptada de ISO 9276-6: 2008]

3.4.16 solidez

(*solidity*)

cociente del área proyectada A entre el área del casco convexo A_c

[Adoptada de ISO 26824:2013, definición 4.13]

$$\text{solidez} = \frac{A}{A_c}$$

3.5 Términos esenciales: metrología

3.5.1 condición de repetibilidad de una medición

condición de repetibilidad
(*repeatability condition of measurement*)

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo

NOTA 1: Una condición de medición es una condición de repetibilidad únicamente respecto a un conjunto dado de condiciones de repetibilidad.

NOTA 2: En química, el término “condición de precisión intra-serie” se utiliza algunas veces para referirse a este concepto.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.20]

3.5.2 condición de precisión intermedia de una medición

condición de precisión intermedia

(intermediate precision condition of measurement)

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medición, el mismo lugar y mediciones repetidas del mismo objeto u objetos similares durante un periodo amplio de tiempo, pero que puede incluir otras condiciones que involucren variaciones

NOTA 1: Las variaciones pueden comprender nuevas calibraciones, patrones, operadores y sistemas de medida.

NOTA 2: En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que involucren variaciones y las que no.

NOTA 3: En química, el término “condición de precisión inter-serie” se utiliza algunas veces para referirse a este concepto.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.22]

3.5.3 condición de reproducibilidad de una medición

condición de reproducibilidad

(reproducibility condition of measurement)

condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares

NOTA 1: Los diferentes sistemas de medición pueden utilizar diferentes procedimientos de medida.

NOTA 2: En la práctica, conviene que toda especificación relativa a las condiciones incluya las condiciones que varían y las que no.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.24]

3.5.4 exactitud de medida

exactitud

(measurement accuracy)

proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando

NOTA 1: El concepto “exactitud de medida” no es una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida.

NOTA 2: El término “exactitud de medida” no debe utilizarse en lugar de “veracidad de medida”, como tampoco el término “precisión de medida” debe utilizarse en lugar de “exactitud de medida”, ya que esta última incluye ambos conceptos.

NOTA 3: La exactitud de medida se interpreta a veces como la proximidad entre los valores medidos atribuidos al mensurando.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.13]

3.5.5 precisión de medida

precisión
(*precision*)

proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas

NOTA 1: Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas.

NOTA 2: Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad (véase la norma ISO 5725-3:1994).

NOTA 3: La precisión se utiliza para definir la repetibilidad de medida, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

NOTA 4: Con frecuencia, “precisión de medida” se utiliza, erróneamente, en lugar de “exactitud de medida”.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.15]

3.5.6 incertidumbre de medida

incertidumbre
(*measurement uncertainty*)

parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los **valores** atribuidos a un **mensurando**, a partir de la información que se utiliza

NOTA 1: La incertidumbre de medida incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones, así como la incertidumbre debida a la definición. Algunas veces no se corrigen los efectos sistemáticos estimados y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre.

NOTA 2: El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica, en cuyo caso se denomina incertidumbre típica de medida (o un múltiplo de ella), o una semiapertura con una probabilidad de cobertura determinada.

NOTA 3: En general, la incertidumbre de medida incluye numerosas componentes. Algunas pueden calcularse mediante una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida, a partir de la distribución estadística de los valores que proceden de las series de mediciones y pueden caracterizarse por desviaciones típicas. Las otras componentes, que pueden calcularse mediante una evaluación tipo B de la incertidumbre de medida, pueden caracterizarse también por desviaciones típicas, evaluadas a partir de funciones de densidad de probabilidad basadas en la experiencia u otra información.

NOTA 4: En general, para una información dada, se sobrentiende que la incertidumbre de medida está asociada a un valor determinado atribuido al mensurando. Por tanto, una modificación de este valor supone una modificación de la incertidumbre asociada.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.15]

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: En esta Norma Mexicana se ha agregado esta definición por considerarse necesaria para la completa comprensión del documento.

3.5.7 incertidumbre típica combinada de medida

incertidumbre típica combinada

incertidumbre estándar combinada

(*combined standard measurement uncertainty*)

incertidumbre típica obtenida a partir de las incertidumbres típicas individuales asociadas a las magnitudes de entrada de un modelo de medición

NOTA: Cuando existan correlaciones entre las magnitudes de entrada en un modelo de medición, en el cálculo de la incertidumbre estándar combinada es necesario también considerar las covarianzas; véase también la Guía ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.4.
[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.31]

3.5.8 incertidumbre expandida de medida

incertidumbre expandida

(*expanded measurement uncertainty*)

producto de una incertidumbre típica combinada y un factor mayor que uno

NOTA 1: El factor depende del tipo de distribución de probabilidad de la magnitud de salida en un modelo de medición y de la probabilidad de cobertura elegida.

NOTA 2: El factor que interviene en esta definición es un factor de cobertura.

NOTA 3: La incertidumbre expandida se denomina “incertidumbre global” en el párrafo 5 de la Recomendación INC-1 (1980) (véase la GUM) y simplemente “incertidumbre” en los documentos IEC.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.35]

3.5.9 evaluación tipo A de la incertidumbre de medida

evaluación tipo A

(*Type A evaluation of measurement uncertainty*)

evaluación de una componente de la incertidumbre de medida mediante un análisis estadístico de los valores medidos obtenidos bajo condiciones de medida definidas

NOTA 1: Para varios tipos de condiciones de medida, véase condición de repetibilidad, condición de precisión intermedia y condición de reproducibilidad.

NOTA 2: Para más información sobre análisis estadístico, véase por ejemplo la Guía ISO/IEC 98-3.

NOTA 3: Véanse también los documentos normativos ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.2; ISO 5725, ISO 13528; ISO/TS 21748 e ISO 21749.

[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.28]

3.5.10 evaluación tipo B de la incertidumbre de medida

evaluación tipo B

(*Type B evaluation of measurement uncertainty*)

evaluación de una componente de la incertidumbre de medida de manera distinta a una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida

EJEMPLOS: Evaluación basada en informaciones:

- asociadas a valores publicados y reconocidos;

- asociadas al valor de un material de referencia certificado;
- obtenidas a partir de un certificado de calibración;
- relativas a la deriva;
- obtenidas a partir de la clase de exactitud de un instrumento de medida verificado;
- obtenidas a partir de los límites procedentes de la experiencia personal.

NOTA: Véase también la Guía ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.3.
[Adoptada de NMX-Z-055, definición 2.29]

3.5.11 material de referencia

MR

(reference material)

material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, el cual ha sido establecido como apto para el uso previsto en un proceso de medición

NOTA 1: “Material de referencia” es un término genérico.

NOTA 2: Las propiedades pueden ser cuantitativas o cualitativas, por ejemplo, la identidad de sustancias o especies.

NOTA 3: Los usos pueden incluir la calibración de un sistema de medición, la evaluación de un procedimiento de medición, la asignación de valores a otros materiales y el control de la calidad.

NOTA 4: La norma NMX-Z055-IMNC-2009 (VIM) tiene una definición análoga, pero restringe el término “medición” para la aplicación a valores cuantitativos. Sin embargo la Nota 3 de NMX-Z055-IMNC-2009 incluye específicamente propiedades cualitativas denominadas “atributos”.

[Adoptada de NMX-EC-17034-IMNC-2018, definición 3.3]

3.5.12 material de referencia certificado

MRC

(certified reference material)

material de referencia caracterizado mediante un procedimiento metrológico válido para una o más propiedades especificadas, acompañado por un certificado de material de referencia que proporciona los valores de las propiedades especificadas, sus incertidumbre asociadas y una declaración de la trazabilidad metrológica

NOTA 1: El concepto de valor incluye una propiedad nominal o un atributo cualitativo tal como identidad o secuencia. Las incertidumbres para tales atributos puede expresarse como probabilidades o niveles de confianza.

NOTA 2: Algunos procedimientos metrológicamente válidos para la producción y certificación de materiales de referencia certificados pueden encontrarse en la Guía ISO 35, entre otras.

NOTA 3: La Guía ISO 31 proporciona orientación sobre el contenido de los certificados de materiales de referencia.

NOTA 4: La norma NMX-Z-055-2009 contiene una definición análoga.

[Adaptada de NMX-EC-17034-IMNC-2018, definición 3.2]

3.6 Términos esenciales: Microscopía por transmisión de electrones

3.6.1 microscopía por transmisión de electrones, MTE, TEM (*transmission electron microscopy*)

método que produce imágenes amplificadas o patrones de difracción de electrones de la muestra mediante un haz de electrones el cual pasa a través de la muestra e interactúa con ésta

[Adoptada de PROY-NMX-R-80004-6-SCFI-2018, definición 3.5.6]

3.6.2 microscopía por transmisión y barrido con electrones, MTBE, STEM (*scanning and transmission electron microscopy*)

método que produce imágenes amplificadas o patrones de difracción de electrones de la muestra mediante un haz de electrones finamente enfocado que barre la superficie y que pasa a través de la muestra e interactúa con ésta

NOTA 1: Típicamente usa un haz de electrones con un diámetro menor a 1 nm.

NOTA 2: Proporciona imágenes de alta resolución de la microestructura interna y de la superficie de una muestra delgada o de partículas pequeñas. También ofrece la posibilidad de caracterizar estructural y químicamente dominios en el orden de micrómetros y submicrómetros, por medio de la evaluación de espectros de rayos X y de patrones de difracción de electrones.

[Adoptada de PROY-NMX-R-80004-6-SCFI-2018, definición 3.5.7]

3.6.3 tensión eléctrica de aceleración tensión de aceleración (*accelerating voltage*)

diferencia de potencial aplicada entre el filamento y el ánodo a fin de acelerar los electrones emitidos por una fuente

[Adoptada de ISO 22309, definición 3.3]

3.6.4 campo claro en TEM (*bright-field TEM*)

técnica de TEM para iluminar y obtener imágenes con electrones en la cual el haz directo de electrones pasa a través de la muestra y la imagen se forma únicamente con la onda transmitida, al seleccionar la onda utilizando una apertura del objetivo en el plano focal posterior

[Adoptada de ISO 10797:2012]

NOTA 1: Generalmente, las porciones de la muestra más gruesas o con números atómicos (Z) altos parecen más oscuros contra un fondo claro. En este modo, el contraste, considerado clásicamente, es debido directamente a la oclusión y absorción de electrones por la muestra. Las regiones más gruesas de la muestra, o las regiones con número atómico alto aparecen oscuras, en tanto que las regiones sin muestra en la trayectoria del haz aparecen claras, lo que da lugar a la denominación “campo claro”.

NOTA 2: Esto será incluido en un vocabulario para microscopía analítica con electrones, en preparación por el ISO/TC 202/SC 1.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Para este documento, el término “background” como elemento de una micrografía, se traduce como “fondo”.

3.6.5 campo oscuro en TEM

(dark-field TEM)

técnica de TEM para iluminar y obtener imágenes con electrones en la cual el haz de electrones pasa a través de la muestra y la imagen se forma únicamente con la onda difractada, al seleccionar la onda utilizando una apertura del objetivo en el plano focal posterior

[Adoptada de ISO 10797:2012]

NOTA 1: Las partes cristalinas de la muestra dispersan los electrones del haz directo a posiciones discretas en el plano focal posterior. Colocando las aperturas en el plano focal posterior, es decir la apertura del objetivo, pueden seleccionarse las porciones de las reflexiones que se deseen, y de esta manera sólo se obtendrá la imagen de las partes de la muestra que dispersan los electrones a las reflexiones seleccionadas. Si las reflexiones seleccionadas no incluyen el haz no disperso, la imagen aparecerá oscura siempre que la muestra presente no disperse a los picos elegidos, lo que da lugar a la denominación “campo oscuro”.

NOTA 2: Los TEM modernos están usualmente equipados con portamuestras que permiten inclinar la muestra para obtener condiciones de difracción específicas. La onda causante de la dispersión y la reflexión en una red cristalina (por ejemplo en la difracción de Bragg) formarán una imagen en campo oscuro seleccionando la onda difractada a través de las aperturas del objetivo colocadas en el plano focal posterior de la lente objetiva.

NOTA 3: La obtención de imágenes en campo oscuro anular a ángulos grandes (*HAADF*) es sumamente sensible a las variaciones del número atómico de los átomos en la muestra y produce las llamadas imágenes por contraste Z , las cuales contienen información sobre la presencia de metales en nanotubos y residuos de catalizadores, aun cuando estas pequeñas partículas estén inmersas en carbón amorfo o en el soporte catalítico y no puedan visualizarse en el modo de campo claro.

NOTA 4: Esta definición será incluida en un vocabulario para microscopía analítica con electrones, en preparación por el ISO/TC 202/SC 1.

4 Necesidades de procedimientos de medida mediante TEM por las partes interesadas

Este documento aborda las siguientes necesidades de los usuarios de las distribuciones de tamaño y forma:

- deberían medirse materiales reales;
- la captura, medición y análisis de los datos deberían realizarse por medios automáticos en tanto sea práctico;
- los flujos de trabajo deberían facilitar las decisiones respecto a la captura de las imágenes, las medidas de las partículas y el análisis de los datos;
- debería considerarse:
 - la identificación de partículas y artefactos en contacto,
 - la selección de los descriptores de tamaño y forma con alta repetibilidad y reproducibilidad,
 - la estimación de las incertidumbres de medida de los parámetros de las distribuciones, es decir de la media y la dispersión,
 - la diferenciación entre muestras mediante los descriptores de tamaño y forma, y
 - los efectos del uso de herramientas de visualización de datos en el valor de la incertidumbre de medida.

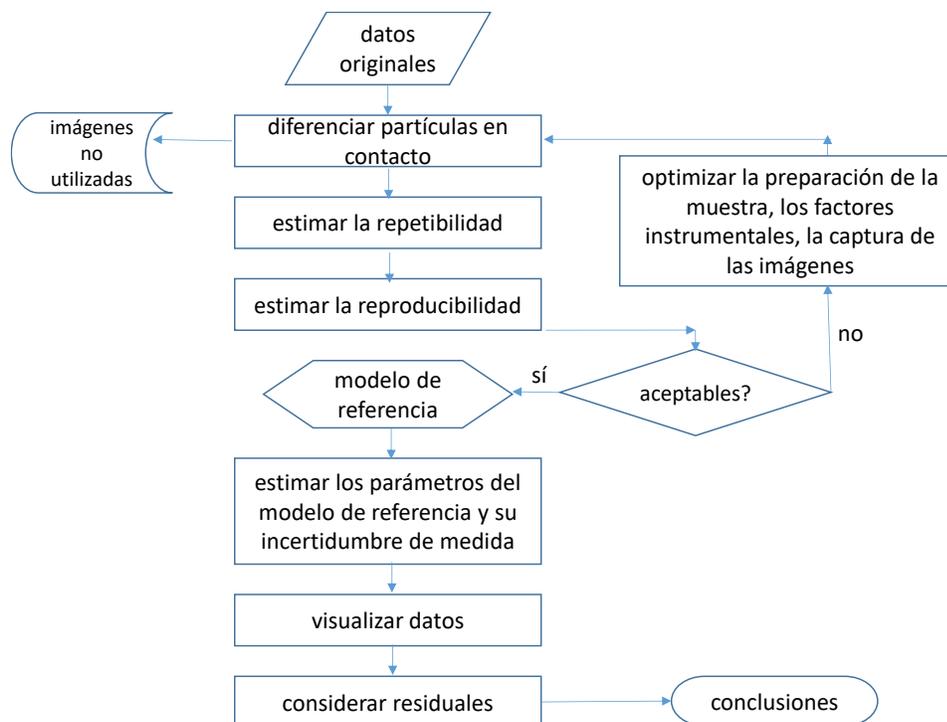


Figura 2. Diagrama de flujo para la medición de distribuciones de tamaño y forma por TEM.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Las diferencias de esta figura respecto a la original se decidieron para mejorar su claridad.

La Figura 2 ilustra el diagrama de flujo para la determinación de distribuciones de tamaño y forma que aborden las necesidades de los usuarios. Es importante identificar aquellas partículas que no son de interés para la investigación, como artefactos. Puede ser necesario o preferible descartar las partículas en contacto para efectos del análisis. Deberían cuantificarse la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad de los datos, dependiendo de la aplicación. El ajuste de las distribuciones a los datos ofrece valores para las medias y las dispersiones de las distribuciones, para los cuales puede estimarse sus incertidumbres de medida. En algunos casos, los resultados numéricos individuales de la media, dispersión e incertidumbre de medida no son suficientes para distinguir entre modelos o entre datos; la visualización de los datos y sus correlaciones pueden ofrecer información adicional acerca de la muestra bajo prueba.

5 Preparación de la muestra

Las etapas del procedimiento –preparación de la muestra, acondicionamiento del instrumento y calibración, y la captura de la imagen–, son muy independientes. Todas contribuyen para generar un grupo de datos de alta calidad de los descriptores de tamaño y forma. Las herramientas estadísticas tales como el análisis de varianza, los modelos de ajuste de distribuciones a datos y el análisis con dos variables, pueden ayudar al investigador a ajustar el procedimiento completo para obtener la exactitud o la incertidumbre de medida necesaria para una muestra específica.

Para obtener una descripción de alta calidad de la distribución del tamaño de partícula, a menudo se necesita tomar y analizar las imágenes de un gran número de nanopartículas. Cuando se usa software de análisis de imágenes el tiempo de análisis puede reducirse y puede mejorarse la calidad de los datos. Cuando se desarrollan procedimientos para muestras desconocidas, puede ser útil seguir todo el proceso para determinar cuáles de los factores son críticos para la muestra en cuestión. El análisis se facilitará cuando se utilice el software de análisis de imágenes. El software comercial y el abierto están disponibles. Las imágenes deben ser de calidad suficiente tal que las partículas individuales puedan resolverse y medir sus dimensiones. Un objetivo importante de la preparación de la muestra es generar distribuciones uniformes de partículas por medio del montaje en sustratos.

5.1 Recomendaciones generales

Normalmente las muestras se suministran en forma de polvos o suspensiones. Los polvos regularmente se dispersan en líquidos antes de depositarlos en los sustratos para la evaluación por TEM. Las suspensiones necesitan normalmente diluirse para obtener imágenes de partículas separadas. Los objetivos clave de la preparación de muestra son: usar una muestra representativa del polvo o el líquido, minimizar la aglomeración en la dispersión usada para el montaje de la muestra, minimizar las asociaciones partícula-partícula en el soporte, distribuir la uniformidad de la muestra a través del soporte [ISO 13322-1], y seleccionar un soporte para mejorar el contraste entre la partícula y el fondo.

5.2 Representatividad de la muestra

Durante los procesos de manufactura de nanomateriales artificiales, las nanopartículas pueden encontrarse en varios estados coloidales. Por ejemplo, los procesos de depósito químico en fase vapor o físico en fase vapor pueden generar “semillas” líquidas las cuales se convierten en aerosoles de nanopartículas líquidas. Como las nanopartículas líquidas se enfrían rápidamente durante el proceso de manufactura, las nanopartículas se solidifican. Las partículas líquidas pueden fusionarse en sus superficies antes de la solidificación conduciendo a productos agregados que tienen dimensiones más grandes que un micrómetro pero provienen de muchas partículas. Ya que las partículas primarias originales no son normalmente reconocibles en el agregado, se utiliza el término de partícula constitutiva para describir las partículas que pueden distinguirse dentro de un agregado.

Muestras en polvo.

Las muestras en polvo necesitan tomarse con cuidado ya que el material puede redistribuirse por las vibraciones y fuerzas durante su transporte. Las muestras también necesitan manejarse con cuidado, particularmente si éstas son agregados y pueden fracturarse mecánicamente. Los documentos [ISO 14887] e [ISO 14488] proporcionan una guía sobre como tomar y manejar muestras en polvo. La mayoría de los polvos y nanopartículas se cargarán negativamente en la fase gaseosa, así que la carga de muestras secas en la superficie del sustrato, la cual también está cargada negativamente, resulta muchas veces en grandes aglomerados cuyas imágenes son difíciles de obtener. Las muestras de polvo son preparadas normalmente dispersándolas en una fase líquida, la cual es entonces depositada en el sustrato de medición o rejilla para obtener la imagen por TEM.

Dispersiones de nanopartículas en líquidos.

En otros sistemas de manufactura, los precursores de nanopartículas son dispersados primero a dimensión coloidal en una fase líquida seguida de una conversión a sol líquido. Las dispersiones coloidales estables en la fase líquida comúnmente necesitan métodos de estabilización electrostática o estérica para prevenir la aglomeración. Las dispersiones concentradas de nanopartículas deben diluirse para reducir el contacto entre nanopartículas en el sustrato o en la rejilla de medición. La estabilidad de las dispersiones coloidales se afecta si éstas permanecen como partículas separadas o aglomeradas, agregadas o floculadas. La estabilidad coloidal depende de la química de la superficie de la partícula, el recubrimiento o los aductos en las partículas, la química del disolvente, los ligandos orgánicos e inorgánicos en la fase fluida.

5.3 Disminución de la aglomeración de las partículas en la dispersión de la muestra

Las fuerzas que afectan la estabilidad de los sistemas coloidales incluyen: repulsión del volumen excluido, interacción electrostática, fuerzas de van der Waals, fuerzas entrópicas e interacciones estéricas. La repulsión mutua de cargas eléctricas similares en los coloides de nanopartículas conduce a la estabilización electrostática. Las dobles capas eléctricas pueden formarse en la interface nanopartícula/líquido. Debido a su tamaño pequeño, las nanopartículas pueden tener áreas superficiales por volumen (o masa) muy grandes tal que, las fuerzas repulsivas de la superficie se vuelvan fuerzas de

flotación que pueden conducir a la sedimentación de las partículas. La estabilización estérica de coloides ocurre cuando los recubrimientos, tales como polímeros u oligómeros, se unen a la superficie de las nanopartículas. Estos recubrimientos previenen que las nanopartículas se aproximen lo suficientemente cerca como para que las fuerzas atractivas puedan volverse efectivas y evitando con ello su aglomeración.

Muchos productos comerciales con nanopartículas son diseñados con recubrimientos en la superficie o la tienen funcionalizada para controlar su dispersión en un medio específico. La desestabilización de los coloides de nanopartículas en dispersiones líquidas puede ocurrir por diversos mecanismos. Los métodos comunes para controlar las fuerzas interactivas entre las partículas son la selección del líquido y el agente de dispersión [ISO 14887], [Boyd, 2011]. La selección del líquido de dispersión se prefiere por lo general, si el líquido elegido reduce o previene la aglomeración de las partículas, como el agente de dispersión que cubre las nanopartículas. Dependiendo de la relación de tamaño entre la nanopartícula y el agente de dispersión, el agente puede afectar las imágenes de la superficie y de las secciones transversales de las partículas. Además, los auxiliares de dispersión pueden conducir a la desorción de las nanopartículas o pueden inducir a su aglomeración con los cambios de temperatura y de la composición de la fase líquida; estos deben elegirse con cuidado.

5.4 Selección del soporte del montaje

Existen varios métodos para depositar las nanopartículas sobre sustratos de medición [ISO 13332-1], [Boyd, 2011]. Un soporte ideal tiene la mayoría de las siguientes características: plano sobre el campo visual seleccionado, intensidad baja y uniforme del fondo (campo claro) en todo el campo visual, y buen contraste entre las partículas y el fondo. Los diferentes tipos de muestras necesitan por lo general diferentes estrategias de preparación del espécimen, es decir, otras normas aplicadas normalmente se basan en el proceso gota-sobre-la-rejilla (*grid-on-drop*) y centrifugación-sobre-la-rejilla. La composición de las partículas, la química de la superficie de las partículas, el disolvente de dispersión, las condiciones ácidas o básicas, las modificaciones del soporte para el montaje y otros factores, contribuyen a la calidad del soporte y de la técnica de montaje. Por lo tanto, la preparación del espécimen, incluyendo todos los consumibles y sustancias químicas, debe describirse con detalle en el reporte de análisis.

6 Factores instrumentales

6.1 Configuración del instrumento

La sección 5.3.2 de [ISO 13322-1] presenta una guía sobre las condiciones de operación para los microscopios de electrones utilizados para la toma de imágenes del tamaño de partícula. Estas incluyen:

- Modo de contraste de la imagen: utilizado para ajustar el nivel de la señal del pico esperado
- Tensión de aceleración: se establece de acuerdo al material a medir.

- Posición del espécimen: Debería seleccionarse la distancia de trabajo de la muestra que especifique el fabricante del microscopio de electrones para imágenes de alta resolución. La muestra debería montarse horizontalmente sobre el portamuestras con la inclinación de la platina fija en cero
- Enfoque dinámico y corrección de inclinación: Estos controles deberían apagarse
- Selección de la amplificación de operación en referencia al Anexo B, ISO 13322-1. La amplificación total es el producto de la amplificación del microscopio de electrones y la transferencia de amplificación del analizador de imagen.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: En este documento se utiliza el término “amplificación” como traducción de “magnification”, y se entiende como el número aproximado de veces que se incrementa el tamaño original de una imagen. Se denota con una “X” seguida del valor de la amplificación, en ocasiones seguido de la palabra “aumentos”, por ejemplo “X50 000”, “X50 000 aumentos” o “50 000 aumentos”.

- Es preferible que todas las imágenes contengan una longitud de referencia interna
- La alineación del instrumento debería realizarse de acuerdo a los procedimientos del fabricante

Los parámetros del TEM deben seleccionarse [Boyd, 2011] para proporcionar imágenes de alta calidad con buen contraste entre el fondo y la partícula. Para contribuir al contraste de la imagen por TEM, las nanopartículas deben dispersar electrones, los cuales dependen de la composición de la muestra y la orientación de la fase cristalina.

6.2 Calibración

La norma ISO 13322-1:2004, sección 6.3.6 [Roebben, 2017], contiene recomendaciones genéricas sobre la calibración y la trazabilidad metrológica.

Patrones de calibración

Ya que los TEM tienen un amplio intervalo de magnificaciones y numerosos modos de operación, la amplificación real bajo cualquier grupo de ajustes del instrumento puede diferir de la amplificación indicada por más del 10 %. Son preferibles las calibraciones del instrumento trazables a la unidad del SI de longitud (el metro) a condiciones ópticas similares a aquellas utilizadas para el análisis. Los patrones utilizados para la calibración, ocasionalmente denominados como “calibrantes”, deben cumplir todos los requisitos de un material de referencia certificado (MRC), es decir, ser homogéneos y estables, soportados con un valor(es) certificado(s), la(s) incertidumbre(s) de medida correspondiente(s) y la información sobre la trazabilidad metrológica, todo documentado en un certificado, etc. Periódicamente debería verificar el instrumento utilizando los patrones de medida a fin de asegurar que su operación se mantenga dentro de las especificaciones del fabricante: tales patrones podrían también utilizarse para validar los procedimientos de medida. Los ejemplos típicos de patrones de medida se muestran en la Tabla 1. Asegúrese que las muestras patrón no se utilicen fuera de su fecha de caducidad.

Tabla 1. Patrones de medida para calibración comunes

Tamaño del patrón	Material
2160 líneas/mm	Retículas; lineales o transversales
2 nm – 100 nm	nanopartículas de poliestireno, oro o sílice
< 2 nm	Cristales de enzima de catalasa

Cuando se selecciona una técnica de calibración para un procedimiento de análisis de tamaño de partícula por TEM, se debería dar preferencia al MRC de partículas sobre el más usual patrón de ancho de línea. Por ejemplo, la calibración contra las dimensiones de una red cristalina puede ser útil solo para la amplificación utilizada para obtener la imagen de las partículas. Estas magnificaciones pueden no ser adecuados para ciertas nanopartículas. La validez de la calibración debe revisarse de manera regular. El control de calidad debe hacerse con patrones de medida, MRC, diferentes a los utilizados para la calibración. Adicionalmente, la verificación, así como el análisis rutinario de tamaño de partícula deberían realizarse bajo condiciones similares (en términos de amplificación, corriente del haz, tensión de aceleración, etc.) a las usadas durante la calibración.

Procedimiento general de calibración

Ya que la calibración depende en gran medida de las condiciones de la óptica de electrones, ésta debería hacerse bajo condiciones óptimas de los lentes utilizando un MRC adecuado. La medición real del tamaño de partícula debería hacerse bajo las mismas condiciones de la calibración con el MRC (por ejemplo, la corriente de los objetivos y los otros parámetros de los lentes, y la altura del espécimen).

Los objetivos deberían calibrarse en el eje eucéntrico. El espécimen debería fijarse en la posición eucéntrica utilizando el movimiento del eje Z. Las funciones “wobbler” (oscilantes) pueden usarse como ayuda para el enfoque. Cuando la muestra se posiciona sobre el eje eucéntrico, la imagen en el primer plano de la imagen tendrá un error mínimo en su longitud (ver Figura 3). La muestra se posiciona en el eje eucéntrico inclinando la muestra alrededor del eje en el primer plano de la imagen, tal que la imagen no se mueva en la pantalla fluorescente. Si la posición de la muestra no está en el eje eucéntrico habrá errores en la medición de sus dimensiones. Tanto la calibración con el MRC como las mediciones de la muestra deberían hacerse con los especímenes posicionados en el eje eucéntrico.

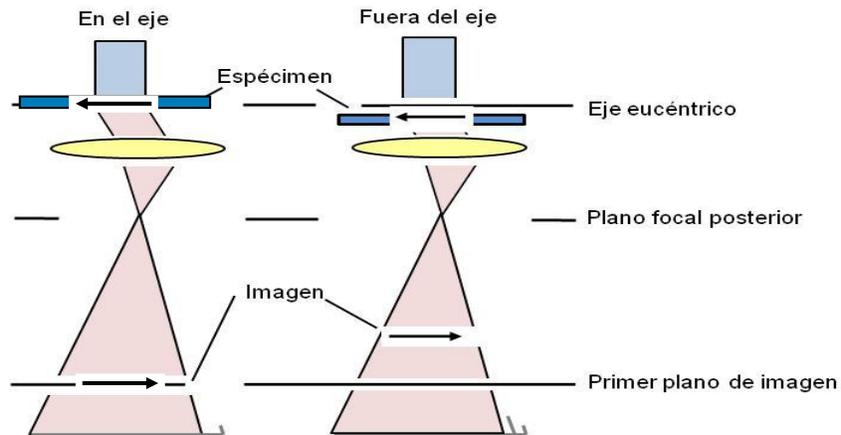


Figura 3 – Ejemplo del error del tamaño de la escala debido a que el plano del espécimen no coincide con el eje eucéntrico. Lado izquierdo: alineación adecuada. Lado derecho: muestra desplazada del eje eucéntrico.

Las lentes de proyección del TEM necesitan conectarse para realizar mediciones exactas en todo el intervalo de tamaño de una distribución de partículas. El intervalo de las lentes depende del modelo de TEM, por ejemplo, baja amplificación $< 100,000$ veces y alta amplificación $\geq 100,000$ veces. En cada intervalo, la linealidad de la escala se alcanzará. Sin embargo, hay discontinuidad entre las líneas de calibración por las diferentes lentes: la calibración de la escala necesita hacerse para cada lente de proyección utilizado para adquirir imágenes. La Figura 4 muestra esas diferencias en las líneas de calibración de la escala para los tres sistemas de lentes de proyección. Los detalles de la calibración de la escala son presentados en el documento [ISO 29301].

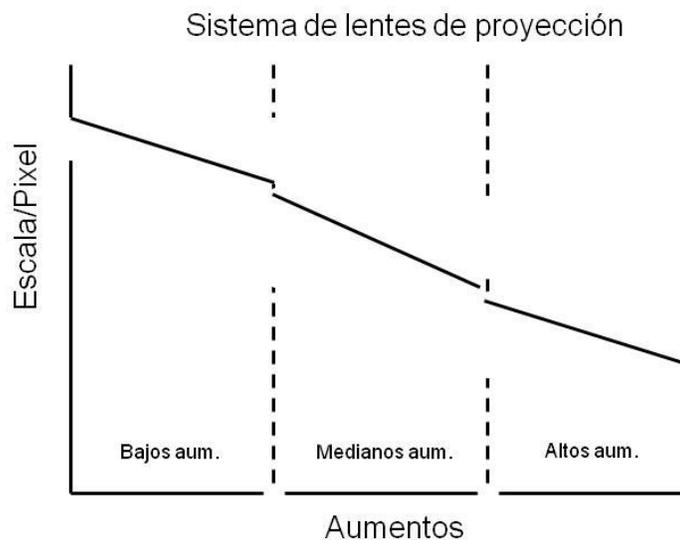


Figura 4 – Escala lineal entre la amplificación y la escala/tamaño de pixel para diferentes sistemas de lentes de proyección. El cambio de las ecuaciones de calibración entre cada sistema de lentes resulta en discontinuidades entre las líneas de diferentes lentes.

6.3 Configuración de las condiciones de operación del TEM para calibración

[FUENTE: procedimiento del documento [ISO 29301].

Aplicar los siguientes pasos para asegurar, en la medida de lo posible, las condiciones de operación del TEM:

- a. El vacío en la columna del TEM debería ser estable y menor de 10^{-4} Pa.
- b. Aplicar alta tensión y permitir que se estabilice.

NOTA: La estabilización para fuentes 100 kV con aceite toma alrededor de 2.5 h; para las fuentes con gas toma alrededor de 45 minutos. Los instrumentos de alta tensión son operados normalmente con tensiones aplicadas continuamente, por lo tanto en general no es necesario un periodo de estabilización.

- c. Utilizar, si es necesario, un dispositivo anti-contaminante.
- d. Seleccionar una región del espécimen de interés (RDI) para la calibración, limpia y libre de daños, y asegurar la altura eucéntrica de la RDI ajustándola si es necesario.
- e. Para minimizar el efecto de la histéresis magnética de los lentes, ajustar la amplificación del TEM al valor objetivo para la calibración conforme a la misma secuencia, por ejemplo, ajustar primero la amplificación más alta que la amplificación objetivo, luego fijar la amplificación objetivo.
- f. Fijar la excitación de los objetivos al valor reproducible deseado; se recomienda la condición estándar.
- g. Ajustar la altura del espécimen para enfocar la imagen aumentada proyectada en la pantalla fluorescente, al monitor de TV o a la pantalla de la computadora personal (PC).
- h. Corregir el astigmatismo a una amplificación ligeramente más alta que el valor objetivo y ajustar el voltaje de aceleración central. Por ejemplo, si la calibración objetivo es 100 kX, fijar la amplificación en el intervalo 150 kX a 200 kX para la alineación.
- i. Encienda el modo de observación del TEM para el modo de difracción-de electrones-del área-seleccionada (DEAS) o la difracción-de electrones-de haz convergente (DEHC) para el modo de imagen. Además, asegúrese de remover la apertura del objetivo.

NOTA: Para el modo DEAS es necesario insertar una apertura de selección de área sobre el área de interés del espécimen con el fin de proyectar un patrón de difracción de electrones del área seleccionada en el dispositivo de observación (pantalla fluorescente/monitor de TV/pantalla de PC).

- j. Ajustar el sistema de lentes condensadores para proporcionar condiciones de iluminación casi paralela.
- k. Alinear un eje de zona de bajo índice del cristal, paralelo al eje óptico; es decir, iluminación denle el eje de zona si el espécimen es un monocristal.

NOTA: Este procedimiento es para la observación de alta resolución del espécimen. Puede omitirse para la medición del tamaño y forma de las nanopartículas .

- l. Insertar el objetivo de apertura, centrarlo alrededor del eje óptico de electrones. Además, cambiar el modo de observación del TEM al modo de imagen.
- m. Regresar la amplificación al valor objetivo de calibración y fijar de nuevo, la corriente de excitación de los objetivos a la condición de excitación estándar.

- n. Aplicar una función de relajación para relajar la histéresis magnética de los objetivos, si el TEM los tiene.
- o. Ajustar la altura del espécimen para enfocar aproximadamente la imagen ampliada.
NOTA: Si el TEM no está equipado con una función de control de altura del espécimen, este procedimiento puede omitirse.
- p. Ajustar el enfoque fino variando la corriente de excitación de los objetivos.
NOTA: Si es necesario, puede utilizarse la función *Image Wobbler* para enfocar las imágenes.
- q. Apagar la corrección de auto-enfoque a la condición óptima de bajo-enfoque conectada con la función de *Image Wobbler*, solo si el TEM está equipado con estas funciones.
- r. Ajustar la condición de iluminación del sistema de lentes condensadores (tamaño del campo y luminosidad) con referencia al intervalo dinámico de cada detector para obtener el contraste de la imagen en todo el intervalo dinámico.
- s. El sistema de lentes condensadores deberán operarse bajo las condiciones que se aproxime a la iluminación paralela. Alternativamente, deberá operarse bajo una condición en donde la convergencia del haz no afecte al enfoque de la imagen. El registro de múltiples imágenes bajo distintos niveles de convergencia del haz pueden ayudar a encontrar esa condición.

7 Captura de las imágenes

7.1 Generalidades

Las distribuciones generadas a partir de imágenes obtenidas por TEM estarán expresadas con base en conteos. Una gran parte del trabajo previo ha estado enfocado en el número de partículas para determinar la media –el promedio- del tamaño de partícula con base en distribuciones normales. Para determinar la media del tamaño como descriptor, la recomendación típica es considerar resultados de entre 200 y 1000 partículas. Teóricamente, en ausencia de errores sistemáticos y de sesgos, la incertidumbre de medida asociada con el valor de la media del tamaño de partícula es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de partículas analizadas. El Anexo de ISO 13322-1:2004 [ISO 13322-1] muestra un análisis de la incertidumbre de la medida para distribuciones log-normal, la cual debería ser el modelo común para describir el tamaño de sistemas de nanopartículas. Existen otras normas y recomendaciones [Boyd, 2011] que también tratan el análisis de incertidumbre de la medida.

Selección de la amplificación.

La amplificación en el TEM debería seleccionarse considerando el intervalo del tamaño de partículas por analizar y el software para capturar las imágenes [ASTM D3849-1]. El campo visual debería ser suficientemente grande para incluir las partículas más grandes y conservar la resolución para distinguir del ruido las partículas más pequeñas.

Considere una partícula cuadrada con lados de 10 nm, esto es un área de 100 nm², para la cual se dispone una resolución de 0.5 nm/píxel. En este caso una diferencia de 1 píxel al medir uno de los lados de la partícula resultaría en un error de 5 %. Una diferencia de 4 píxeles al medir el área resultaría en una diferencia de 1 % en el área.

La norma ASTM para negro de carbono [ASTM D3849-1] ofrece un punto de partida para seleccionar la amplificación. La Tabla 2 muestra la incertidumbre en el diámetro medido, como fracción porcentual, para diferencias de un pixel al reportar la longitud de una partícula. Note que pueden ocurrir errores de medida durante la captura de la imagen o el análisis de las partículas. Puede determinarse la amplificación apropiada para alcanzar la incertidumbre de medida requerida para un descriptor mediante la aplicación de los pasos descritos en esa norma.

Tabla 2. Amplificaciones iniciales recomendadas para diferentes tamaños de nanopartículas [ASTM D3849-1].

Intervalo de tamaño de partícula / nm		Resolución / (nm/pixel)		Incertidumbre de la medida del diámetro en presencia de diferencias de 1 pixel en la imagen / %	
alto	bajo	alto	bajo	alto	bajo
14	21	1.5	2.0	11	10
22	26	2.0	2.5	9	10
27	37	2.5	3.0	9	8
38	49	3.0	4.0	8	8
50	62	4.0	5.0	8	8
63	100	5.0	6.0	8	6
101	199	6.0	12.0	6	6
200	400	12.0	20.0	6	5

Área mínima de partícula

Con la finalidad de reducir las diferencias en las cuentas de pixeles en un círculo a menos del 5 %, el número necesario de pixeles por partícula está entre 100 y 200 [ISO 9276-6 [ISO 9272-6]]. Puede estimarse el número de pixeles por nanómetro para un valor dado de la amplificación, con lo cual puede estimarse el número de pixeles por nanómetro cuadrado. De esta manera es posible determinar si es aceptable la incertidumbre de medida para las partículas más pequeñas y ajustar la amplificación de ser necesario. Si la distribución de tamaño es amplia, puede ser necesario ajustar la resolución a fin de lograr la exactitud suficiente para las partículas pequeñas. En algunos casos puede requerirse tomar imágenes a dos valores de amplificación y generar datos con exactitud suficiente tanto para las partículas pequeñas como para las grandes.

Número de partículas para construir distribuciones de tamaño de partículas

Uno de los principales factores que afectan la incertidumbre de las medidas de distribuciones de tamaño de partículas es el número de partículas cuyas imágenes y

medidas se requieren para alcanzar el nivel de confianza suficiente en los datos de la distribución y en el modelo ajustado a dichos datos. Cuando no se dispone de experiencia previa sobre una muestra en particular, se sugieren 500 partículas como punto de partida para determinar la distribución de tamaño de partícula.

Uniformidad del fondo

Las imágenes deberían tomarse de micrografías cuyo fondo sea uniforme en intensidad, con un buen contraste con las partículas. Puede ser necesario ejecutar el protocolo de captura de imágenes sobre algunas pocas micrografías antes de analizar todas las partículas.

Aplican las siguientes recomendaciones:

- Seleccionar las condiciones de operación que minimicen la deriva.
- Colectar las imágenes a un valor de tensión eléctrica apropiado, por ejemplo 120 kV.
- Establecer la relación entre la resolución de la imagen con el diámetro promedio de las partículas tal que la incertidumbre de medida sea apropiada. Por ejemplo, para partículas con diámetro nominal de 30 nm medidas con resolución de 0.5 nm/pixel, cada pixel contribuye con 1.6 % al diámetro de una partícula de tamaño promedio. Las partículas más pequeñas tendrían serían más sensibles a la incertidumbre de medida.
- Asegurar la reproducibilidad de las condiciones de calibración mediante la normalización de las lentes –a fin de reducir la histéresis- a la amplificación seleccionada para las imágenes.
- Asegurar que la barra utilizada como escala sea visible en cada imagen digital.
- No excluir partículas con formas irregulares ni partículas con vértices afilados.
- Decidir la aceptación o rechazo de partículas en contacto.
- Rechazar las partículas que parezcan cortadas por el marco de la micrografía bajo medición.
- Contar y reportar al menos 500 partículas en micrografías bien espaciadas en la superficie de la rejilla.
- Reportar la información sobre el tamaño de todas las partículas seleccionadas en cada micrografía.

Muchos de las aplicaciones digitales para análisis de imágenes incluyen métodos para separar partículas en contacto, por lo que debería considerarse la posibilidad de cambios en el tamaño y distribuciones de tamaño cuando se apliquen.

Cuando se utilizó un algoritmo de éstos para determinar la distribución de nanoesferas de oro [Rice, 2013], decrecieron el valor medio del diámetro circular equivalente reportado y el ancho de la distribución de tamaño. Por otro lado, la remoción sistemática de todas las partículas en contacto puede conducir a una selección no representativa de las partículas consideradas en el conteo.

Los efectos del tamaño de muestra en la incertidumbre de medida de la media del diámetro de las partículas ha sido bien estudiado [Masuda, 1999], [Masuda, 1970], [Song, 2009], [Yoshida, 2009], [Yoshida, 2012], resultando que la incertidumbre de medida se reduce conforme aumenta el número de partículas considerado. La incertidumbre de medida de los parámetros de la distribución -la media y la desviación estándar de la muestra- también debería disminuir cuando se incrementa el número de partículas. Se

sugiere que el número mínimo de partículas en el análisis de tamaño y distribución de tamaño sea de 500, con base en la experiencia de estudios previos.

Se dispone de dos opciones para el análisis de imágenes: realizar análisis de partículas individuales –por ejemplo delineando las partículas- o mediante el análisis automático de las imágenes. Se prefiere este último, de ser posible. El análisis de partículas individuales se describe en ISO 13322-1 y se utiliza solamente en casos especiales como en agregados nanocristalinos [en el Anexo F de esta norma].

7.2 Procedimiento de medición

El análisis debería ser representativo de la muestra. En general se recomienda analizar cada muestra por triplicado. El análisis estadístico de los datos debería demostrar si la muestra es representativa de la totalidad del conjunto [Bonevich, 2010]. La referencia [ISO 13322-1] ofrece una discusión más detallada. Los registros de las imágenes proyectadas por TEM, incluyendo la composición de las partículas, estructura interna y la morfología de su superficie, pueden afectar la apariencia de las imágenes.

Desarrollo de una muestra de prueba

Una muestra de prueba es una porción tomada directamente de una muestra de laboratorio –la que se recibe directamente del solicitante- o de una submuestra –porción representativa tomada de la muestra del laboratorio y transferida a otro vial sin preparación alguna de la muestra-. La muestra de prueba se somete a un proceso de preparación para generar un espécimen de prueba, esto es la muestra de prueba montada sobre una rejilla para TEM. Los pasos en la preparación de la muestra pueden incluir separaciones, tales como filtrado y centrifugación, dispersiones en líquidos usando energía mecánica como sonicación y remoción de solventes como en el secado. Todos estos pasos pueden afectar la morfología de las partículas en la rejilla para el TEM. Aunque se ha demostrado las técnicas de análisis de datos de esta norma para la incertidumbre de medida de descriptores de tamaño y distribución de tamaño bajo protocolos especificados de preparación de las muestras, tales pasos también pueden utilizarse para el desarrollo de protocolos que minimicen la incertidumbre de las medidas de muestras específicas.

Efectos de la amplificación

Un microscopio de transmisión de electrones apropiadamente alienado y estable debería operarse a una amplificación que permita visualizar muchas partículas en el campo visual y asegure el registro de cada partícula con un gran número de píxeles. Por ejemplo, en un muestra las nanopartículas con diámetro promedio de 50 nm, a una amplificación de 50 000 y registradas por una cámara CCD con píxeles con tamaño de 14 mm, tendrían un diámetro de 180 píxeles. En esta situación, una cámara CCD con 2048 x 2048 píxeles contendría cerca de 120 partículas dentro del campo visual de una sola micrografía [Bonevich, 2010].

Micrografías

Registre un número suficiente de micrografías para obtener un mínimo de 500 imágenes de partículas por muestra, a partir de 2 regiones significativamente separadas

de la muestra como mínimo. Los tiempos de registro de las imágenes deberían ser suficientes para diferenciar el tono de gris de las partículas del tono de ruido del fondo. Esto es, la desviación estándar de los tonos de gris entre partículas y el fondo debería ser de 5 a 1. No obstante, la duración de los tiempos de registro deberían ser suficientemente cortos –entre 1 s y 2 s- a fin de minimizar la contribución por deriva de la platina [Bonevich, 2010]. La deriva que se observa durante la captura de la imagen se debe usualmente al efecto combinado de la deriva de la platina y del haz.

7.3 Revisión de los protocolos para la captura de imágenes

Puede ser útil revisar los protocolos para la captura de imágenes (capítulo 7) y para el análisis de las partículas (capítulo 8) después del filtrado inicial de los datos crudos (sección 9.1). Este filtrado inicial es particularmente útil cuando se analiza una muestra por primera vez en el laboratorio. Los casos de estudio mostrados en los anexos se sometieron a este tipo de filtrado a fin de identificar pasos en el protocolo que redujeran las incertidumbres de medida de los parámetros ajustados y para mejorar la comprensión de las distribuciones de los descriptores que representan la morfología de las partículas.

8 Análisis de partículas

Cuando se requiere una distribución de tamaño de partículas de alta calidad, es necesario un gran número de partículas, cuyo manejo se facilita con un software de análisis de imagen automatizado. Estos softwares se encuentran disponibles tanto en forma comercial como en acceso libre.

8.1 Análisis de partículas individuales

El documento [ISO 13322-1] (en particular las secciones 5.2, 5.3 y 6) ofrecen orientación acerca de procedimientos de conteo, borde de las partículas, partículas cortadas por el marco de la micrografía, partículas en contacto, mediciones, calibración y trazabilidad, y distorsión por el análisis de partículas individuales de forma manual.

8.2 Análisis automatizado de partículas

La mayoría de los datos reportados en los casos de estudio fueron analizados mediante ImageJ, software libre de NIH [Ferreira, 2012], [NIH, 2012]. También se encuentran disponibles otros paquetes de software comercial. Un primer objetivo al medir distribuciones de tamaño de partícula es transformar en la micrografía digital los tonos de grises de la imagen a una imagen binaria que consista de las partículas discretas y el fondo. Los píxeles deben clasificarse discriminando la imagen del fondo y contando el número de píxeles para cada partícula. Estas operaciones de discriminación están sujetos a sesgos del operador y por tanto es preferible realizarlas de manera automática. Los valores obtenidos automáticamente pueden ser erróneos cuando los valores del fondo no son uniformes en la imagen –por ejemplo cuando hay presencia de partículas de polvo, residuos de limpieza inadecuada, y similares-. En estos casos, puede ser

necesario efectuar manualmente la discriminación en las distintas regiones de la imagen [Bonevich, 2010].

Una vez completada la discriminación, pueden identificarse las partículas. Una partícula consistirá de un número importante de píxeles contiguos que satisfagan los criterios de discriminación. Pueden encontrarse algunos píxeles del fondo con valores binarios que excedan los criterios de discriminación; éstos pueden ser aislados o presentarse en números reducidos, y deberían eliminarse del análisis. Para este fin, ImageJ contiene las funciones “*despeckle*”, “*erode*” y “*dilate*”. Usualmente la combinación de estas funciones remueven los artefactos creados por el software. Debería confirmarse la eliminación de dichos artefactos mediante la comparación visual entre la imagen original y la procesada. De manera similar, pueden encontrarse píxeles dentro del conjunto de nanopartículas debajo del límite de discriminación. Estos huecos deberían llenarse mediante el software para llevar a cabo el análisis. Algunos ejemplos específicos acerca del análisis automatizado se presentan en PCC-15 [Vladar, 2011], [NIOSH/DUNE, 2012] y la [Bonevich, 2010] pp. 36-40.

8.3 Ejemplo: procedimiento de análisis automatizado de partículas

Este documento supone que todas las imágenes se han tomado en formato digital. Las etapas del procedimiento para un software específico de fuente abierta (Image J, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) son:

- Crear copias de trabajo de todas las imágenes y micrografías, y preservar las imágenes originales sin modificación.
- Abrir Image J y el archivo de micrografías.
- Establecer la escala de medida mediante la regla patrón u otro instrumento de medida del tamaño del píxel, y regresar a la escala original antes de continuar.
- Limpiar la imagen para remover las reglas patrón y otros elementos que pudieran demeritar el contraste o el análisis de las partículas.
- Verificar y corregir la brillantez y contraste a fin de asegurar que todas las imágenes dan lugar a histogramas centrados y con amplitud suficiente para cubrir por lo menos el 80 % de los tonos de gris.
- Cuando la operación de discriminación resulte en archivos de micrografías con artefactos de un solo píxel o de calidad pobre, por ejemplo partículas burdas o con el fondo variando debido a la falta de uniformidad del haz de iluminación, para los primeros aplique las herramientas *despeckle* y *erode/dilate* para remover esos elementos; en caso de calidad pobre, pueden limpiarse los bordes de las partículas o corregir el fondo mediante la aplicación de los filtros para ello. En todo caso, evaluar la imagen transformada y guardar los cambios.
- Las partículas en contacto no deberían atenderse con el uso de algoritmos automatizados de separación sin antes determinar si las medias y dispersiones de las distribuciones resultantes se alteran fuera de las incertidumbres de medida aceptables. Las partículas en contacto pueden separarse del conjunto de datos crudos aplicando factores de forma o tamaño a los datos crudos.
- Listar los mensurandos deseados, tales como área, descriptores de forma, diámetro de Feret, y ajuste de elipse. La lista de descriptores de tamaño y forma disponible depende del software. Generalmente, es útil elegir más descriptores

de los que pudieran necesitarse, pues los descriptores más frecuentes pueden no corresponder a los reportados convencionalmente para las partículas específicas. Pueden usarse múltiples descriptores de tamaño y forma para identificar problemas en la imagen y medición, tanto como apoyar en la caracterización de la muestra de partículas bajo estudio.

- Analizar las partículas; la configuración específica de ImageJ debería incluir: mostrar sus contornos, desplegar los resultados, incluir huecos y excluir bordes.
- Guardar todos los archivos de imágenes que muestren los contornos de las partículas con sus números secuenciales (nombredearchivo.tif) y la hoja de cálculo (Resultados.xls, con los valores de los descriptores para todas las partículas, los números que identifiquen a las partículas y los números de micrografía).

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Los archivos TIF admiten una profundidad de color de 64 bits, además, a diferencia de los archivos JPG, no acumulan errores cada vez que se abre la imagen.

NOTA: Puede encontrarse orientación adicional basada en los hallazgos de los casos de estudio. Algunos de éstos muestran procedimientos de evaluación de datos intra e interlaboratorio (por ejemplo ANOVA) que pueden utilizarse para afinar protocolos para bajos valores de incertidumbre de las medidas.

9 Análisis de los datos

Existen varias aplicaciones importantes para el análisis estadístico de datos de tamaño de partícula: evaluación de la variación de datos bajo condiciones de repetibilidad, bajo condiciones de precisión intermedia o en diferentes laboratorios; ajuste de modelos a las distribuciones de tamaño; y evaluación de estadísticos para el estudio completo. La Tabla 3 resume los métodos utilizados en este documento. Las incertidumbres de medida se calculan a partir de los coeficientes de variación determinados de los parámetros ajustados de cada conjunto de datos de la comparación entre laboratorios.

Tabla 3 - Métodos de análisis estadístico.

Método estadístico	Estadísticos resultantes
ANOVA	Valores p : para un conjunto particular de datos, no hay diferencia significativa entre el valor medio de un descriptor y el valor del gran promedio del descriptor de todos los conjuntos de datos.
ANOVA por pares	Valores p : para un par de conjuntos de datos, no hay diferencia significativa entre los valores medios del descriptor del par de conjuntos.
Análisis bivariado	Valores p , valores de energía: comparación a pares de los descriptores de distribuciones acumulativas; no hay diferencia significativa entre los descriptores de las distribuciones del par de conjuntos; comparación a pares de distribuciones de forma y tamaño: no hay diferencia significativa entre los descriptores de las distribuciones del par de conjuntos.

Tabla 3 - Métodos de análisis estadístico (continuación)

Ajuste de curvas	Métodos de máxima verosimilitud y de regresión no lineal: media ajustada y dispersión de estimados de los parámetros más sus errores estándar.
Kolmogorov-Smirnov	Valores $D_{n,m}$: diferencias no paramétricas entre distribuciones acumulativas; pares de distribuciones con diferencias, en valor absoluto, mayores al supremo se consideran diferentes.

9.1 Examen preliminar de datos originales: detección de partículas en contacto, artefactos y contaminantes.

Antes de analizar a fondo los conjuntos de datos, puede ser útil efectuar un análisis preliminar. Por ejemplo, deberían removerse las partículas en contacto del conjunto, así como los artefactos, además de identificar y analizar por separado los contaminantes.

El diagrama de flujo para el examen preliminar de datos puede desarrollarse al iniciar proyectos sobre la distribución de tamaño y forma de una partícula. Como ejemplo, la Figura 5 muestra el diagrama de flujo para el caso de estudio mostrado en el Anexo C. Al inicio se consideran los datos crudos generados por ImageJ y el resultado final es el conjunto reducido de datos de aquellos datos de nanobarras con un área mayor de 200 píxeles. Los datos contienen datos de nanobarras y también de nanocubos y otros artefactos. En ese caso de estudio, se consideraron como indeseables las partículas en contacto. Se desarrolló una heurística para identificar las partículas en contacto mediante el rango de valores definido para un descriptor en particular. Las partículas dentro de este rango se extrajeron del conjunto de datos y se descartaron. Se desarrolló una segunda heurística para identificar objetos que no fueran nanobarras, la cual fue aplicada para extraer nanocubos y otros artefactos. El conjunto de datos de nanocubos se retuvo para su análisis posterior. Finalmente, los datos restantes de nanobarras fueron examinados para descartar partículas con áreas menores a 200 píxeles.

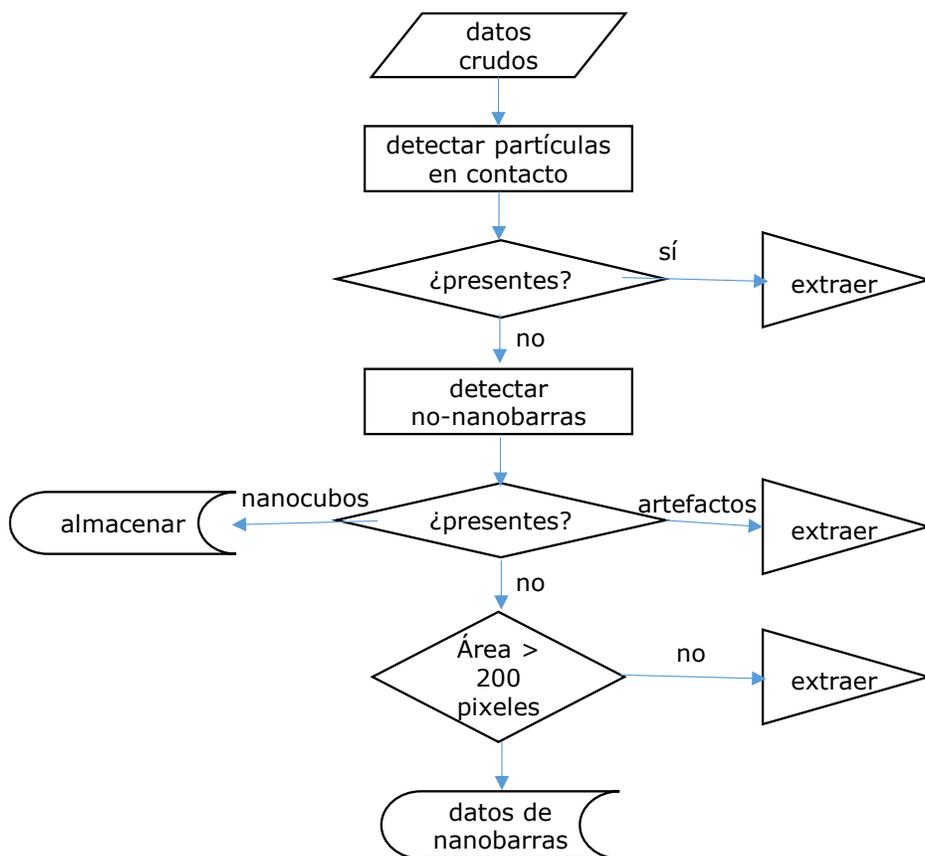


Figura 5 - Ejemplo de diagrama de flujo para el examen preliminar de un conjunto de datos con nanobarras.

Habitualmente las distribuciones utilizadas requieren por lo menos dos parámetros, uno para describir la media y otro para describir la dispersión de los datos. Para cada aplicación, la desviación estándar relativa (s_{rel}) de la media requerida y la desviación estándar de la distribución determinan el número de imágenes de partículas necesario. Los métodos para el ajuste de distribuciones a datos de tamaño de partícula en esta norma (sección 9.2) ofrecen valores de s_{rel} para cada uno de los parámetros (media y dispersión). Bajo la suposición de que la distribución ajustada ofrece una buena descripción de los datos, puede determinarse el número de partículas analizadas sobre la s_{rel} de las muestras, y entonces ajustar el número de partículas para conteo a fin de obtener conjuntos de datos con la exactitud que se requiera.

Descriptores de tamaño y forma

La [ISO 9276-6] ofrece conjuntos de descriptores de datos de tamaño, proporción y mesoforma utilizados comúnmente para definir la morfología de partículas. Las partículas pueden caracterizarse con descriptores de tamaño y forma. A menudo, las poblaciones de partículas tienen rangos de descriptores de tamaño/forma únicos, y que ofrecen una manera para identificar y separar agregados, aglomerados, artefactos y partículas extrañas en conjuntos de datos.

9.2 Evaluación de la calidad de los datos: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

Uno de los objetivos esenciales del análisis ANOVA es identificar partículas, micrografías y conjuntos de datos para su revisión, usualmente mediante inspección visual y los datos ya discriminados. ANOVA puede utilizarse para evaluar la reproducibilidad del laboratorio, la precisión intermedia y la reproducibilidad entre laboratorios. A las resoluciones que típicamente se utilizan, usualmente se encuentran un número relativamente pequeño de nanopartículas, entre 20 y 100, en la micrografía. Para esta cantidad de puntos, pueden obtenerse estimaciones del valor promedio de los descriptores por cada micrografía. No obstante, no es probable esperar estimaciones razonables de los parámetros de la distribución de tamaño a partir de los datos de una sola micrografía. La Tabla 4 resume las hipótesis nulas y la métrica para cada uno de los tipos de evaluación mencionados. El estadístico valor- p se utiliza como métrica para cada uno. Para este documento se utilizó un software libre para el ANOVA, (<http://shiny.as.uky.edu:3838/anova-app/>).

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Las definiciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad se encuentran en la NMX-Z-055-IMNC.

Tabla 4. Evaluación de la calidad de los datos mediante ANOVA.

Evaluación de la calidad de los datos	Hipótesis nula	Métrica
Repetibilidad en el laboratorio – mismo operador, mismo día	¿Las medias de los descriptores de todas las imágenes coinciden con la gran media?	Si $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula.
Precisión intermedia – diferente operador ó diferente día	¿Las medias de todos los conjuntos de datos coinciden con la gran media?	Si $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula.
Reproducibilidad entre laboratorios – diferente operador y diferente día	¿Las medias de todos los conjuntos de datos coinciden con la gran media?	Si $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula.

La Figura 6 muestra el diagrama de flujo para una evaluación de la repetibilidad de un laboratorio. En este caso, la hipótesis nula es que las medias de un descriptor específico para cada imagen sean las mismas que la gran media. Cuando se analizan todas las imágenes, digamos de A_1 hasta A_n , la gran media o media del grupo se determina para el conjunto de datos completo y los descriptores para cada micrografía se comparan con la gran media. Un resultado típico del software es una gráfica de cajas que muestra la gran media, el valor medio del descriptor para cada micrografía, una gráfica de cajas para cada micrografía (habitualmente una caja indica el 75 % de los valores del descriptor; a ± 1.5 desviaciones estándar) y los valores extremos. De ser necesario, los valores extremos pueden verse en las imágenes de la micrografía a fin de asegurar que corresponden a las partículas apropiadas y no a artefactos o a contaminantes.

En general, una partícula y sus datos asociados deberían reportarse y no excluirlas del conjunto de datos, salvo que la imagen de la partícula:

- esté corrompida,
- se determine que corresponde a un artefacto, o
- corresponda a un tipo o clase fuera del alcance del ensayo.

En general, una imagen y sus datos asociados deberían reportarse y no excluirlas del conjunto de datos, salvo que:

- la calibración o la configuración de operación del instrumento sean diferentes a los del patrón.

Una estadística que identifique a una partícula como “extrema” no es suficiente para descartar la partícula. Este análisis puede repetirse para todos los descriptores considerados. La repetibilidad de varios descriptores puede compararse ordenando sus valores- p , o determinando la fracción de micrografías con medias de los descriptores similares a la gran media. Cualquier método puede ayudar a identificar los descriptores del conjunto de datos que sean bien conocidos.

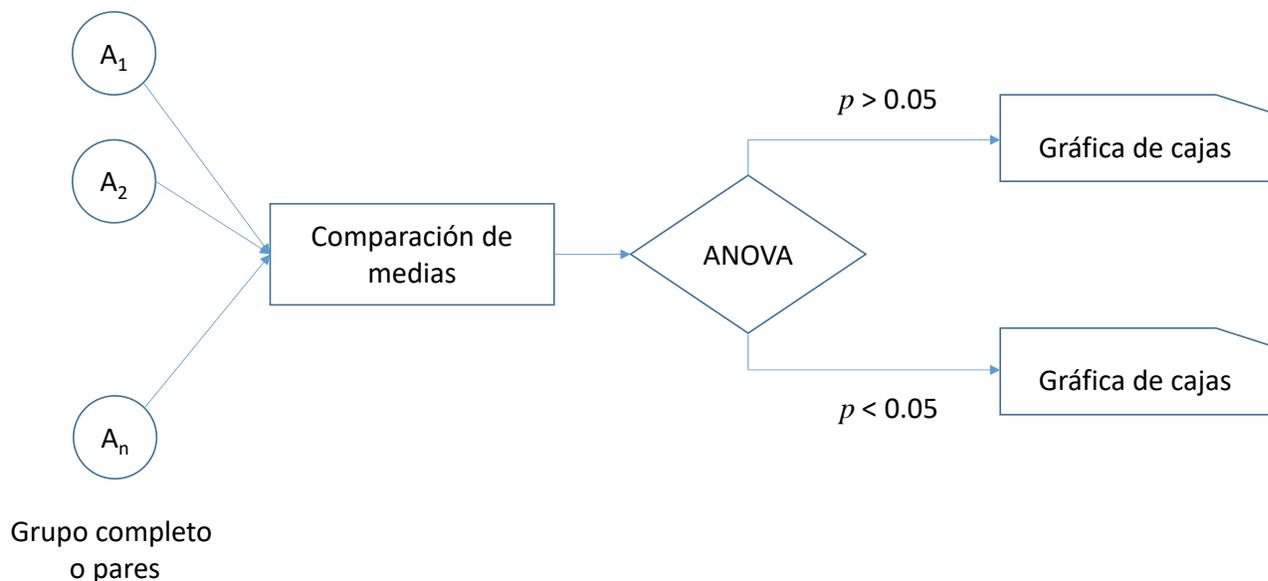


Figura 6. Diagrama de flujo de ANOVA para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad.

El árbol de decisiones en la Figura 5 puede aplicarse a las evaluaciones de la precisión intermedia y de la reproducibilidad. Para esta última, los conjuntos de datos A_i corresponden a los participantes en la comparación entre laboratorios. Adicionalmente, las comparaciones entre pares de conjuntos de datos ofrecen información de la similitud de las medias de dichos conjuntos de datos. A sola prueba estadística por sí sola no aporta razones suficientes para descartar datos.

9.3 Ajuste de datos a distribuciones

Cabe la posibilidad de que no se conozcan los modelos de referencia para describir los datos. Los métodos de regresión no lineal pueden proporcionar estimaciones para los parámetros de distribución de referencia y sus errores estándar. El modelo de referencia preferido para un conjunto de datos específico generalmente tiene estimaciones de parámetros con los errores estándar relativos más bajos.

Los métodos de este documento se pueden usar para seleccionar la mejor distribución de referencia o para identificar descriptores que tienen errores estándar relativamente bajos.

Los descriptores de tamaño informan la dimensión de la partícula, mientras que los descriptores de forma indican la forma de las partículas. Cada descriptor se ajusta a un modelo de referencia con dos parámetros, un parámetro medio que informa un valor de la característica para el descriptor de tamaño / forma y un parámetro de dispersión que informa la dispersión del modelo de distribución ajustado.

En general, tres modelos de referencia se ajustan a los datos acumulados de distribución del tamaño de partícula: normal, log-normal y Weibull. Hay que tener en cuenta que, para cada uno de estos modelos de referencia, el cálculo de la media y los parámetros de dispersión son distintos y diferentes. Por conveniencia, el valor característico del descriptor se denomina media, y la amplitud característica de la distribución se denomina dispersión. Por lo general, se prefiere adaptar modelos de referencia a distribuciones acumulativas. Las distribuciones de probabilidad diferencial pierden información cuando los datos están agrupados, a menudo oscureciendo los detalles cerca de las colas de las distribuciones. En general, los valores de los parámetros de los ajustes de distribución acumulativa tienen errores estándar relativos más bajos, que aquellos de distribuciones diferenciales agrupadas.

Se usarán tres métodos de regresión no lineal [ISO 9276-3] para ajustar los datos a la distribución acumulativa y optimizar los valores de los parámetros ajustados: 1) minimizando la varianza entre los datos y el modelo de referencia, 2) ajustando a cero las desviaciones residuales entre los datos y el modelo de referencia a cero y 3) las transformaciones de los tres modelos de referencia en funciones lineales (regresión cuasi lineal). El software estadístico comercial puede proporcionar el valor R² para el ajuste deseado, la estimación del parámetro por ejemplo (promedio (\bar{x}) y desviación estándar (s) y el error estándar del parámetro estimado ($u_{\bar{x}}$ y u_s). La desviación estándar relativa s_{rel} (definición 3.3.5) es una medida de la calidad del parámetro, siendo ésta mejor entre más pequeños sean sus valores.

El software libre, <http://shiny.as.uky.edu:3838/curve-fitting-app/>, se usó para ajustar las distribuciones a los datos. Este método proporcionó un análisis consistente aproximado para todos los conjuntos de datos. La Figura 6 muestra el diagrama de flujo de ajuste del modelo utilizado para los casos de estudio de este documento (Ver Anexos A-G).

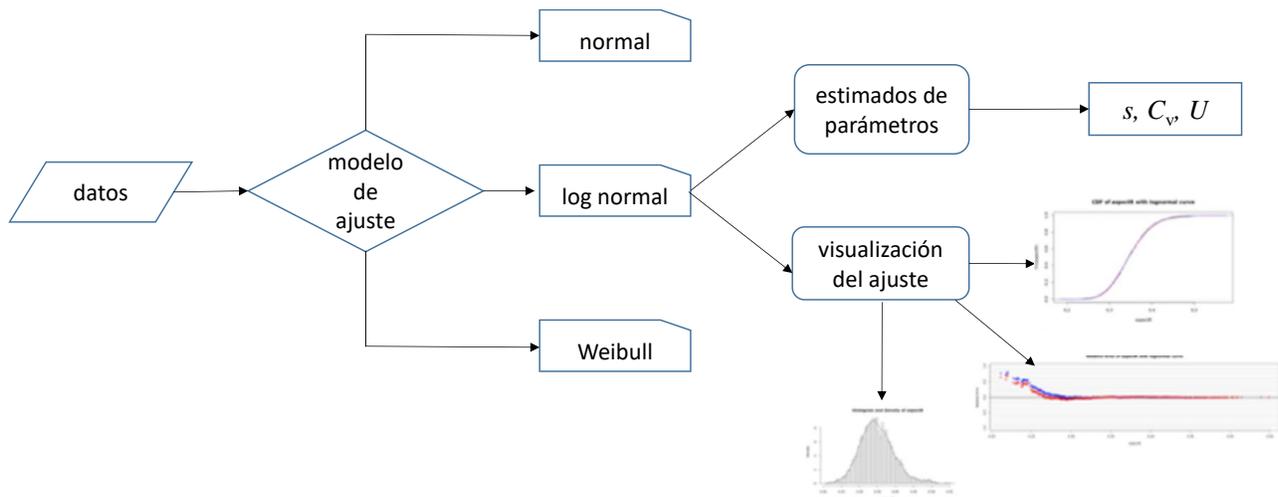


Figura 7. Diagrama de flujo para ajustar los datos medidos a los modelos de distribución de forma y de tamaño de partícula.

El conjunto de datos utilizado para estimar los parámetros de la media y la dispersión puede ser de un solo laboratorio o de un día de prueba, o ensamblarse combinando todos los conjuntos de datos en la carpeta, a lo largo de diferentes días de prueba y/o laboratorios. Utilizando la herramienta *freeware*, el usuario puede seleccionar uno de los tres diferentes modelos de referencia y estimar los mejores parámetros ajustados mediante uno de dos métodos, regresión no lineal o máxima probabilidad. El error estándar relativo de los parámetros de media y dispersión puede calcularse para cada método de estimación y cada modelo. La opción de modelo preferible es aquella en la que el error estándar relativo es significativamente menor para ambos descriptores.

9.4 Estimación de incertidumbre de medida para muestras en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

9.4.1 Gran estadística para parámetros ajustados: tres o más conjuntos de datos.

Las estimaciones de los parámetros ajustados para cada descriptor pueden generarse para cada conjunto de datos mediante el método de la Sección 9.3 asumiendo que los valores de los parámetros ajustados se distribuyen normalmente, se calculan las "grandes estadísticas" para todos los conjuntos de datos: la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada parámetro ajustado de un descriptor. El gran coeficiente de variación para cada parámetro ajustado se debe relacionar con su incertidumbre relativa de medición.

Este enfoque no diferencia entre la homogeneidad del material (muestra a muestra) y la precisión del método (repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad).

9.4.2 Incertidumbre de medida de los parámetros ajustados

Existen diferentes enfoques para la evaluación de la incertidumbre de los resultados de medida [Vladar, 2011], [NIOSH/DUNE, 2012], [ISO 9276-3] y de la precisión y el sesgo de los métodos [Szekely, 2004]. El enfoque de la Guía ISO 98 [GUM] para la incertidumbre

de medida es definir los mensurandos, identificar todas las fuentes relevantes de incertidumbre en la prueba clasificadas como tipo A o B, cuantificar cada fuente significativa de incertidumbre con una probabilidad de distribución, calcular la incertidumbre estándar combinada, y finalmente, estimar la incertidumbre expandida a un nivel de confianza específico. Algunas referencias proporcionan gran detalle sobre la incertidumbre de medida sólo para la medición del tamaño de partícula [Masuda, 1999], [Masuda, 1970], Song, 2009], [Yoshida, 2009], [Yoshida, 2012]. Aquí, se sigue el enfoque conforme a la GUM de Braun y colaboradores según [NMX-CH-5725-1].

Los componentes de incertidumbre tipo A incluyen aquellos que se evalúan mediante métodos estadísticos, tales como pruebas repetidas. Los componentes de incertidumbre de tipo B se evalúan por otros medios, tales como errores de calibración o efectos de variaciones de temperatura. Los componentes del tipo A son: el grado de proximidad de la medición al valor de referencia y la precisión (el grado en el cual diferentes mediciones muestran el mismo resultado). La precisión suele dividirse en dos componentes, la repetibilidad, la variabilidad observada para el mismo operador y el mismo instrumento, y la reproducibilidad, la variabilidad observada para el mismo proceso siendo realizada por diferentes operadores en diferentes instrumentos, como en algunos de los casos de estudio presentados en los Anexos. Cuando un material de referencia está siendo investigado como descriptor certificado, se calcula la verosimilitud (la diferencia entre el valor certificado y el valor promedio del descriptor (sesgo)).

9.4.3 Incertidumbre de medida para un descriptor de tamaño

Para un descriptor de tamaño, la incertidumbre de medida combinada, $u_c(x)$, se basa en la reproducibilidad interlaboratorios u_{ir} , la veracidad, u_t , y la asociada al error de calibración del instrumento, u_{cal} . Las componentes de la incertidumbre u_{ir} y u_t son de tipo A, mientras que u_{cal} es un componente de incertidumbre de tipo B. La incertidumbre de medida combinada es el cuadrado de la suma de los cuadrados de sus componentes individuales:

$$u_c(x) = \sqrt{u_{ir}^2 + u_t^2 + u_{cal}^2}$$

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Esta ecuación es válida cuando son nulas todas las correlaciones entre estas variables [GUM].

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Como ejemplo, de manera muy simplificado se muestra la estimación de la incertidumbre de la medida del tamaño promedio de la población expresado en términos del diámetro del círculo equivalente.

Se trata de nanopartículas esféricas de oro provenientes de un material de referencia, cuyo tamaño se determina midiendo el área promedio de manera automática con el programa ImageJ. El criterio de discriminación para descartar imágenes fue: áreas menores a 10 nm², imágenes no distinguibles claramente del fondo, o partículas en contacto. Adicionalmente se aplicó la prueba de hipótesis de Student como prueba de consistencia, por la cual se eliminó el resultado de una micrografía, con lo que quedaron las 526 partículas de un total de 712 contenidas en 22 micrografías con

resultados consistentes. Se observó una mejor representación de los datos del diámetro equivalente mediante un modelo log normal comparado contra el modelo gaussiano. El mejor estimado para el valor del área es de $A = 574 \text{ nm}^2$. Las contribuciones a la incertidumbre de medida del área se muestran en el siguiente cuadro:

contribución		variación	unidad *	cuantificación	distribución	incertidumbre estándar	unidad
Calibración							
	patrón de medida	0.003	nm ²	estimado	normal (2s)	0.0015	nm ²
	resolución en el proceso de calibración	0.15	nm ²	estimado	uniforme	0.09	nm ²
	escala	0.15	nm ²	estimado	uniforme	0.09	nm ²
Discriminación (<i>Thresholding</i>)		0.15	nm ²	estimado	uniforme	0.09	nm ²
Resolución		0.15	nm ²	estimado	uniforme	0.09	nm ²
r&R		3.361	nm ²	estadística	normal (1s)	3.361	nm ²
valor del patrón de medida		0.3135	nm	incertidumbre estándar combinada =		3.37	nm ²
	escala	2.56	pixel/nm	factor de cobertura =		2.06	
		0.39	nm/pixel				
		0.15	nm ² /pixel ²	incertidumbre expandida =		6.9	nm ²
				incertidumbre relativa =		1.2%	

La incertidumbre expandida de medida del área con un factor de cobertura de 2.06 correspondiente a un nivel de cobertura de 95 %, es 6.9 nm^2 , como se muestra en el cuadro.

El mejor estimado del diámetro del círculo equivalente D , calculado a partir del mejor estimado del área, $D = 2 \sqrt{A/\pi}$, toma el valor para este ejemplo de 27.02 nm . La incertidumbre estándar de medida del diámetro del círculo equivalente se estima a partir del producto de la incertidumbre estándar del área por el coeficiente de sensibilidad respectivo, $u(D) = \frac{1}{\sqrt{\pi A}} u(A)$, cuyo resultado es 0.163 nm , valor al cual se agrega cuadráticamente una contribución de 0.116 nm por la dispersión de los valores del diámetro, lo cual resulta en 0.205 nm , por lo que la incertidumbre expandida es 0.41 nm expresada a un nivel de cobertura de 95 %.

En este ejemplo debe notarse que el símbolo “nm” indica solamente que la magnitud medida es una longitud, pero no puede asegurarse que el resultado sea metrológicamente trazable a la unidad SI de longitud.

9.5 Análisis bivariado

El análisis bivariado se puede usar para comparar dos conjuntos de datos bidimensionales independientes de un modelo supuesto. El análisis bivariado no conduce a cálculos de incertidumbre de medida. Sin embargo, proporciona medidas estadísticas de la similitud de distribuciones que pueden ser útiles en algunos casos. Algunos de los casos de estudio en los Anexos (B-G) incluyen partículas con diversidad de tamaño y forma. Considerar ambos tipos de descriptores será importante para la caracterización de dichos materiales. La Figura 7 muestra el diagrama de flujo para el análisis bivariado [Szekely, 2015 Este método es una prueba no paramétrica para

distribuciones iguales en alta dimensión, que prueba la hipótesis compuesta de distribuciones iguales cuando las distribuciones no están especificadas. Se pueden analizar varios tipos de dos comparaciones de variables mediante este método: distribuciones empíricas (descriptor - datos de distribución acumulativa) y datos de descriptor-descriptor (tamaño-tamaño, tamaño-forma o forma-forma). El método bivariado es muy útil para la comparación estadística de conjuntos de datos, pero no proporciona métricas que puedan utilizarse para calcular la incertidumbre de medida de los descriptores.

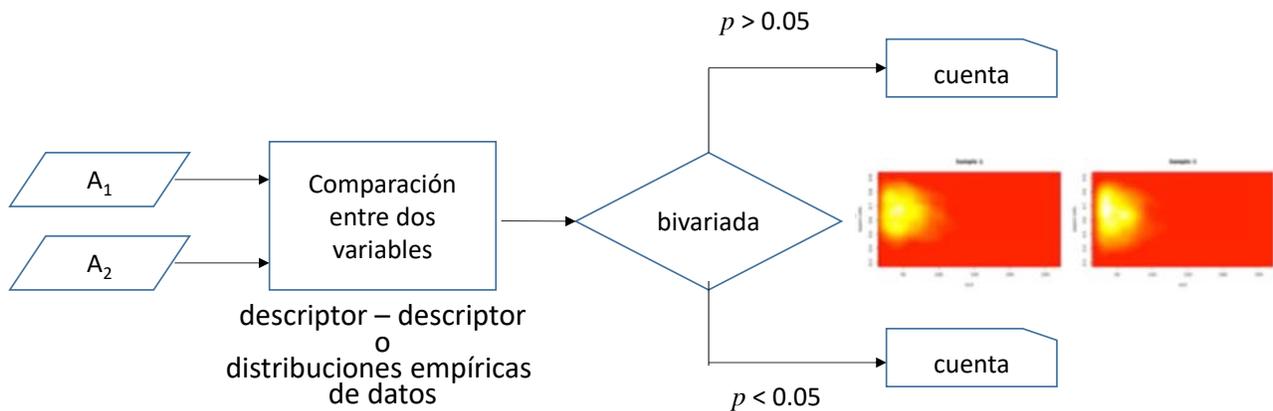


Figura 8 - Diagrama de flujo del análisis bivariado de pares de conjunto de datos.

10 Informe de resultados

El informe con los resultados de medición derivados de este documento debería cumplir con los requisitos al respecto establecidos en la NMX-EC-17025 *Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración*, e incluir la información descrita en la Tabla 5, como sea apropiado. La Tabla 5 es un ejemplo de plantilla para el informe, basada en el diagrama de flujo y los diagramas de árbol de decisiones de este documento.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: La norma NMX-EC-17025 contiene requisitos que deberían aplicarse.

Las secciones de la plantilla incluyen: caratula, preparación de muestras, factores del instrumento, captura de imágenes y análisis de partículas, y análisis de datos. Las inserciones en gris claro son ejemplos de respuestas o sugerencias de comentarios. La plantilla de informe real debe adaptarse a la muestra y a su aplicación.

Tabla 5. Plantilla de informe. Ejemplo.

La información de las entradas se muestra en gris claro.

Carátula

Elemento proyecto	Respuesta
Título del estudio	
Objetivo del estudio	
Laboratorio	
Autor	
Fecha de envío	

Preparación de la muestra

Información	Comentarios
Identificación de la muestra	
Fecha de recepción	
Sustrato	
Tipo de muestra	Polvo, dispersión, etc.
Condición de la muestra	Dispersión clara ópticamente, turbia, etc.
Tratamiento de la muestra	
División o separación de la muestra	
Pretratamiento de la rejilla	
Depósito de partículas	
Incubación	
Lavado	
Teñido	
Secado	
Sustrato	Tipo de sustrato, sustrato pretratado.
Método de colocación	
Método de secado	

Factores del instrumento

Información	Comentarios
Organización	
Operador	
Análisis de datos	
Fabricante del TEM	
Modelo del instrumento	
Voltaje de operación	
Ajustes de corriente del haz	
Excitación de la lente objetiva	
Apertura de difracción	
Estándares de calibración	
Procedimiento de calibración	
Fecha de calibración más reciente	

Captura de imágenes y análisis de las partículas

Información	Comentarios
Captura de imagen	
Método/Software	Adquisición automática o manual, Software.
Condiciones de medición	Amplificación, nm/pixel, tamaño de micrografía, relación señal a ruido
Descriptores retenidos	Detalles de todos los mensurandos analizados, numero de partículas reportadas, numero de micrografías
Análisis de partículas	
Condiciones de umbral	
Área mínima de las partículas (>200 pixeles)	
Cantidad de micrografías y de partículas	

Análisis de datos

Información	Comentarios
Clasificación de datos sin procesar	
Software/ Método	
Detección de partículas en contacto	Descripción de informes, rangos para la detección y diferenciación
Descripción de artefactos	Descripción de informes, rangos para la detección y diferenciación
Partículas retenidas	Descripción de informes, rangos para la detección y diferenciación
% de Rendimiento medio	Reporte del % de partículas retenidas
Otros pasos de clasificación	
Repetibilidad, precisión intermedia, o reproducibilidad	
Software/ Método	Software/ANOVA; análisis bivariado; otros
Repetibilidad, precisión intermedia, o reproducibilidad	Informe p-valor para análisis de gran promedio; % valor- <i>p</i> similares para análisis por pares
Selección del descriptor	Método de informe para la selección del descriptor, si es aplicable
Ajuste de la distribución a los datos	
Software/ Método	Software/ regresión no lineal; probabilidad máxima; otros
Modelo de referencia preferido	Informe normal, lognormal, Weibull, u otra distribución
Valores paramétricos	Informe estimado y erros estándar, % C_v
Incertidumbre de medida	
Descripción del error estándar residual	Informe del error estándar residual del parámetro descriptor, si se calcula
u_{ILC} ó u_{ip}	Informar incertidumbre de medida entre laboratorios, si se calcula

Desviación residual; correlaciones

Software /Método	
Desviación estándar residual	Informe, si se calcula
Gráficos: desviación residual, cuantiles, otros	Informe de la gráfica de desviación residual, grafica de cuantiles mostrando el rango sobre el cual el modelo se ajusta a los datos
Correlaciones	Informe de correlaciones desarrolladas entre descriptores

11. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma Mexicana es idéntica a la Norma Internacional ISO/TS 21363:2019 *Nanotechnologies — Measurements of Particle Size and Shape Distributions by Transmission Electron Microscopy*.

Apéndice A (informativo) **Casos de estudio, generalidades**

Los procedimientos detallados se validaron mediante estudios de comparación entre laboratorios (Apéndices B, D, E y F) conforme a las directrices de VAMAS correspondientes [Roebben, 2017] y la aplicación de la norma [NMX-CH-5725].

Apéndice B. Partículas discretas esferoidales

El RM8012 es un material de referencia de nanopartículas esferoidales de oro que a menudo se utiliza para calibrar TEM [NIST, 2007], [NIOSH/DUNE, 2012].

Apéndice C. Mezcla de tamaños

La sílice coloidal se utiliza en lechadas para pulir, como aditivo para cosméticos, y como componente de nanocompuestos. La muestra fue el material de referencia certificado ERM-FD102, una mezcla bimodal de sílices coloidales comerciales [Kestens, 2014], [Kestens, 2016].

Apéndice D. Mezcla de formas

La resonancia plasmónica longitudinal, sintonizable, de nanobarras se ha relacionado a su morfología [Becker, 2010]. Se supuso que dos mezclas de nanobarras de oro con nanocubos de oro tendrían diferente comportamiento [Grulke, 2018 a]. Las muestras fueron similares al Material de Referencia Certificado en China.

Apéndice E. Agregados amorfos

Los agregados de negro de carbono tienen morfología aciniforme, cuyos nódulos – considerados como partículas primarias- se agregan para tomar la forma de racimos de uvas. Para la muestra de referencia de negro de carbono, SRB8, proporcionada por Cabot Corporation, se disponía el protocolo ASTM D3849-14a [Grulke, 2018 b].

Apéndice F. Agregados nanocristalinos

Los óxidos metálicos nanocristalinos son de uso común y casi siempre forman agregados cuando se producen mediante un proceso en fase vapor. El tamaño y la forma de cristalitas constituyentes de polvo de dióxido de titanio agregados son esenciales para el buen desempeño del producto. Tayco Corporation proveyó una muestra comercial.

Apéndice G. Partículas de baja relación de aspecto

Las distribuciones de tamaño y de forma de nanopartículas de baja relación de aspecto son críticas para algunas de sus aplicaciones. Se encuentran reportados métodos de medida para las fibrillas elementales de material de referencia certificado, MRC, de nanocelulosa cristalina CNCD-1 provisto por el *National Research Council*, Canadá [NRC, 2017].

Apéndice H. Nanopartículas con hábitos cristalinos específicos

Las nanopartículas de dióxido de titanio bipiramidales presentan morfologías tridimensionales bien definidas [Lavric, 2017] y se consideran como un material de referencia potencial tanto para distribuciones de tamaño como de forma.

Tabla A.1 Hallazgos principales reportados en cada caso de estudio

Apéndice	Hallazgos principales
Apéndice B. Partículas discretas esferoidales	La calidad de los datos se evaluó mediante la captura automática de imágenes; se reportan incertidumbres de medida de las medias y dispersiones de las distribuciones.
Apéndice C. Mezcla de tamaños	Muestra criterios para separar datos bimodales en grupos y se evalúa la precisión intermedia de grupos separados.
Apéndice D. Mezcla de formas	Muestra criterios para identificar nanobarras en contacto y cuantificar las diferencias en las distribuciones de tamaño y de forma.
Apéndice E. Agregados amorfos	Las incertidumbres de medida de las medias de la distribución del descriptor del agregado están en el orden: forma elongada < tamaño < rugosidad. Se encuentra que los agregados esferoidales, elipsoidales, ramificados y lineales no están uniformemente distribuidos, dando lugar a distribuciones multimodales.
Apéndice F. Agregados nanocristalinos	Reporta una identificación manual de nanocristalitos. El método de calibración y el software para procesar la imagen no afectaron la calidad de los descriptores de tamaño y forma. Se encontró que los descriptores de tamaño se representan mejor por distribuciones log-normal. El modelo bimodal de una distribución de tamaño es un ejemplo de técnicas de visualización utilizados para mejorar la comprensión.
Apéndice G. Partículas de baja relación de aspecto	Compara tres métodos manuales de medida con datos para fibrillas elementales de celulosa nanocristalina, las cuales son de nanopartículas de baja relación de aspecto.
Apéndice H. Nanopartículas con hábitos cristalinos específicos	Compara mediante ANOVA las reproducibilidades de imágenes bidimensionales de partículas tridimensionales para tres tipos de instrumentos, análisis múltiples de una rejilla y análisis de las imágenes de la misma partícula por seis laboratorios.

Apéndice B (informativo) Partículas discretas esferoidales

B.1 Referencia

El reporte completo del método y resultados se encuentran en [Rice, 2013].

B.2 Antecedentes y objetivos del diseño

El RM8012 es un material de referencia preparado por el NIST. La Figura B1 muestra una micrografía típica de TEM con nanopartículas de oro. Algunas partículas están en contacto. Como las nanopartículas de oro son poliédricas, no todos los perfiles son redondeados. El protocolo incluyó la captura automática de micrografías, el análisis automático de las partículas, y el análisis estadístico de los datos originales y de los parámetros ajustados, lo cual constituye un marco para la medición de distribuciones de tamaño de partícula.

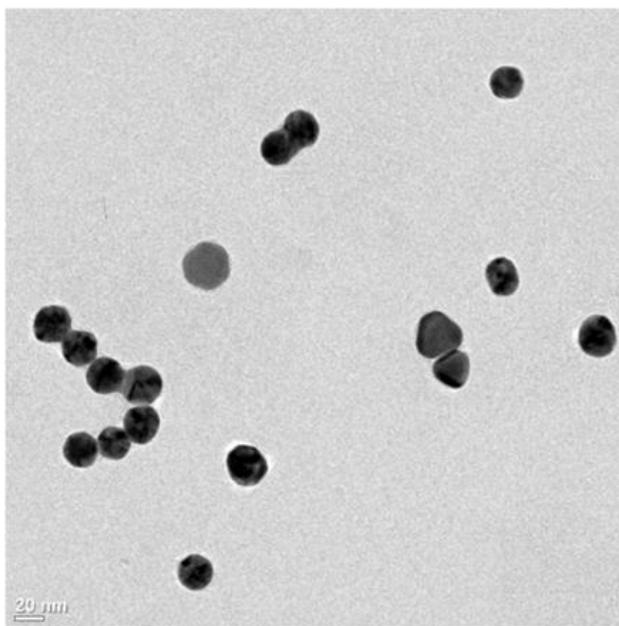


Figura B.1. Una imagen de RM8012 mediante TEM.

B.3 Aspectos relevantes

La repetibilidad intra-laboratorio de los diámetros circulares equivalentes, de los diámetros de Feret y de las relaciones de aspecto se evaluaron satisfactoriamente mediante el análisis ANOVA de los datos en micrografías.

La Tabla B.1 muestra las incertidumbres de medida $-U_{ILC}$ de los parámetros del modelo ajustado tanto para distribuciones log-normal como para distribuciones normales obtenidas de una comparación entre laboratorios [Rice, 2013]. Los promedios de los modelos ajustados a una distribución log-normal presentan incertidumbres de medida más bajas que los asociados a distribuciones normales, $U_{ILC} = 1.6\%$ y 5.5% respectivamente. Los parámetros de dispersión para cada distribución tienen coeficientes de variación e incertidumbres de medida similares.

Tabla B.1. Incertidumbres de medida de parámetros del modelo ajustado del descriptor de diámetro circular equivalente.

Estadístico	Promedio	Dispersión
Distribución log-normal	$X, \ln(\text{nm})$	$S, \ln(\text{nm})$
$C_V, \%$	0.76	6.0
$U_{ILC}, \%$	1.6	12.6
Distribución normal	X, nm	S, nm
$C_V, \%$	2.6	5.8
$U_{ILC}, \%$	5.51	12.3

Una de las subrutinas de *ImageJ* para la separación de partículas en contacto produjo distribuciones de tamaño con promedios menores y dispersiones más angostas. La Figura B.2 muestra la distribución de diámetro máximo de Feret para únicamente partículas sin contacto y para partículas sin contacto y en contacto separadas por el algoritmo de Watershed. El promedio para los datos sin contacto es varios puntos porcentuales superior al de los datos separados. Además, la dispersión de las partículas sin contacto es más amplia que la de las partículas en contacto. En este caso el uso del algoritmo de Watershed para separar partículas en contacto da lugar a distribuciones cuantitativamente diferentes.

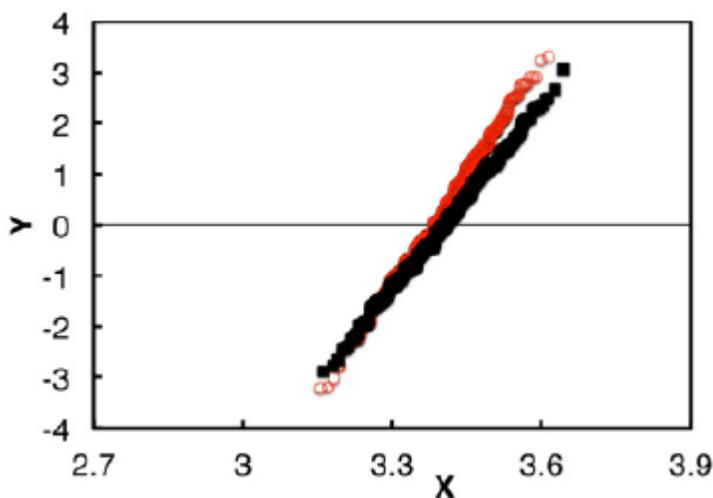


Figura B.2. Comparación de distribuciones de diámetro máximo de Feret de partículas sin contacto (cuadrados negros) y de las distribuciones de partículas en contacto separadas por el algoritmo de Watershed (círculos rojos).

Los descriptores de tamaño mostraron incertidumbres de medida parecidas. Tanto el diámetro circular equivalente como el diámetro de Feret tienen representaciones similares de la distribución de tamaño de la muestra bajo prueba. Los modelos log-normal presentan valores menores de incertidumbre de medida para la media y la dispersión de las distribuciones de tamaño, en comparación con los ofrecidos por los modelos normales. En tanto la muestra está certificada para la media de su diámetro

equivalente –bajo la suposición de una distribución normal-, se observa que es menor el valor de la incertidumbre de medida obtenido de una distribución log-normal.

Apéndice C (informativo) Mezcla de tamaños

C.1. Propósito

Las nanopartículas pueden tener una distribución multimodal de o de forma, ya sea como resultado del método de procesamiento de la nanopartícula o como el resultado de la mezcla de diferentes nanopartículas. Este anexo aporta ejemplos de cómo tratar los datos de tamaño y forma obtenidos por microscopía de electrones de tales materiales. Esto por ejemplo, puede ser importante para separar diferentes fracciones (o “modas” o “grupos”) en un material en partículas antes de realizar un análisis de las fracciones individuales.

C.2. Detalles y antecedentes del ejemplo seleccionado, ERM-FD102

El material elegido para ilustrar el posible enfoque es el ERM-FD102 [Kestens, 2014], un material de referencia certificado (CRM) producido por el *Joint Research Centre of the European Commission* (JRC). El ERM-FD102 se preparó mezclando dos sílices coloidales comerciales con diferentes tamaños nominales, ~20 nm y ~80 nm. Para las dos modas principales en la distribución de tamaño de partícula (DTP) del MRC, el certificado de éste [Kestens, 2014] proporciona varios tamaños de partícula certificados dependiendo del método, incluyendo el análisis por microscopía de electrones (EM) (Fig. C1). Dado que los tamaños de las principales modas difieren en una proporción de aproximadamente 4, se utilizaron diferentes ampliaciones en la caracterización por EM del MRC para obtener distribuciones de tamaños representativas para ambas modas. Cada laboratorio de EM que participó en el estudio de caracterización del MRC obtuvo seis grupos de datos en un periodo de tres días con al menos 300 partículas grandes en cada grupo de datos.

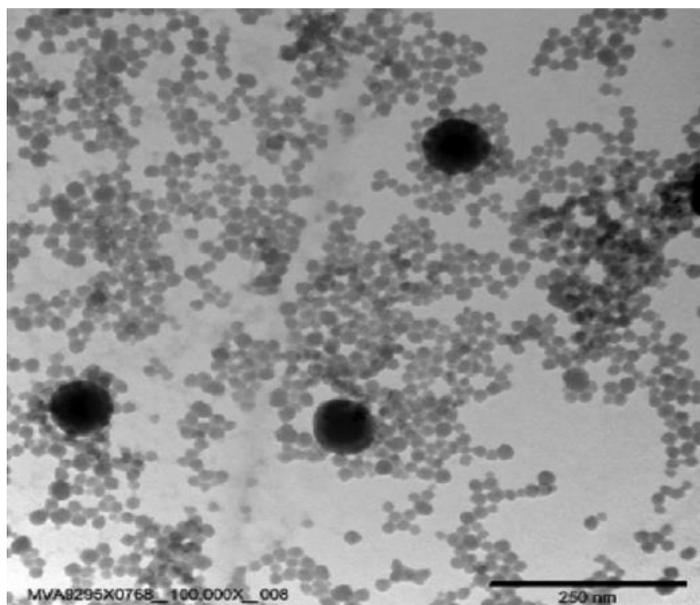


Figura C.1. Imagen obtenida por TEM de una mezcla de nanopartículas de sílice coloidal. Utilizada con permiso del *Joint Research Centre of the European Commission* (JRC).

La mediana del diámetro circular equivalente (DEA) por EM, certificada para la mayor de las dos modas en el ERM-FD102, es de 83.3 nm con una incertidumbre expandida de medida de 2.3 nm. Este valor es el valor de la mediana en el intervalo de tamaño de 60 nm a 120 nm [Kestens, 2014]. El ancho del pico correspondiente de la DTP no fue certificado.

Las imágenes por AFM del mismo material (ERM-FD102) [Kestens, 2016] también mostraron la presencia de partículas de tamaño medio entre las partículas grandes (nominalmente 80 nm) y las más pequeñas (nominalmente 20 nm). Las imágenes tomadas por TEM para medir el cúmulo de partículas grandes también mostraron las partículas de sílice de “tamaño medio” en el intervalo de ~40 nm. La Figura C2 muestra un histograma y una distribución acumulada de los datos obtenidos por TEM reportado por un Laboratorio (“Lab 1”): el número total de partículas grandes reportadas en el intervalo de 35 nm a 125 nm fue de 2801, de las cuales 761 tienen tamaños con un diámetro circular equivalente (DEA) menor de 60 nm; este valor corresponde al mínimo aparente entre los dos picos del histograma. Todas las distribuciones del descriptor de tamaño para el ERM-FD102 son bimodales. Se reportaron tres tipos de descriptores: tamaño (incluyendo el área, perímetro, diámetro de Feret, diámetro de Feret mínimo, y DEA), forma elongacional (incluyendo relación de aspecto y compacidad); y robustez/irregularidad de los límites (incluyendo el factor de forma y solidez).

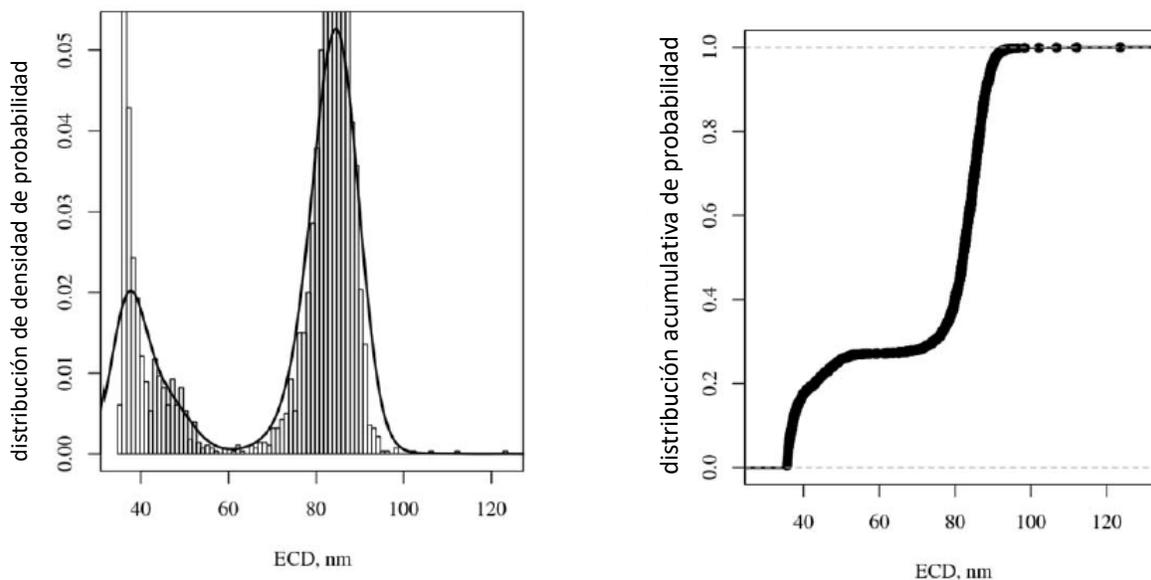


Figura C.2. Histograma (lado izquierdo) y distribución acumulada (lado derecho) del análisis, del diámetro circular equivalente (DEA) de las imágenes de las partículas grandes, Lab 1.

La Tabla C.1. muestra las identificaciones (ID) de las muestras, el número de partículas contadas entre 35 nm y 125 nm, el número de partículas con un DEA más grande que 60 nm, y la fracción de partículas con DEA < 60 nm. Todos los grupos de datos reportaron más de 300 partículas grandes analizadas (un objetivo del protocolo) excepto para D3S1, el cual reportó 271 de las partículas grandes. La fracción promedio de las partículas de tamaño medio fue del 27.2 %.

Tabla C.1. Seis grupos de datos para la comparación de la precisión intermedia

Grupo de datos			Conteos de partículas		
Día	Muestra	ID	Todas	DEA > 60 nm	DEA < 60 nm,%
1	1	D1S1	472	341	27.8%
1	2	D1S2	411	330	19.7%
2	1	D2S1	509	367	27.9%
2	2	D2S1	510	369	27.6%
3	1	D3S1	418	271	35.2%
3	2	D3S2	481	362	24.7%
Totales			2801	761	

C3. Análisis de datos

Este análisis aborda tres preguntas: 1) ¿qué métodos pueden determinar similitudes o diferencias entre distribuciones de tamaño bimodales?, 2) ¿qué métodos podrían diferenciar mejor partículas grandes (nominalmente ~80 nm) de partículas de tamaño medio (nominalmente ~40 nm)?, y 3) ¿cuáles son las precisiones intermedias (3.5.2 y Tabla 4) del tamaño, la elongación, y la robustez de las distribuciones?

Las respuestas a la primera pregunta establecerán los pasos para la clasificación de datos sin procesar. Las respuestas a la segunda pregunta pueden automatizarse para separar los datos en grupos de partículas grandes y medianas. Las respuestas sobre la precisión intermedia para partículas grandes pueden compararse con los valores de la incertidumbre de medida del MRC [Kestens, 2014], [Kestens, 2016].

C.3.1 Selección de datos sin procesar

En el estudio de caracterización del ERM-FD102, los laboratorios reportaron seis grupos de datos tomados durante un periodo de 3 días (2 por día). La comparación de las medias del muestreo por un análisis de ANOVA global no es particularmente relevante si se quiere juzgar la equivalencia o la comparabilidad de dos distribuciones bimodales medidas. En su lugar, los análisis de ANOVA por pares fueron realizados para cada uno de los 15 posibles pares para 6 grupos de datos D_iS_j (p. ej., como en la Tabla C1). El ANOVA por pares de DEA (tamaño), relación de aspecto (forma alargada), y solidez (forma irregular) dio un $p > 0.05$ para 11 de 15, 15 de 15 y 9 de 15 pares respectivamente, que se evalúan en consecuencia como muy bien (DEA), excelente (relación de aspecto) y buena precisión intermedia (solidez). Dado que las medias del conjunto de datos son intermedias entre los diámetros nominales de las partículas medianas y grandes, estos valores medios son sensibles a las fracciones en número de cada categoría reportada en la Tabla C1.

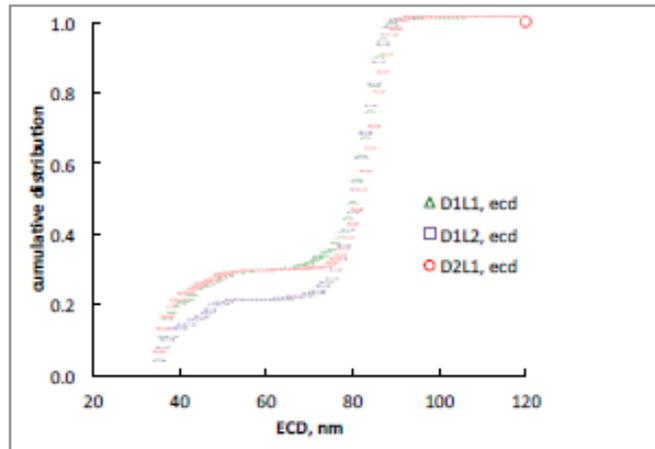


Figura C.3. Comparación entre las distribuciones DEA, conjunto de datos de las partículas grandes, L1.

Los métodos que comparan directamente distribuciones podrían ser más apropiados para comparar estos conjunto de datos, tales como el análisis de dos variables y el análisis Kolmogorov-Smirnov (K-S). La prueba K-S está diseñada para determinar directamente si dos distribuciones acumuladas son diferentes, sin referencia a ningún modelo particular para describir los datos. La distribución acumulada para cada grupo de datos fue recortada utilizando 100 pasos iguales sobre el intervalo total de datos para cada descriptor. Las diferencias entre dos curvas en cada paso, $D_{n,m}$, fueron comparadas con la estadística del supremo (Tabla 3; [Gulke, 2018 a], [Souza, 2011]). Si la diferencia excede el supremo, las distribuciones acumuladas se consideran diferentes. La Figura C.3 muestra las distribuciones acumulativas para tres conjuntos de datos, D1S1, D1S2 y D2S1.

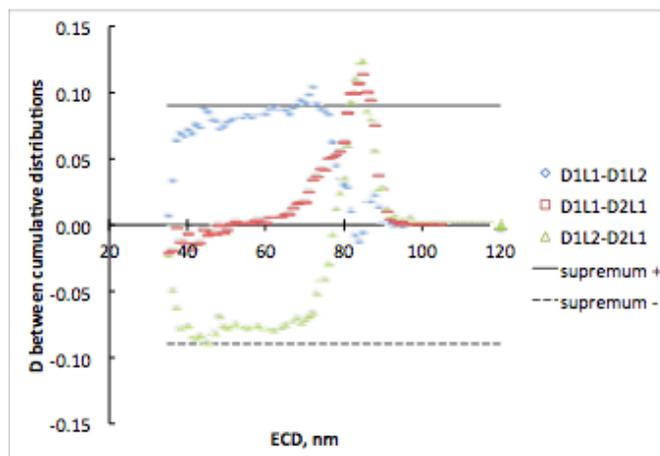


Figura C.4. Comparación de pares de $D_{n,m}$ a valores supremo para las tres distribuciones DEA, conjunto de datos de partículas grandes, L1.

Los valores supremos para estos tres pares fueron similares, ~ 0.09 , así que solo un grupo de valores supremos (ambos + y -) se grafican en la Figura C4. Por la prueba K-S, los tres conjunto de datos tienen áreas que exceden el supremo por lo que se consideran

diferentes. Esto es debido, en parte, a las diferencias en el número de partículas de tamaño mediano en los varios conjuntos de datos, los cuales varían del ~20% al ~35%. Es probable que tales diferencias puedan reducirse si se incrementa el número de puntos de datos. La prueba K-S podría preferirse a la prueba de ANOVA para estas distribuciones bimodales ya que proporciona mejor información acerca de las diferencias entre distribuciones ($D_{n,m}$) y, específicamente, sobre cómo varían estas diferencias a lo largo del intervalo del descriptor.

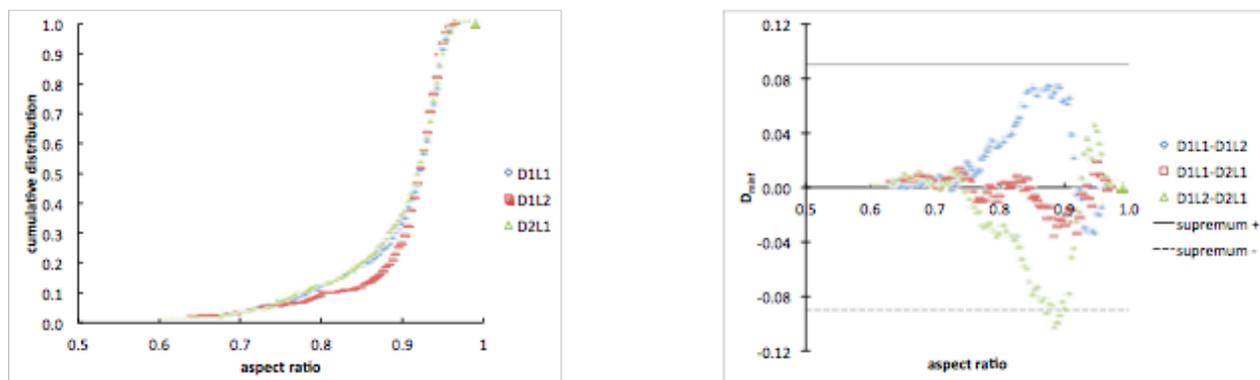


Figura C.5. – Comparación de tres distribuciones de relación de aspecto. a) Distribuciones acumulativas en el lado izquierdo; b) comparaciones de $D_{n,m}$ en el lado derecho.

Las Figuras C.5 a y b muestran gráficas similares para las distribuciones de forma alargada (relación de aspecto). Las distribuciones de relación de aspecto para todas las partículas analizadas por imagen son multimodales. La distribución de relación de aspecto tiene una variabilidad considerable para los valores arriba de 0.9 (Fig. C.5 a). Esto es causado por dos factores: diferencias en la distribución de la relación de aspecto para los dos grupos y las diferencias en las fracciones de cada grupo en la distribución total de muestra a muestra. Los dos grupos de datos con fracciones similares de grupos de tamaño mediano, D1S1 y D2S1 (con 27.8% y 27.9%, respectivamente) tienen valores $D_{n,m}$ bien dentro de los supremos en todos los valores de los intervalos de la relación de aspecto. Para dos de estos tres pares de grupos de datos se considera que las distribuciones de relación de aspecto son similares.

C.3.2 Diferenciación entre grupos de partículas grandes y medianas

Los dos grupos de datos en la Fig. C.2. pueden separarse de varias formas, incluyendo un valor mínimo en la distribución DEA, el cual está en el intervalo de 60 nm. Como alternativa podrían considerar tanto el tamaño como la forma de las partículas coloidales de sílice. Las partículas de sílice coloidal son conocidas por sus formas esferoidales. No obstante, aquí se muestran tres métodos para considerar las correlaciones del tamaño de partícula y la forma. La primera considera una correlación tamaño-tamaño con el diámetro de Feret máximo como la variable independiente y el diámetro de Feret mínimo como la variable dependiente. Los otros usan el diámetro DEA como la variable independiente con ya sea un descriptor de forma alargada (relación de aspecto) o uno de forma irregular (solidez) como variable dependiente.

Correlación del diámetro de Feret mínimo con el diámetro de Feret.

La Figura C.6 muestra una gráfica del diámetro de Feret mínimo como función del diámetro de Feret. Los dos grupos han sido separados empíricamente utilizando la línea punteada para automatizar el proceso de clasificación. En este caso, se podrían usar una variedad de líneas para hacer la separación de vertical a horizontal. Los modelos lineales ($minFeret = a*Feret+b$) para cada uno de los grupos dan pendientes diferentes pero las correlaciones tienen valores de R^2 de 0.76 y 0.66; sus ecuaciones no se reportan aquí ya que éstas no proporcionan un método convincente para diferenciar los dos grupos de partículas.

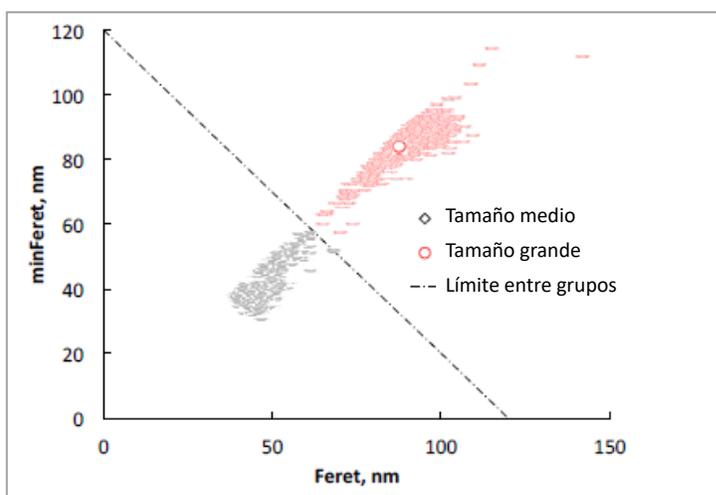


Figura C.6 Gráfica de correlación para minFeret como función de Feret

Correlación de la relación de aspecto con el diámetro DEA.

Un segundo método es correlacionar la relación de aspecto al diámetro DEA. El resultado se muestra en la Figura C.7. Aquí, la identificación de los grupos sigue siendo la misma, es decir, el límite es todavía la línea punteada de la Figura C.6. La gráfica en la Figura C.7 muestra diferencias en la morfología entre los dos grupos. El grupo de partículas grandes tiene un intervalo de relación de aspecto más pequeño, 0.77 a 0.98. El grupo de partículas medianas tiene un intervalo de relación de aspecto de 0.61 a 0.96. Por lo tanto, más partículas del grupo mediano son alargadas en comparación con las del grupo de partículas grandes. Sin embargo, los grupos no pueden ser separados utilizando sólo sus distribuciones de relación de aspecto ya que hay un traslape significativo de los intervalos. Los traslapes contribuyen al amplio intervalo de las distribuciones de relación de aspecto como se observan en la Fig. C.5.a. Adicionalmente, el grupo de tamaño mediano parece estar truncado para DEA <35 nm; este tema se discutirá con más detalle en la Sección C.3.3.

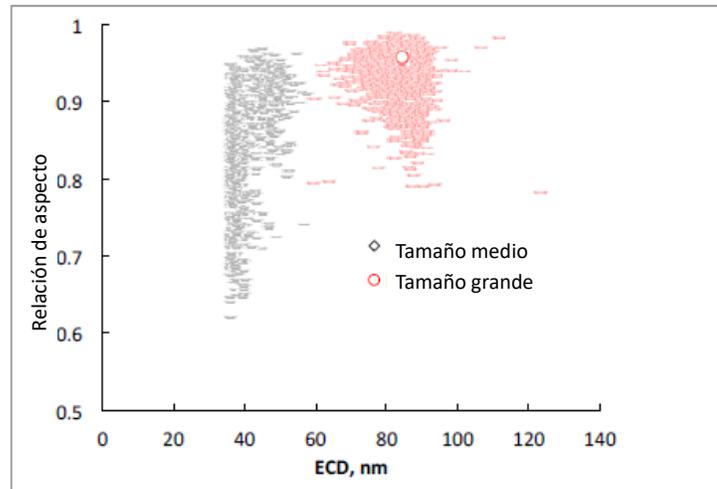


Figura C.7. Correlación entre relación de aspecto y DEA. Grupo de tamaño mediano - diamantes negros sin relleno. Grupo de tamaño grande - círculos rojos sin relleno.

Correlación de la solidez con el diámetro DEA.

La Figura C.8 muestra la correlación entre la solidez y el DEA para estos dos grupos. La solidez es una medida de la rugosidad de la superficie o irregularidad del borde. Los valores de solidez para ambos grupos son bastante altos, sin embargo se presenta una diferencia en los descriptores de robustez. El grupo no puede distinguirse utilizando sólo la solidez sin embargo, al comparar también con DEA, es notable una distinción convincente entre los dos. La elección para los límites entre grupos en cualquiera de estas correlaciones puede cuantificarse por separaciones automáticas.

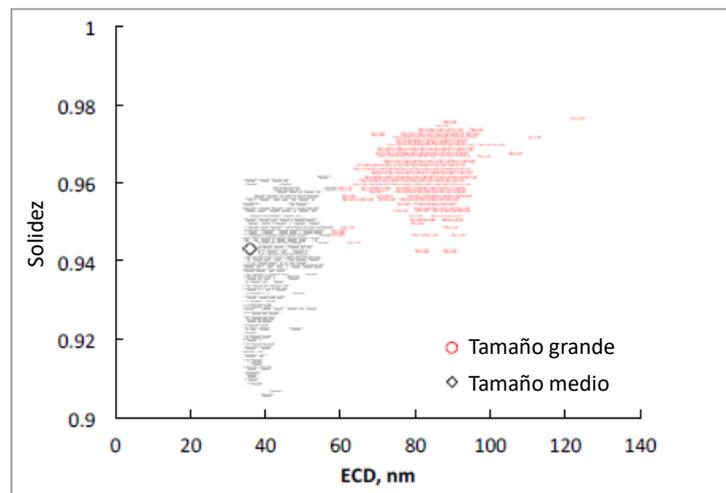


Figura C.8. Correlación entre solidez y DEA. Grupo de tamaños medianos - diamantes negros sin relleno. Grupo de tamaños grandes - círculos rojos sin relleno.

C.3.3 Precisión intermedia del laboratorio

Los valores de la precisión intermedia pueden calcularse para los parámetros de los modelos de referencia ajustados a las distribuciones acumuladas de los grupos de tamaños grandes y medianos por el método de la Fig. C.6. Las Tablas C.2 y C.3 muestran los parámetros ajustados para el DEA, relación de aspecto y solidez para los grupos grandes y medianos, respectivamente. El valor promedio para el valor del DEA medio del grupo de partículas grandes es 84.1 nm y la dispersión de los datos es 4.0 nm. El valor medio tiene buena correspondencia con el valor de la mediana reportado para las partículas de tamaño grande (83.3 nm). No hay valor certificado para la dispersión de esta distribución, o para los parámetros ajustados de la relación de aspecto y solidez. La incertidumbre de la media del DEA es 2.3% y las incertidumbres de medida de las medias de la relación de aspecto y la solidez son menores. Las incertidumbres de medida asociadas con la dispersión de datos son mucho mayores.

Tabla C.2. Partículas grandes separadas. Parámetros ajustados para la media y la dispersión para las distribuciones del DEA, relación de aspecto y solidez (2040 imágenes). El modelo de referencia es la normal.

Muestra	DEA, nm		Relación de aspecto		Solidez	
	Media	Dispersión	Media	Dispersión	Media	Dispersión
D1S1	83.9	4.01	0.935	0.0217	0.963	0.0035
D1S2	82.9	4.25	0.932	0.0207	0.963	0.0034
D2S1	84.9	4.05	0.935	0.0226	0.963	0.0036
D2S2	85.3	3.61	0.930	0.0244	0.963	0.0039
D3S1	83.6	4.08	0.932	0.0217	0.964	0.0036
D3S2	83.6	4.12	0.932	0.0211	0.963	0.0033
Promedio	84.1	4.02	0.932	0.0220	0.963	0.0036
Desv. Est.	0.909	0.217	0.0020	0.0013	0.0001	0.0002
<i>CV %</i>	1.08	5.39	0.22	6.02	0.01	5.84
<i>U, %</i>	2.34	11.6	0.47	13.0	0.02	12.6
U, valor	1.96	0.47	0.0044	0.0029	0.0002	0.0004

Las figuras C.9 a-c muestran las distribuciones de densidad suavizadas del grupo de datos combinados de la fracción de partículas grandes en el ERM-FD102, junto con los modelos con los parámetros ajustados utilizando una regresión no lineal o estimaciones por máxima verosimilitud. Todos los ajustes se basan en modelos de referencia normales. Los datos del DEA están bastante bien representados por una distribución normal con ligeras diferencias en el valor máximo además del borde izquierdo de la distribución. Los datos de la relación de aspecto son multimodales; has desviaciones significativas entre los datos y el modelo en el borde de subida, el máximo y el borde descendente de intervalo del descriptor. Los datos de solidez son también multimodales pero hay una correspondencia ligeramente mejor entre los datos y los modelos.

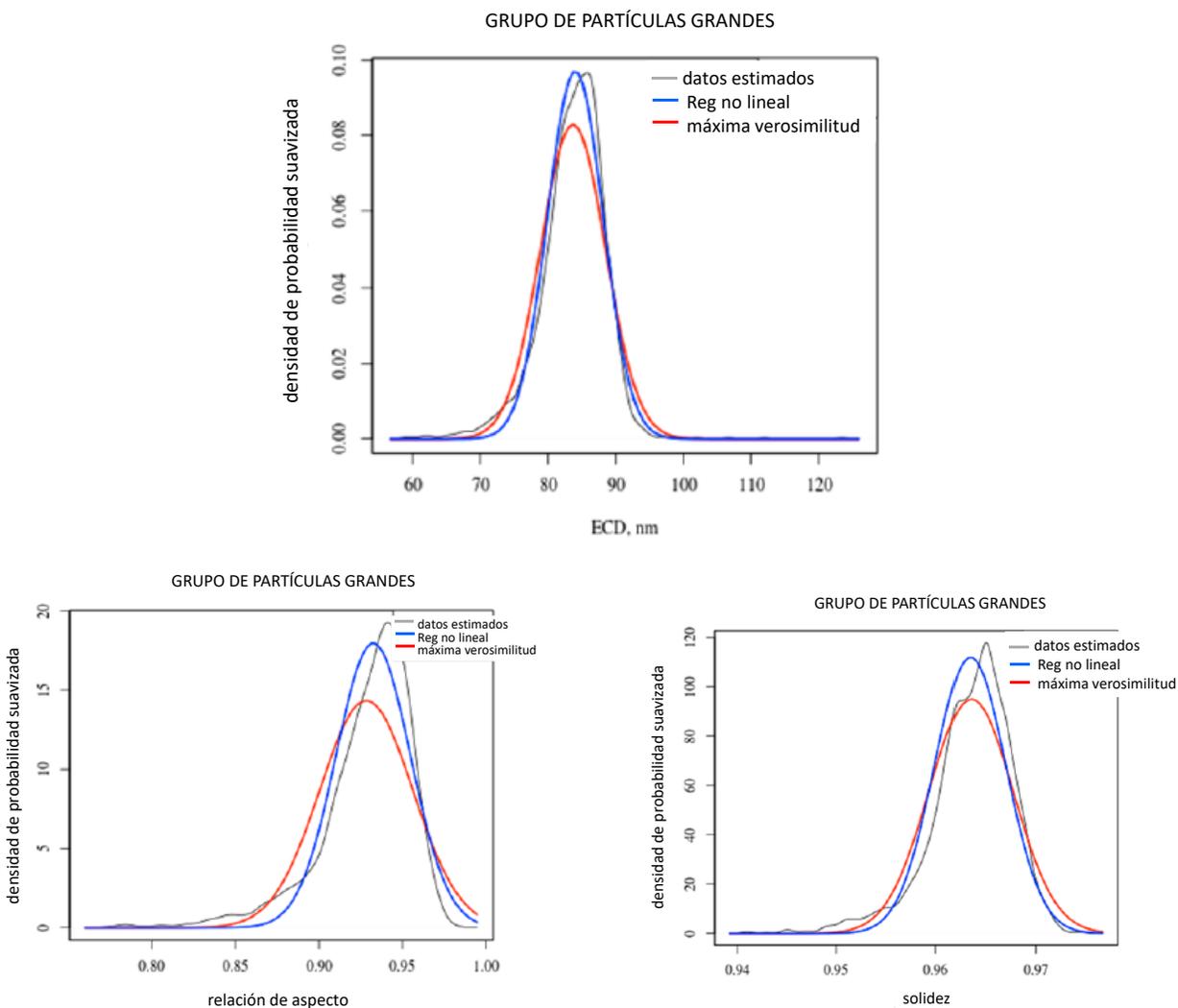


Figura C.9 a-c. Distribución de densidad de probabilidad suavizada del grupo de los datos de tamaños grandes (negro) comparada con los estimados por regresión no lineal (azul) y máxima verosimilitud (rojo), utilizados para ajustar los datos al modelo de referencia de distribución normal.

La Tabla C.3 muestra las incertidumbres asociadas con los tres parámetros descriptores seleccionados para los datos separados del grupo de tamaños medianos. Las Figuras C.10.a-c muestran las distribuciones ajustadas con los datos asociados.

La distribución del DEA tiene una dispersión de ~5% y los datos son significativamente sesgados a la izquierda de las curvas modelo unimodales. Esto es debido al hecho de que los datos para el pico de tamaños medianos están truncados como se muestra en las Figuras C.7 y C.8. Como se indicó anteriormente, el JRC solicitó a los laboratorios participantes reportar datos solo de fracciones de partículas pequeñas y grandes. La media de la relación de aspecto del grupos de tamaño mediano es estadísticamente menor que a del grupos de los grandes, es decir, las medias distan entre sí mucho más

de dos desviaciones estándar. La media de la solidez del grupo de tamaño medio es también estadísticamente menor que los datos del grupo de tamaños grandes.

Tabla C.3 – Datos de los grupos de tamaños medianos separados. Parámetros ajustados para la media y la dispersión de las distribuciones del DEA, relación de aspecto y solidez (761 imágenes). Modelo de referencia normal.

Muestra	DEA, nm		Relación de aspecto		Solidez	
	Media	Dispersión	Media	Dispersión	Media	Dispersión
D1S1	39.3	4.67	0.831	0.0863	0.940	0.0092
D1S2	40.4	5.83	0.837	0.0969	0.939	0.0108
D2S1	38.4	3.45	0.827	0.0825	0.936	0.0095
D2S2	38.4	3.35	0.839	0.0688	0.937	0.0095
D3S1	38.4	3.19	0.845	0.0776	0.934	0.0121
D3S2	40.0	5.32	0.815	0.0895	0.938	0.0114
Promedio	39.2	4.30	0.832	0.0836	0.938	0.0104
Desv. Est.	0.896	1.13	0.0107	0.0097	0.0022	0.0012
<i>CV %</i>	2.29	26.3	1.28	11.7	0.23	11.5
<i>U, %</i>	4.95	56.8	2.77	25.2	0.50	24.7
<i>U, valor</i>	1.94	2.44	0.0230	0.0211	0.0047	0.0026

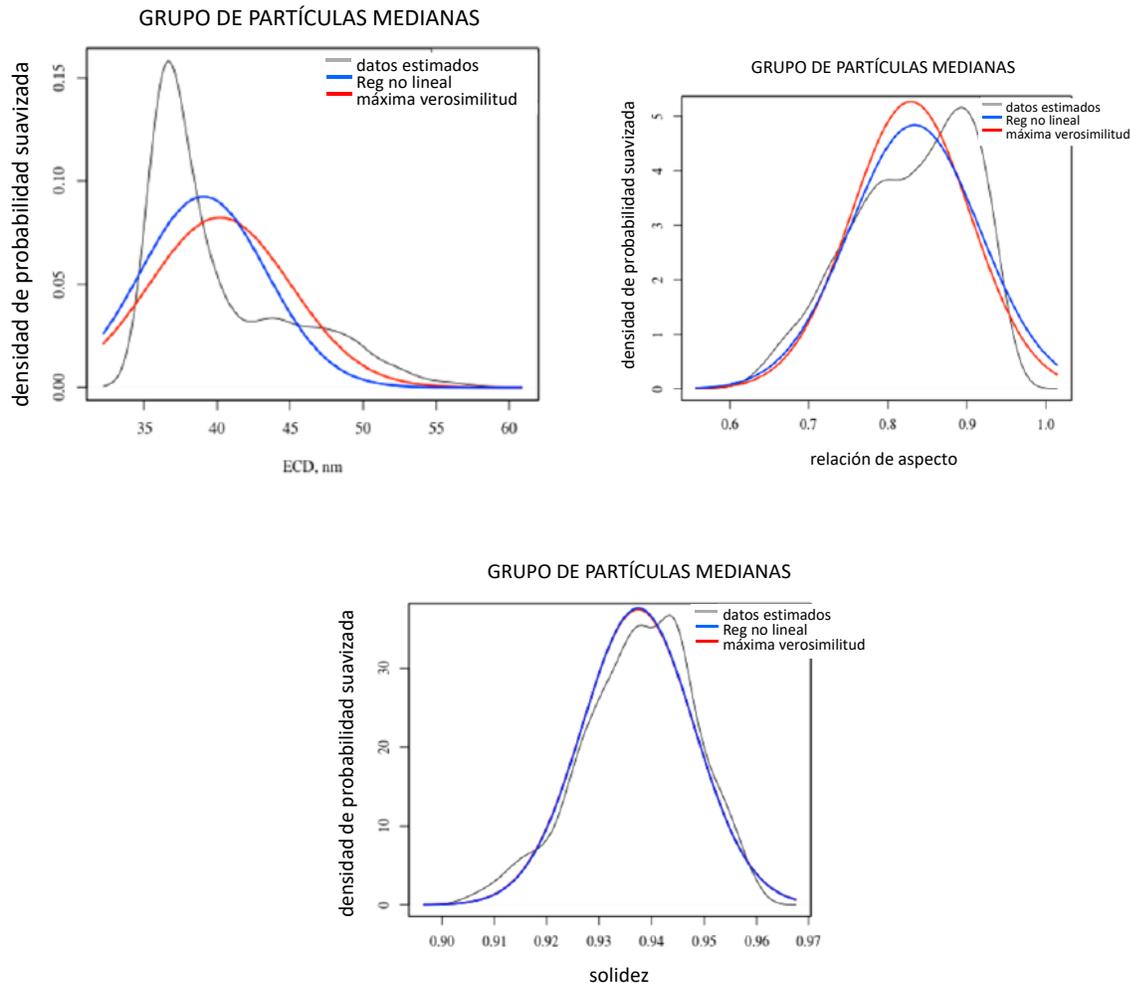


Figura C.10a-c. Distribución de densidad suavizada del grupo de tamaños medianos de los datos (negro) comparada a la regresión no lineal (azul) y el modelo del estimado de máxima verosimilitud (rojo).

C.4 Conclusiones

La estadística de Kolmogorov-Smirnov es efectiva para determinar las diferencias entre pares de distribuciones acumuladas bimodales, discriminando si los dos grupos de datos son diferentes e identificando los rangos de los datos en el cual ocurren las diferencias más grandes. Este método puede ayudar a evaluar datos sin procesar e identificar las mejoras potenciales en el protocolo, es decir, los elementos que pueden conducir a mayor repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.

Los datos EM obtenidos en la fracción grande de la mezcla del ERM-FD102 de partículas de sílice coloidal pueden separarse en grupos de tamaño grande y mediano utilizando un descriptor de tamaño (DEA). Las gráficas de dos variables pueden ayudar a visualizar las diferencias en los descriptores de tamaño, elongación y robustez. Estas gráficas pueden mejorar la diferenciación de la morfología de los grupos, ilustrando cuáles descriptores son los mismos y cuáles diferentes entre los pares. En este caso, las visualizaciones también confirman que algunas de las partículas medianas han sido

separadas del conjunto del total de los datos o no consideradas. Ayudan entonces a tomar decisiones sobre la necesidad de datos adicionales.

Las distribuciones de la relación de aspecto y la solidez son significativamente diferentes entre estos dos grupos y podrían servir como métodos para la diferenciación. Es interesante notar que los puntos más bajos del intervalo de la relación de aspecto para el grupo de tamaños medianos, ~ 0.61 , es significativamente más bajo que el punto similar para el grupo de los grandes, ~ 0.77 . Esta diferencia morfológica podría investigarse más a fondo.

Apéndice D (informativo) Mezcla de formas

D.1 Referencia

Las muestras evaluadas para este anexo fueron proporcionadas por el *National Center for Nanoscience and Technology* de Beijing, China y son similares al GSB 02-2994-2013, un Material de Referencia Certificado en China. Se utilizó una comparación interlaboratorio para desarrollar el esquema de trabajo para diferenciar las muestras [Grukke, 2018 a].

D.2 Antecedentes y objetivos del diseño

Las muestras fueron preparadas utilizando un proceso de síntesis mediante semillas; las nanopartículas resultantes de tal proceso con frecuencia incluyen pequeñas cantidades de partículas-semilla que no crecen de acuerdo a la teoría [Morita, 2009]. La Figura D.1 muestra el ejemplo de una micrografía de con nanobarras y otras formas que denominadas “nanocubos” para este documento. Típicamente las muestra de morfologías de nanobarras de oro afectan la residencia longitudinal de plasmones superficiales, así que sería conveniente eliminar las “no nano-barras” del producto final [Sharma, 2009]. Además, un número de partículas en esta micrografía están en contacto. Incluir estas partículas en contacto durante el análisis de datos puede distorsionar las distribuciones del descriptor en comparación con el conjunto de datos de los cuales se han eliminado tales partículas complejas [Rice, 2013]. Los usuarios con frecuencia desean métodos automatizados para identificar, analizar o eliminar partículas que no son de interés del conjunto de datos. Los hallazgos clave del estudio que se resumen aquí son: el método para identificar y separar las partículas en contacto (denominadas complejas) y el método para diferenciarlas entre morfologías muestrales, el cual fue usado para diferenciar dos muestras con diferentes atributos de rendimiento (Muestra 1 y Muestra 2).

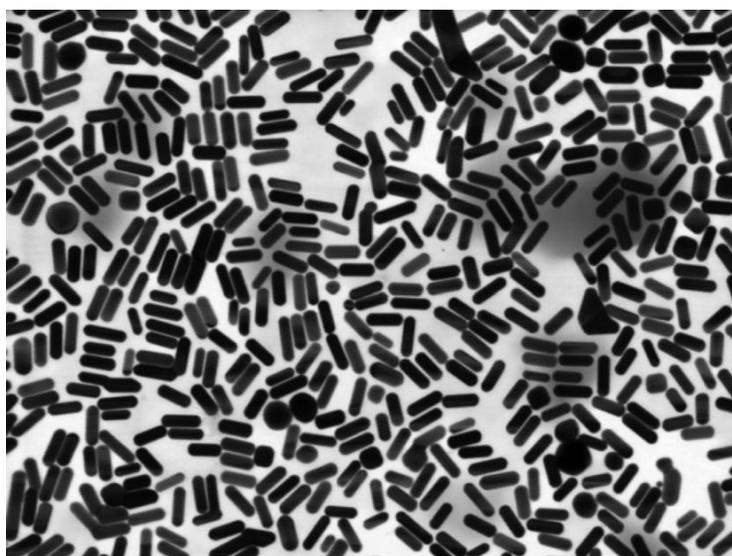


Figura D.1 Imagen STEM a alta densidad de nanobarras de oro coloidal. Cortesía del Physikalisch-Technische Bundesanstalt.

D.3 Aspectos relevantes

D.3.1 Método para identificar y separar complejos de partículas en contacto. Se desarrolló un método heurístico para identificar los descriptores y el intervalo de los descriptores que podrían diferenciar partículas en contacto, partículas discretas, nanobarras y nanocubos. La Figura D.2 muestra el contorno de las partículas de una cierta micrografía. Las 142 partículas en esta imagen fueron clasificadas como complejas, nanobarras discretas y nanocubos discretos. El análisis ANOVA de los datos de solidez (definición 3.4.17) sugirió que este descriptor podría diferenciar entre partículas complejas y discretas. El análisis ANOVA de los datos de relación de aspecto sugirió que este descriptor podría diferenciar entre nanobarras y nanocubos. La Figura D.3 muestra la gráfica de dos variables de solidez como una función de la relación de aspecto para los datos de la Figura D.2.

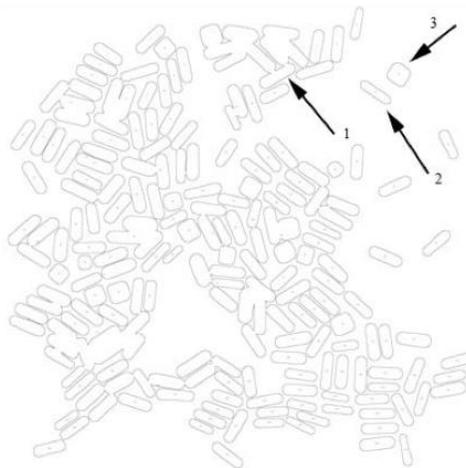


Figura D.2. Contorno mediante *ImageJ* de nanopartículas de oro sobre un soporte de TEM. Flecha 1 - partículas en contacto; flecha 2 - nanobarra discreta; flecha 3 - nanocubo discreto

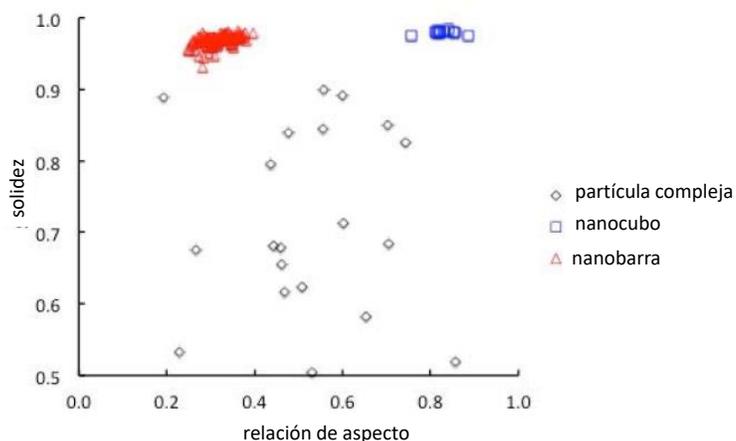


Figura D.3 – Gráfica de solidez vs. relación de aspecto. Datos de la Figura D.2

Las nanobarras y nanocubos discretos tienen una solidez mayor que 0.9, es decir, pocas irregularidades en sus contornos. Sin embargo, sus relaciones de aspecto son claramente distintas. Las relaciones de aspecto de las partículas que no son nanobarras están en el intervalo de 0.75 a 0.95, mientras que las nanobarras mismas tienen relaciones de aspecto menores que 0.5. Las partículas complejas, en contacto, tienen relaciones de aspecto de 0.2 a 0.85 pero la solidez de éstas fueron menores que 0.90. Las partículas complejas fueron eliminadas del conjunto de datos según los descriptores de solidez y reteniendo sólo las partículas discretas para el análisis. Los nanocubos fueron separados de las nanobarras de acuerdo a los valores de relación de aspecto y reteniendo sólo los datos de las nanobarras. Ya que los niveles de los nanocubos variaban de 1 % a 4% en todos los conjuntos de datos, no fue práctico desarrollar estadísticas sobre su morfología. Cantidades mucho más grandes de nanocubos serían necesarias para obtener imágenes útiles para estimar incertidumbres de medida significativas para estas formas.

D.3.2 Diferenciación de muestras de nanobarras

La Tabla D.1 muestra una comparación ANOVA de datos de comparación entre laboratorios para varios descriptores de tamaño y forma alargada. Es claro que las medias de tamaño o forma no pueden diferenciar las muestras. Sin embargo, las diferencias podrían encontrarse si se consideran las dispersiones de las distribuciones. La Figura D.4 compara las distribuciones acumuladas de la relación de aspecto para las Muestras 1 y 2 del Lab L3 [Gulke, 2018 a]. Las distribuciones tienen diferentes dispersiones, como se demuestra ya sea por el método de Kolmogorov-Smirnov, por gráficas de cuantiles o por las incertidumbres de medida. Los valores de gran promedio de las dispersiones de la relación de aspecto de las Muestras 1 y 2 son 0.0649 y 0.0406, respectivamente. Las incertidumbres de medida de estos valores son 5.7% y 3.0% respectivamente, así que aun considerando dos desviaciones estándar arriba y debajo de la media, queda claro que las dispersiones de la relación de aspecto son estadísticamente diferentes.

Tabla D.1 Valores p de la comparación del ANOVA de los descriptores para las Muestras 1 y 2 [Gulke, 2018 a].

Descriptor	Valores <i>p</i>	
	Media	Dispersión
Feret	0.786	<0.001
minFerret	0.384	0.0188
Relación de aspecto	0.096	<0.001
Compacidad	0.776	<0.001

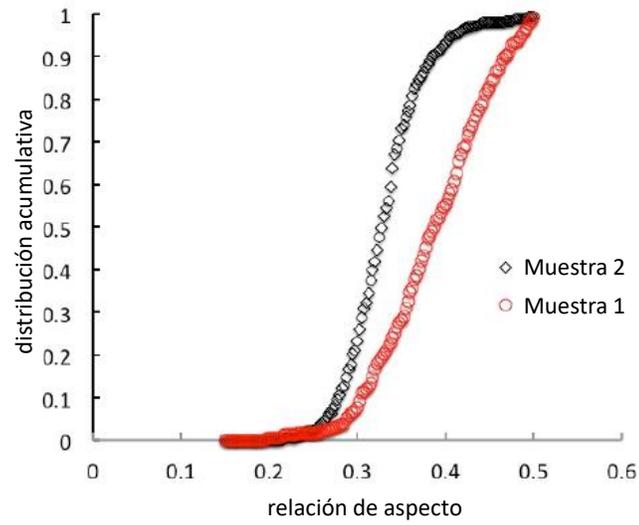


Figura D.4 – Distribuciones acumulativas de la relación de aspecto, Muestras 1 y 2, Lab 3 [Gulke, 2018 a].

Apéndice E (informativo) Agregados amorfos

E.1. La referencia

El negro de carbono es un material ampliamente utilizado en la industria, que consiste de agregados aciniformes –grupos de agregados de partículas semejanado racimos de uvas-. La distribución de tamaño del agregado y su morfología a menudo se utilizan para seleccionar negros de carbono para aplicaciones específicas. La muestra para este estudio se denomina SRB8 –véase la Figura E.1- y fue proporcionada por *Cabot Corporation*, una referencia de ASTM para negro de carbono, para una comparación entre laboratorios sobre agregados de negro de carbono [Gulke, 2018 b].

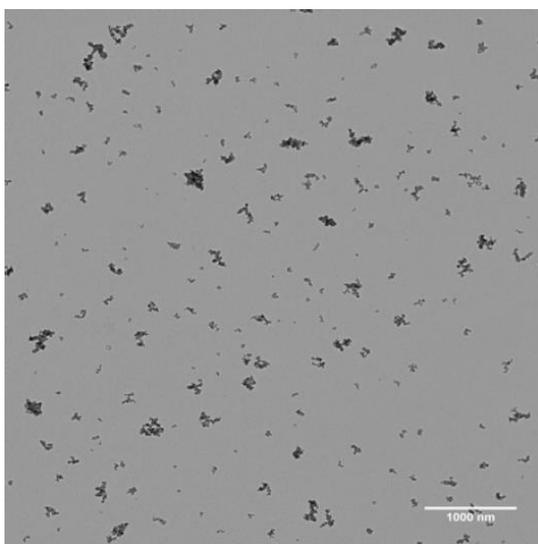


Figura E.1. Muestra de negro de carbono aciniforme, SRB8, utilizada en este estudio.

E.2. Antecedentes y objetivo

Como es notable en la Figura E.1, los agregados de este negro de carbono presentan una gran diversidad de formas, que se han categorizado como esferoidales, elipsoidales, ramificadas y lineales [Shishido, 2007], [Ono, 2012]. La norma [ASTM D3849] utiliza para su análisis dos descriptores de los agregados: su perímetro y su área. Estos descriptores constituyen la base para los seis parámetros que se derivan: el diámetro del agregado equivalente en área, el factor de agregación, el tamaño promedio de partícula de un solo agregado, el volumen del agregado, el volumen de la partícula y el número de partículas en el agregado. En ejercicios previos de comparación entre laboratorios se encontraron inconsistencias entre los resultados, los cuales pudieron deberse a los descriptores asociados al perímetro del agregado. En razón de la estructura fractal de los agregados, las mediciones de su perímetro son mucho más sensibles a la resolución de la imagen que las de su área. Por tanto, algunas inquietudes de la comunidad interesada en el negro de carbono incluyen la interpretación de la repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones de tamaño y forma, y el impacto de las diferentes formas de los agregados sobre las distribuciones de los descriptores.

E.3 Aspectos relevantes

E.3.1 Incertidumbre de medida de los descriptores de los agregados de negro de carbono

Se calcularon las incertidumbres de medida de la media y la dispersión, como parámetros de los modelos de referencia ajustados a la distribución de los datos. La Tabla E.1 muestra los estimados de las incertidumbres de medida de los descriptores convencionales de tamaño y forma, además de las asociadas a los descriptores de la ASTM D3849 (estos descriptores pueden utilizarse para el área proyectada con base en escalamiento fractal). Los modelos log normal resultaron en menores incertidumbres de medida para descriptores de tamaño, en tanto que los descriptores de forma elongacional y de rugosidad se ajustaron mejor a modelos normales. Las incertidumbres de medida de las medias son menores a 5 %, con excepción del perímetro.

El diámetro equivalente en área, D_{eA} , presenta la incertidumbre de medida más baja entre las de media de tamaño, lo cual la confirma como una elección adecuada para describir el tamaño de agregados de negro de carbono. Las medias del parámetro elongacional tienen incertidumbres de medida menores que el 4 %. El parámetro de la media de la solidez exhibe incertidumbres de medida menores que 7 %. Los descriptores de las medias derivados de ASTM D3849 presentan incertidumbres de medida de 13 % y mayores; estos descriptores no podrían considerarse como base sólida como descriptores de correlaciones, tales como aparecen en el análisis fractal.

Tabla E.1. Grandes medias y grandes dispersiones de los descriptores de agregados de negro de carbono [Gruke, 2018 b]. Los modelos se indican con LN el log normal y con N el normal. Los valores entre corchetes representan el mejor estimado del parámetro en unidades de longitud, área o cuenta, como corresponda.

Descriptor	Modelo	Media	Dispersión	U_{ILC} de la media	U_{ILC} de la dispersión
Tamaño					
Área / [nm ²]	LN	7.72 [2310]	1.04	4.5 %	8.8 %
Perímetro/[nm]	LN	5.52 [249]	0.696	9.1 %	29 %
Feret / nm	LN	4.39 [80.9]	0.586	3.6 %	6.5 %
minFeret/ [nm]	LN	3.94 [51.5]	0.570	4.4 %	6.2 %
D_{eA} / [nm]	LN	3.97 [52.9]	0.552	1,6 %	8.8 %
Elongación					
Relación de aspecto	N	0.642	0.133	2.6 %	7.1 %
Compacidad	N	0.673	0.0098	3.2 %	15 %
Rugosidad					
Circularidad	N	0.485	0.212	23 %	17 %
Solidez	N	0.766	0.112	6.4 %	18 %
ASTM D3849					
D_p / [nm]	LN	2.89 [18.1]	0.465	13 %	27 %
V_p / [nm ³]	LN	8.03 [3077]	1.37	14 %	27 %
N / [l]	LN	2.87 [17.6]	1.70	31 %	9.3 %

NOTA EXPLICATIVA 1: En el modelo log normal los valores de los parámetros –por ejemplo y – están expresados en forma logarítmica, por lo que sus valores en las unidades habituales se calculan como $\exp(y)$.

NOTA EXPLICATIVA 2: Los valores de las incertidumbres de medida se han redondeado para que sólo tengan dos cifras significativas, como está recomendado.

E.3.2. Rearreglo de las distribuciones utilizando cuatro poblaciones de forma de los agregados

Los conjuntos de datos de los agregados pueden deconvolucionarse, esto es separar los efectos de las distintas variables, utilizando el proceso descrito en [Grukke, 2018 b], [Shishido, 2007]. Una vez categorizados los datos en esféricas, elipsoidales, ramificados y lineales, las distribuciones de los descriptores pueden reconstruirse de las varias componentes de las formas de agregados. Las figuras E.2 y E.3 muestran la reconstrucción del diámetro de Feret y de la relación de aspecto a partir de las poblaciones de forma de los agregados. El pico principal de la distribución de diámetro de Feret está asociado a sus agregados elipsoidales. La distribución de relación de aspecto es multimodal. Los agregados lineales contribuyen de forma preponderante a las altas razones de aspecto. La deconvolución de distribuciones por forma puede ofrecer información valiosa sobre el negro de carbono específico bajo estudio.

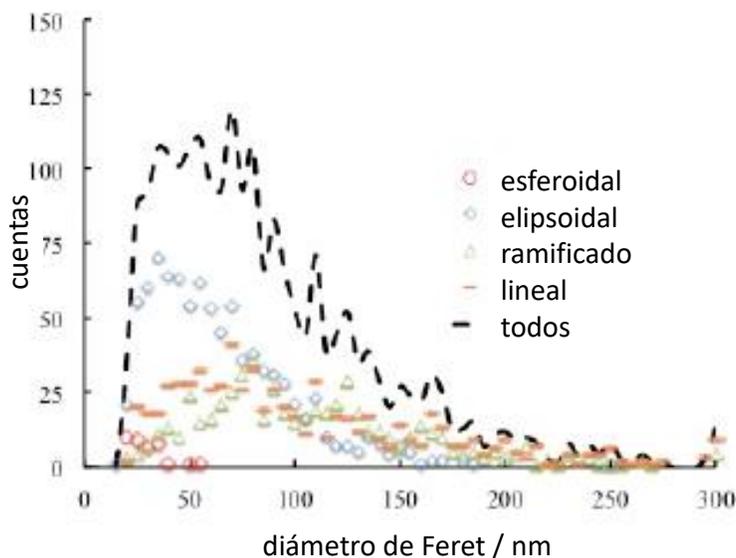


Figura E.2. Contribuciones de las distribuciones de agregados esféricos, elipsoidales, ramificados y lineales a la distribución de diámetro de Feret.

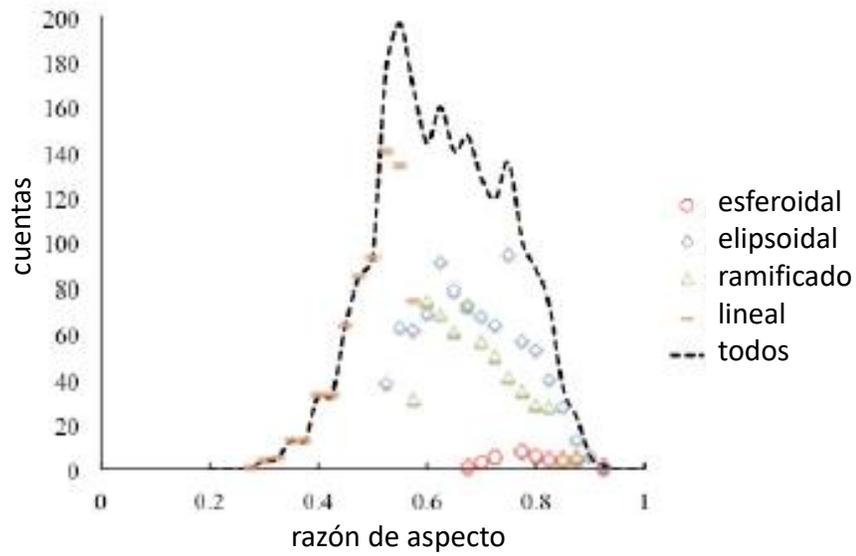


Figura E.3. Contribuciones de las distribuciones de agregados esferoidales, elipsoidales, ramificados y lineales a la distribución de relación de aspecto.

Apéndice F (informativo) Agregados nanocrystalinos

F.1. La referencia

Se tomó una muestra comercial de dióxido de titanio en polvo (MT-500BW, rutilo) de Tayca [Grulke, 2017]. La Figura F.1 muestra agregados típicos y un acercamiento a los agregados de cristalitos.

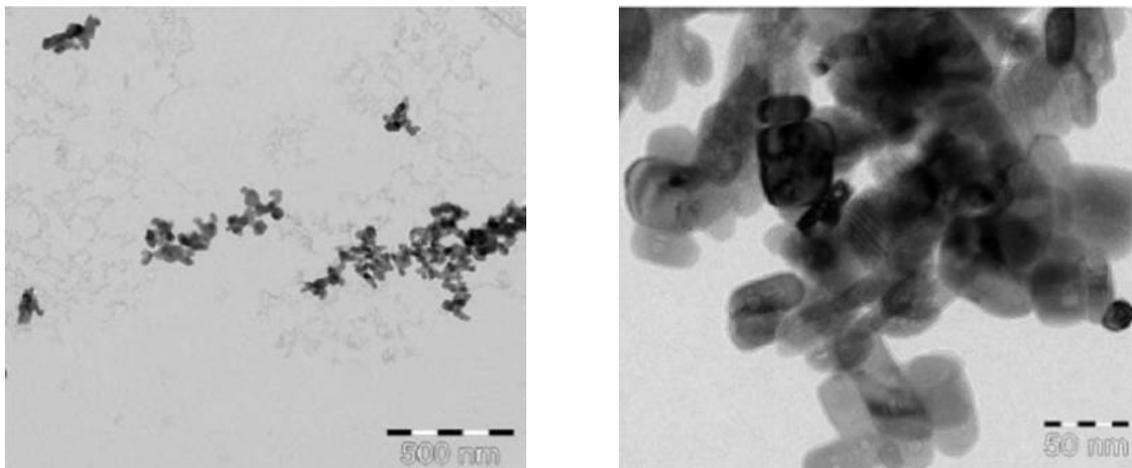


Figura F.1. Dispersión acuosa de titania secada sobre un soporte de TEM.

F.2 Antecedentes y objetivo

En algunas aplicaciones recientes se encuentra la titania ligada a tamaños de cristalitos primarios. En este caso, se utiliza la discriminación manual de los nanocrystalitos para determinar su distribución de tamaño. Considerando que el término partícula primaria se ha utilizado para describir elementos individuales fundidos para formar agregados de titania [Pratsinis, 1996], el término “cristalito primario” es un término más preciso pues se encuentran fronteras de grano entre éstos [Albers, 2015]. En la literatura [Grulke, 2017] se encuentran detalles sobre la discriminación manual.

F.3 Aspectos relevantes

F.3.1 Variables de influencia en la calidad de los datos de cristalitos

En el protocolo se evaluó la influencia de siete factores sobre la calidad de los datos: laboratorio, tipo de instrumento, número de partículas reportado, número de micrografías reportado, método de calibración, resolución –estimada en pixels por nm-, y software de análisis de las imágenes. Para los descriptores de tamaño D_{eA} y diámetro de Feret, la aplicación de ANOVA a los métodos de calibración resultó en un valor- p mayor que 0.05, lo cual sugiere que el método de calibración no afectó la calidad de los datos de estos descriptores en la ILC. Similarmente, el software utilizado para procesar las imágenes no afectó el Feret, el minFeret, el D_{eA} y las variables de relación de aspecto. Para todos los descriptores de tamaño, los valores obtenidos para TEM fueron mayores que los de STEM –con diferencias en el rango 4 % a 7 %-. El resto de los factores dependieron de los laboratorios específicos y no fue posible discriminar sus efectos específicos.

F.3.2 Descriptores de tamaño de cristalitas primarios según el modelo log normal
Entre los resultados destaca que para los descriptores de tamaño de nanocristalitos de titania las distribuciones log normal los modelan mejor que las distribuciones normales. La Tabla F.1 muestra los valores de media y dispersión de cada distribución de los datos de D_{eA} . Los parámetros de media y dispersión ajustados a distribuciones normales muestran incertidumbres de medida de 22 % y 31 % respectivamente. En contraste, Los parámetros de media y dispersión ajustados a distribuciones log normal muestran incertidumbres de medida de 9.5 % y 22 % respectivamente. El modelo log normal será preferible en tanto la U_{ILC} sea menor que la mitad de aquélla para el modelo normal.

Tabla F.1. Incertidumbres de medida del parámetro D_{eA} ajustado a distribuciones normal y log normal.

	D_{eA} / nm (normal)		D_{eA} / nm (log normal)	
	media	dispersión	media	dispersión
Gran promedio ILC	39.8	12.9	3.58	0.318
Gran desviación estándar ILC	4.12	1.88	0.161	0.033
C_v / %	10.3 %	14.6 %	4.49 %	10.5 %
U_{ILC} %	31 %	31 %	9.5 %	22 %

Visualización complementaria de datos

La distribución normal o la de Weibull puede utilizarse para ajustar los datos de relación de aspecto. La Figura F.2 muestra que la distribución de relación de aspecto para el Laboratorio 1 es multimodal.

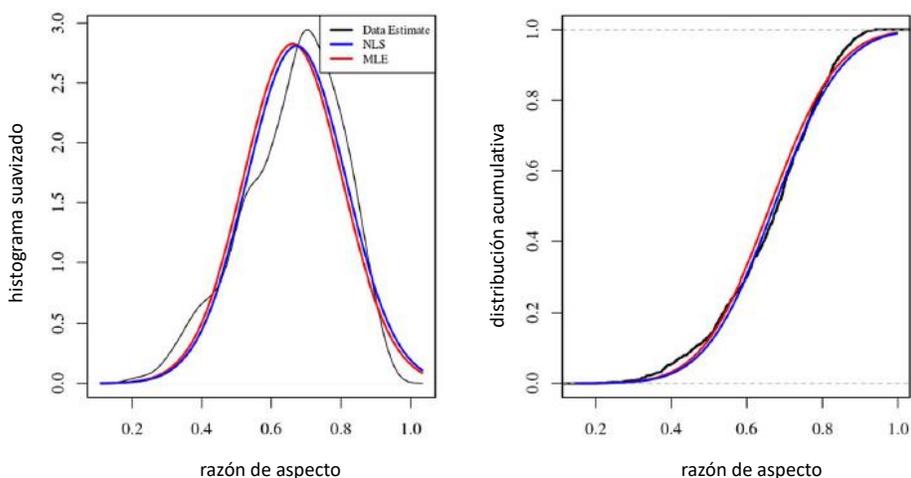


Figura F.2. Distribuciones de densidad y acumulativa de la relación de aspecto para el Laboratorio 1. Los datos (negro) contrastan con el ajuste por regresión no lineal, NLS (azul), y por máxima verosimilitud, MLE (rojo).

Estos datos pueden ajustarse un modelo bimodal, lo cual requiere cinco parámetros. La Figura F.3 muestra la gráfica de residuales del ajuste a los modelos normal monomodal, Weibull monomodal, y Weibull bimodal, de los datos de relación de aspecto. Los datos de este Laboratorio, la gráfica de residuales sugiere la preferencia del modelo Weibull sobre el normal y que la Weibull bimodal ajusta los datos en un intervalo mucho más amplio. El valor medio se indica con una línea roja vertical. Los modelos Weibull monomodal y bimodal se acercan más a los datos que los otros modelos en un intervalo amplio.

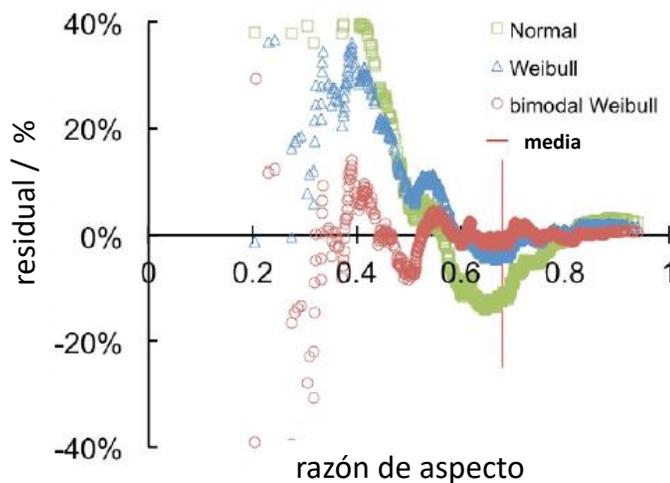


Figura F.3. Residuales de ajustes de datos de relación de aspecto del Lab 1 al modelo normal (cuadros verdes), Weibull monomodal (triángulos azules) y Weibull bimodal (círculos rojos). La vertical roja indica el valor de la media.

Apéndice G (informativo) Partículas de baja relación de aspecto

G.1 La referencia

Se tomaron muestras de nanocristales de celulosa (CNC) suministradas por el *National Research Council of Canada*, basadas en el material de referencia certificado CNCD-1 [NRC, 2018]. Todos los procedimientos se desarrollaron y probados por el propio proveedor [Jakubek, 2018]; algunas muestras pueden adquirirse comercialmente [Reid, 2017].

G.2 Antecedentes y objetivo

Este material comercial (*CelluForce Inc.*, Windsor QC) se produjo mediante hidrólisis con ácido sulfúrico de pulpa de madera suave purificada por neutralización, intercambio de sodio, purificación y secado por aspersión. Se ha reportado otros CNC sulfatados con razones largo/ancho de 11 a 12 [Moon, 2011], los cuales corresponden a razones de aspecto entre 0.083 y 0.091. Como las regiones de celulosa amorfa son degradadas durante la hidrólisis [Salas, 2014], las nanopartículas pueden ser muy cristalinas con módulo axial alto y rigidez de cristal [Muhd Julkapli, 2017]. Las aplicaciones de CNC están ligadas a sus distribuciones de tamaño y forma (relación de aspecto), morfología cilíndrica, rigidez y grupos superficiales [Salas, 2014]. Por ejemplo, los grupos superficiales cargados negativamente pueden dar lugar a suspensiones acuosas coloidales estables [Jakubek, 2018].

Las CNCs tienden a aglomerarse en dispersión acuosa, creando complejos de partículas en contacto que son difíciles de separar en fibrillas individuales vía técnicas automatizadas. La Figura G.1 muestra una imagen de TEM de CNCs de la muestra en forma de huso y de barra. Las muestras fueron teñidas en la rejilla con una solución de acetato de uranilo al 2 % [Jakubek, 2018]. Medir las distribuciones de tamaño y de forma de las CNCs es demandante pues sus formas son irregulares y presentan distribuciones con alta dispersión. La partícula A parece bifurcada, la partícula B es un aglomerado de dos partículas, la partícula C es una partícula discreta que puede ser una fibrilla elemental [Moon, 2011]. Como el contraste entre el fondo y la partícula es bajo, las imágenes se analizaron mediante tres métodos: 1) un software ImageJ macro, 2) por trazado manual de la imagen utilizando la herramienta polígono de ImageJ, y 3) por trazado manual de la imagen sin utilizar herramientas de ImageJ. Con el software ImageJ macro, se midió la longitud en una línea recta entre los puntos más alejados y el ancho lo fue en el punto medio de su longitud. Si la partícula era particularmente asimétrica, su ancho se midió en el punto de mayor amplitud [Jakubek, 2018]. La herramienta polígono –método 2- se utilizó haciendo una imagen binaria en tanto que la herramienta de trazo libre –método 3- pudo utilizarse sobre la imagen en el estado en que se recibió.

Como las relaciones de aspecto son del orden de 0.10, cada método requirió amplificar la imagen por un factor de cuatro a fin de mejorar las mediciones de minFerret/ancho.

El propósito principal del estudio fue abordar aspectos de calidad de los datos mediante la realización de mediciones de ancho y longitud de sólidos de baja relación de aspecto, por lo tanto, sólo se analizaron partículas que pudieron identificarse claramente como discretas –tipo C en la Figura G.1-.

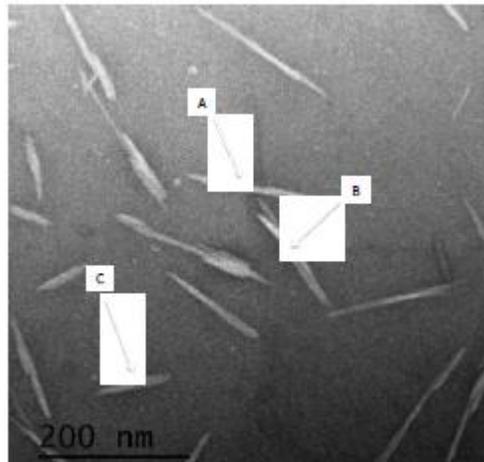


Figura G.1. Partículas cristalinas de nanocelulosa, cortesía del NRC Canadá. Partícula A – posible CNC agregada o aglomerada; partícula B – aglomerado de dos partículas discretas CNC, partícula C – partícula CNC discreta.

G.3 Aspectos relevantes

Las aplicaciones presentes y futuras de las CNCs tienen como base sus distribuciones de tamaño, forma elongacional y rugosidad. El método de análisis 1 aborda las dos primeras pero no la irregularidad de la superficie. Los métodos 2 y 3 requieren trazado manual, en el cual las diferencias por operario pueden dar lugar a una pobre reproducibilidad. Por tanto, solamente se consideraron tres descriptores: el diámetro de Feret –que corresponde a su longitud-, el diámetro mínimo de Feret –correspondiente al ancho-, y la relación de aspecto. Como parte del análisis de los datos, se evaluaron la repetibilidad y reproducibilidad en dos de los laboratorios. El diámetro de Feret presentó la mejor repetibilidad, en tanto el diámetro mínimo de Feret y la relación de aspecto tienen reproducibilidades más bajas. Es posible aprovechar la morfología cilíndrica de este MRC para mejorar las incertidumbres de medida.

G.3.1 Calidad de los datos

El descriptor de la repetibilidad se evaluó comparando el descriptor de la media de cada imagen con la gran media de todas las imágenes. El Laboratorio 1 aplicó el método 1 con dos operarios diferentes, con el operario 1 a todas las imágenes, y al operador 2 a un subconjunto del total de imágenes. El Laboratorio 2 aplicó los métodos 2 y 3 al mismo subconjunto de imágenes. Los resultados se muestran en la tabla G.1. La segunda columna de la tabla G.1 muestra el número de imágenes analizadas y el número total de nanopartículas reportadas. Las columnas 3 a 5 muestran los valores- p obtenidos de ANOVA al conjunto de datos y el número de imágenes cuyas medias son diferentes de la gran media. Todos los conjuntos de datos muestran una alta repetibilidad, $p > 0.05$, del diámetro de Feret. Ninguno de los conjuntos de datos demuestra alta repetibilidad para el diámetro mínimo de Feret. Dos de los cuatro conjuntos de datos muestran buena repetibilidad para la relación de aspecto.

Los valores- p pueden utilizarse para cuantificar la calidad de los datos, valores mayores indican mejor calidad. Es conocido que la incertidumbre de la medida depende del número de partículas como $(1/n)^{1/2}$.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: Esta dependencia considera el hábito de estimar la dispersión como la desviación estándar de la media.

Los valores- p para ambos laboratorios aumentaron al aumentar el número de partículas, a pesar de los cambios de operario en el Lab 1 y el cambio de método por el Lab 2. Además, con el incremento del número de partículas analizadas, los datos de ambos laboratorios mostraron buena repetibilidad en el descriptor de relación de aspecto. No obstante, no se observa una tendencia consistente del descriptor de minFeret, lo que sugiere la presencia de otros retos de medición al respecto. Una baja repetibilidad de un descriptor en un conjunto de datos puede dar lugar a baja reproducibilidad de ese descriptor en múltiples conjuntos de datos.

Tabla G.1. Descriptor de repetibilidad. Los resultados con valores- $p > 0.05$ obtenidos de ANOVA se muestran en negritas y subrayados.

Conjunto de datos	No. de imágenes analizadas; No. de partículas reportadas	resultados obtenidos de ANOVA; No. de imágenes con medias diferentes a la gran media		
		Feret	minFeret	relación de aspecto
Lab 1, método 1, operario 1	112; 597	<u>0.501</u> ; 7	5 E-8; 16	<u>0.331</u> ; 8
Lab 1, método 1, operario 2	40; 106	<u>0.307</u> ; 2	0.002; 3	0.011; 5
Lab 2, método 2	40; 102	<u>0.248</u> ; 3	3 E-5; 3	0.021; 2
Lab 2, método 3	40; 233	<u>0.624</u> ; 2	0.010; 3	<u>0.453</u> ; 1

G.3.2. Distribuciones de descriptores

Se encuentra que los dos descriptores de tamaño se representan mejor por distribuciones log normal, las cuales resultaron en los menores coeficientes de variación de los parámetros ajustados. Las distribuciones normales resultaron en valores estadísticamente diferentes de las distribuciones de la media y la dispersión cuando se comparan con la media aritmética y la desviación estándar respectivamente.

Los análisis K-S pueden utilizarse para determinar si dos distribuciones acumulativas empíricas son diferentes [Grulke, 2018 a], [Jakubek, 2018]. Para cuatro conjuntos de datos se cuenta con seis pares de descriptores para evaluar. Los datos de cada descriptor de un conjunto de datos se comprimieron a una distribución con 100 puntos y se calculó la diferencia entre ambas distribuciones, $D_{n,m}$, para cada valor del descriptor. Si $|D_{n,m}| > Sup$ K-S, para muchos puntos del par, entonces se considera que las dos distribuciones son distintas. La Figura G.2 muestra las distribuciones cumulativas de los descriptores de Feret de los cuatro conjuntos de datos de la Tabla G.1.

NOTA EXPLICATIVA NACIONAL: El símbolo "Sup" indica el supremo de un conjunto de valores, esto es, la mínima de las cotas superiores de ese conjunto.

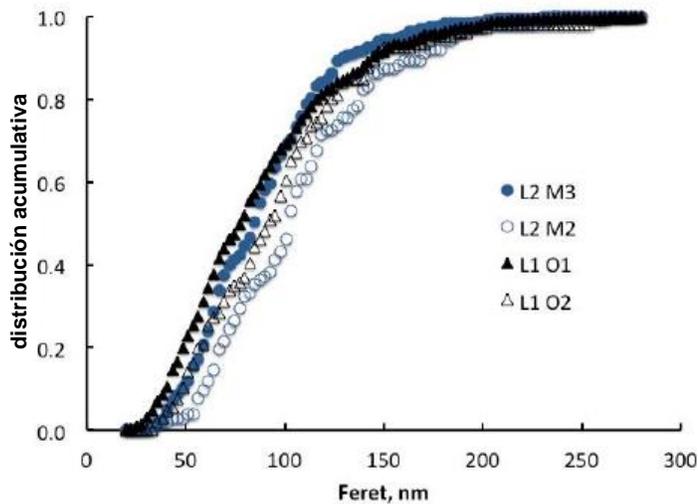


Figura G.2. Distribuciones para el descriptor de Feret de los datos en la Tabla G.1. L indica el laboratorio, M el método y O el operario.

La Tabla G.2 muestra los valores del *Sup K-S* para los seis pares de los cuatro conjuntos de datos. Respecto a los descriptores de Feret, dos de los conjuntos de datos parecen ser diferentes, es decir el *Sup K-S* del par es excedido significativamente por la diferencia entre las distribuciones acumulativas correspondientes. Estos conjuntos de datos son el L1 O1 vs. L2 M2 y L2 M2 vs. L2 M3.

Tabla G.2. Valores del *Sup K-S* y fracción del número de puntos para los cuales el estadístico K-S excede el *Sup K-S*, en los seis pares de conjuntos de datos.

	L1 O1 vs L1 O2	L1 O1 vs L2 M2	L1 O1 vs L2 M3	L1 O2 vs L2 M2	L1 O2 vs L2 M3	L2 M2 vs L2 M3
<i>Sup K-S</i>	0.143	0.146	0.105	0.189	0.159	0.162
Feret	2 %	25 %	1 %	0 %	0 %	9 %
minFeret	0 %	37 %	40 %	29 %	43 %	0 %
relación de aspecto	0 %	3 %	42 %	10 %	41 %	13 %

La Figura G.3 muestra los gráficos de las diferencias en las distribuciones acumulativas, $D_{n,m}$, en términos del diámetro de Feret para los cuatro conjuntos de datos que parecen similares. Indica los puntos ligeramente fuera del valor del *Sup K-S*.

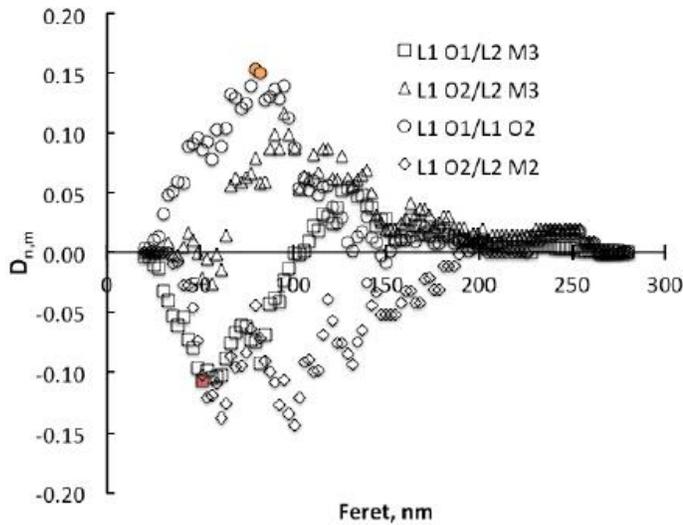


Figura G.3. Gráfica de $D_{n,m}$ contra Feret para los cuatro conjuntos de datos que parecen similares. Uno de los puntos excede el *Sup* K-S del par L1 O1 – L2 M3; dos puntos exceden el *Sup* K-S del par L1 O1 – L1 O2. Cabe notar que la ordenada en el gráfico es $D_{n,m}$, y no $|D_{n,m}|$.

Los datos de minFeret de cada laboratorio presentan repetibilidad, pero no reproducibilidad entre los laboratorios, véase Figura G.4. Se cree que dos factores son la causa de esta diferencia: la selección de diferentes partículas para medir en los laboratorios y la diferencia en la identificación de los bordes de las partículas.

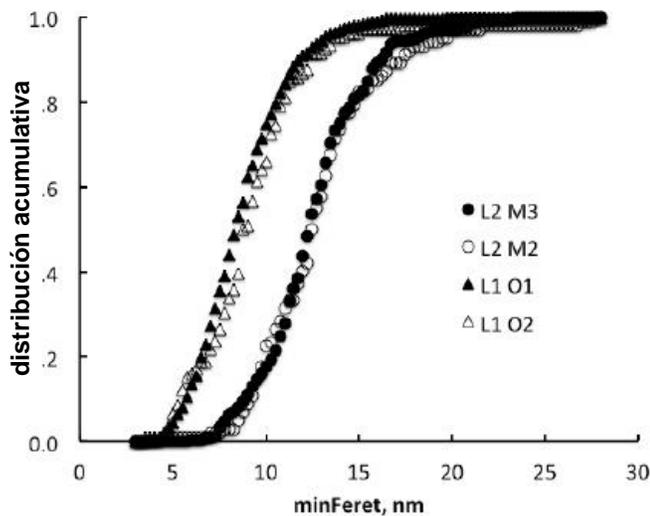


Figura G.4. Distribuciones acumulativas para el minFeret. Cabe notar la alta repetibilidad en cada laboratorio, por separado.

Apéndice H (informativo) Nanopartículas con hábitos cristalinos específicos

H.1 Propósito

Los nanomateriales cristalinos pueden presentar morfologías cristalinas tridimensionales específicas, o hábitos cristalinos específicos. Recientemente se ha mostrado que las mediciones de las distribuciones del tamaño y la forma son más demandantes cuando las nanopartículas no son esferoidales [Babick, 2016], [Gruke, 2017]. Estos materiales podrían considerarse como materiales de referencia certificados –MRC- para tamaño y forma. Este apéndice presenta ejemplos de datos de tamaño y forma para tales materiales obtenidos por microscopía de electrones.

H.2 Detalles y antecedentes del dióxido de titanio bipiramidal, como ejemplo.

Se eligió para este estudio el dióxido de titanio, TiO_2 , también denominado titania. La muestra se produjo mediante síntesis hidrotérmica a escala de laboratorio, en fase de anatasa pura sin recubrimientos [Lavric, 2017]. La Figura H.1 es una imagen de TEM de las nanopartículas preparadas sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono, después de haber dispersado 2 mg de polvo de TiO_2 en 20 mL de $HClO_4$ y 5 min de tratamiento ultrasónico. Se colocaron 2 μL de la suspensión líquida sobre la rejilla del TEM removiendo el líquido excedente con papel absorbente pasado 1 min. El recuadro en la figura H.1 muestra el hábito cristalino de la titania bipiramidal truncada. Los laboratorios reportaron hasta 500 partículas con valores de redondez -definición 3.4.16- menores de 0.7. Esta restricción se determinó ensayando varios escenarios ligados a la suposición básica de que la forma de la titania bipiramidal sobre el soporte presentaba una clara desviación respecto a círculos perfectos, para los cuales la redondez es la unidad.

Se reportan los datos de la comparación entre laboratorios (ILC) organizada por el BAM -*Bundesanstalt für Materialforschung und-prüfung*- bajo los criterios de [VAMAS, 2001]. El BAM suministró a cada laboratorio 2 rejillas de TEM –preparadas del mismo lote de producción-, así como protocolos para la captura de las imágenes y el análisis de los mismos. Este apéndice aborda cuatro retos de medición: la selección de modelos de referencia para el tamaño –diámetro de Feret y diámetro mínimo de Feret- y descriptores de forma –relación de aspecto-, incertidumbre de la medida de los parámetros ajustados según los modelos, distribuciones de tamaño y de forma determinadas con tres instrumentos –TEM, STEM en SEM y miniTEM-, distribuciones de tamaño y forma para partículas específicas en la misma imagen medidas por diferentes usuarios, y comparación de los datos para una rejilla seleccionada probada varias veces.

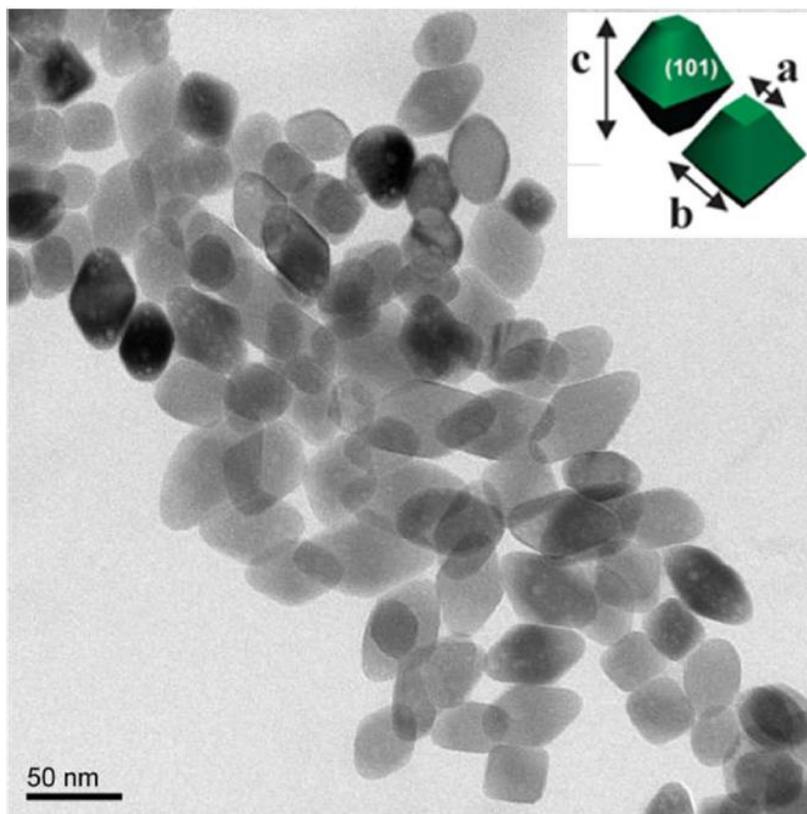


Figura H.1. Imagen de TEM de nanopartículas bipiramidales de titanio preparadas sobre una rejilla de TEM de cobre recubierta con carbono. Imagen utilizada con permiso del BAM.

H.3 Análisis de los datos

H.3.1 Modelos de referencia e incertidumbre de los descriptores de tamaño y de forma

Los reportes actuales de certificación se apoyan en los promedios aritméticos de descriptores específicos y sus desviaciones estándar para estimar las incertidumbres de medida asociadas a la muestra, [23] y [24]. Esta sección muestra los ajustes de modelos de referencia normal y log-normal a las distribuciones de Feret, de F_{min} y de relación de aspecto. Con frecuencia los modelos log-normal presentan mejores representaciones que los modelos normales. La Figura H.2 muestra los ajustes a ambos modelos de los resultados de Feret del Lab 15.

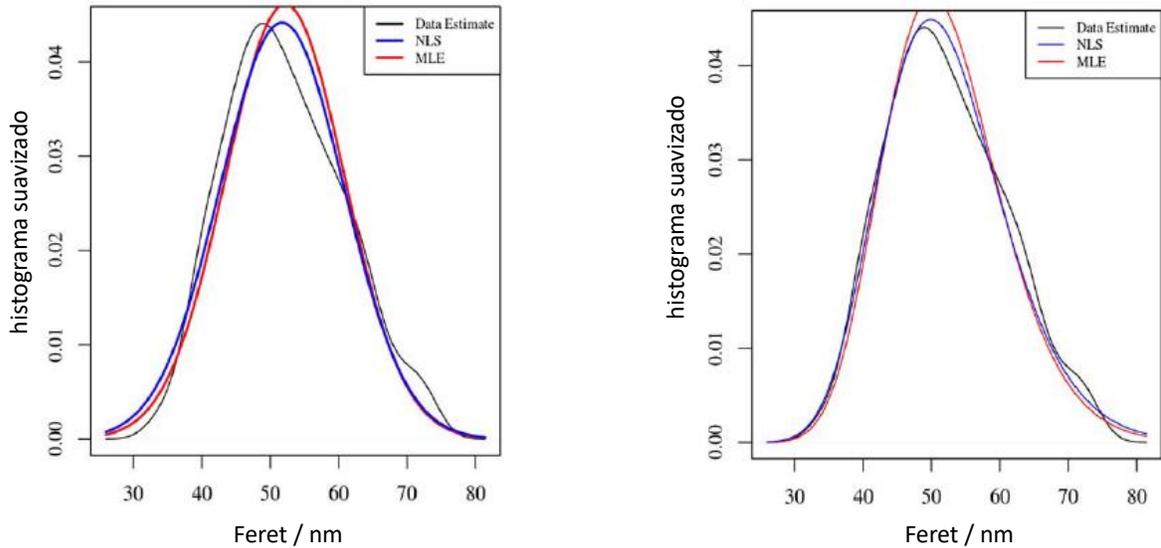


Figura H.2 Datos de Feret del Lab 15 ajustados con modelos norma (izquierda) y log-normal (derecha). Curva negra – datos, curva azul – regresión no-lineal (NLS), curva roja – máxima verosimilitud (MLE).

La distribución de Feret es multimodal, particularmente para valores mayores que la media. El modelo log-normal ofrece una mejor aproximación visual a los datos suavizados, particularmente cerca del pico de la distribución de densidad. Los histogramas correspondientes para F_{\min} -Figura H.3, izquierda- muestran que el modelo log-normal es también visualmente preferido para este descriptor. Es preferible el modelo normal para la distribución de relación de aspecto -Figura H.3, derecha- dadas las mayores incertidumbres de los parámetros ajustados por log-normal y por Weibull.

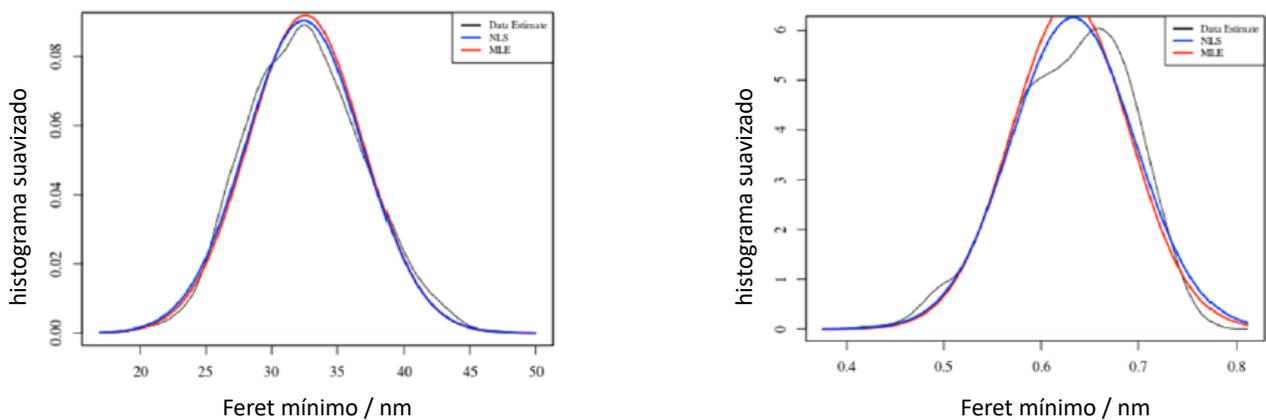


Figura H.3. Histogramas suavizados de los descriptores de Feret mínimo y de relación de aspecto del Lab 15. Izquierda - Feret mínimo (log-normal), derecha – relación de aspecto (normal). Curva negra – datos, curva azul – regresión no-lineal (NLS), curva roja – máxima verosimilitud (MLE).

La Tabla H.1 muestra los parámetros ajustados para los descriptores de las distribuciones de Feret, Feret mínimo y relación de aspecto de 14 de los laboratorios. Los datos están

ordenadas de acuerdo al tipo de instrumento. Los parámetros de Feret muestran incertidumbres de 3.38 % y 18.5 % para la media y la dispersión respectivamente. Las incertidumbres para la media y la dispersión de Feret mínimo son 2.56 % y 24.3 % respectivamente. Las incertidumbres para la media y la dispersión de la relación de aspecto, en el modelo normal, son 10.2 % y 19.7 %. Para fines de comparación, la Tabla H2 muestra las incertidumbres para los mismos descriptores con el modelo normal. No obstante, las incertidumbres para la dispersión son similares en ambos modelos. Por tanto, los descriptores de tamaño, Feret y Feret mínimo se modelan mejor con log-normal. El promedio y la desviación estándar globales de los descriptores de Feret son 52.4 ± 8.9 nm, en tanto que para el Feret mínimo son 32.9 ± 9.5 nm. Estos valores son muy similares a los parámetros ajustados que se muestran como los promedios por renglón en la Tabla H2.

Tabla H.1. Parámetros ajustados para Feret, Feret mínimo y relación de aspecto según el modelo.

Lab	Tipo	log-normal		log-normal		normal	
		Feret		Feret mínimo		relación de aspecto	
		media	dispersión	media	dispersión	media	dispersión
1a	TSEM	3.924	0.1706	3.492	0.1127	0.6520	0.0619
3	TSEM	3.895	0.2097	3.468	0.1802	0.6563	0.668
6	TSEM	3.772	0.1760	3.393	0.1197	0.6853	0.0519
9 ^a	miniTEM	3.927	0.1804	3.531	0.1361	0.6638	0.0584
9b	miniTEM	3.973	0.2001	3.531	0.1391	0.6429	0.0678
18 ^a	TEM	3.990	0.1524	3.509	0.1267	0.6251	0.0576
18b	TEM	3.879	0.1694	3.442	0.1330	0.6529	0.0656
15	TEM	3.941	0.1754	3.477	0.1366	0.6329	0.0638
10	TEM	3.961	0.1712	3.504	0.1311	0.6371	0.0769
17	TEM	3.927	0.1899	3.499	0.1440	0.5477	0.0635
11 ^a	TEM	3.852	0.1945	3.424	0.1450	0.6569	0.0654
11b	TEM	3.929	0.1890	3.490	0.1493	0.6507	0.0680
14	TEM	3.997	0.1562	3.535	0.1269	0.6344	0.0578
18c	TEM	4.017	0.1880	3.528	0.1293	0.6196	0.0672
Promedio		3.93	0.180	3.49	0.136	0.640	0.064
Desv estándar		0.0641	0.0161	0.0431	0.0160	0.0314	0.0061
C _v %		1.63	8.95	1.24	11.7	4.91	9.54
U _{ILC} %		3.38	18.5	2.56	24.3	10.2	19.7

Tabla H.2. Estadísticos de los parámetros ajustados a modelos normales de descriptores de distribuciones de todos los laboratorios en la Tabla H.1.

estadístico	normal			
	Feret		Feret mínimo	
	media	dispersión	media	dispersión
promedio	51.2	9.13	32.8	4.45
desv estándar	3.19	0.900	1.35	0.538
C _v %	6.24	9.86	8.54	12.1
U _{ILC} %	12.9	20.4	8.54	25.0

H.3.2 Comparaciones de datos obtenidos mediante tres tipos de instrumentos: TEM, STEM y miniTEM.

La Tabla H.1 incluye datos obtenidos mediante TEM, STEM y miniTEM. Se utilizó el ANOVA para decidir si las medias de esos conjuntos de datos eran similares a la gran media de los descriptores del conjunto completo. La Figura H.4 muestra la gráfica de cajas para esos conjuntos de datos. El valor-p para este conjunto de instrumentos es menor a 0.5, lo que se interpreta como que las medias de los conjuntos de datos individuales son distintos a la gran media. Las situaciones para Feret y Feret mínimo son similares.

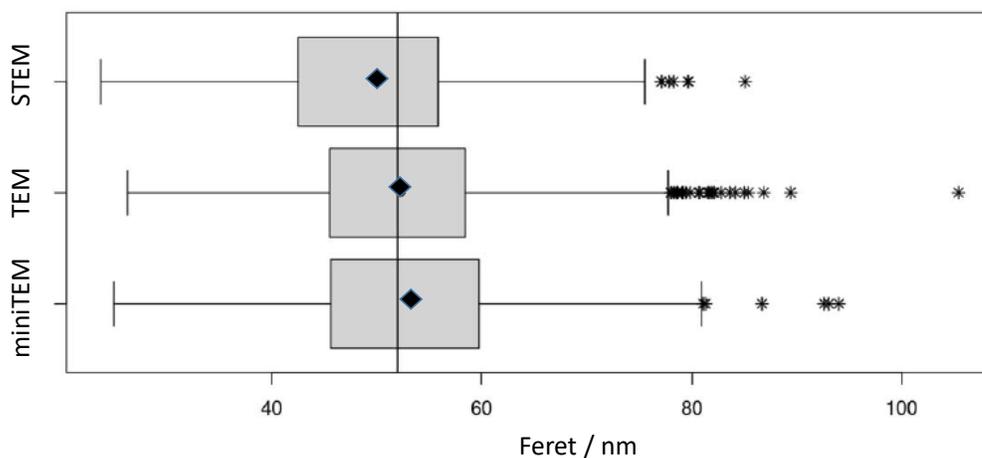


Figura H.4. Diagramas de cajas de ANOVA para los descriptores de Feret reportados por los tres tipos de instrumentos STEM, TEM y miniTEM. La línea vertical representa la gran media, los diamantes representan la media de cada tipo de instrumento, y los asteriscos los valores extremos.

Resultan 36 pares para los 9 laboratorios participantes en la comparación. Las comparaciones por pares mediante ANOVA muestran medias similares para el 25 %, 36 % y 42 % en los descriptores de Feret, Feret mínimo y relación de aspecto respectivamente. Aunque las incertidumbres de medida de los parámetros son razonablemente bajas, se encuentran conjuntos de datos que difieren entre sí. Estas diferencias podrían relacionarse a diferencias entre las partículas seleccionadas para el análisis o a diferencias en la exactitud y precisión del análisis de imágenes. Este segundo factor se examina en el apartado H.3.4.

H.3.3 Comparación de conjuntos de datos tomados de las mismas partículas en las mismas imágenes

Una de las posibles causas de baja reproducibilidad puede ser las diferencias en los análisis de imágenes específicas mediante la herramienta de software para el estudio de las imágenes. Se probó este concepto enviando tres imágenes a seis laboratorios con partículas específicas seleccionadas para el análisis. Estos análisis mostraron lo siguiente: todos los conjuntos de datos tienen media similar a la gran media de la comparación (prueba ANOVA) y las distribuciones acumulativas resultan similares

según la prueba bivariada. La Tabla H.3 muestra que todos los descriptores de tamaño tienen las mismas medias y que los tres descriptores de elongación tienen también las mismas medias. Claramente, la reproducibilidad de los datos es alta, soportando el concepto de que esta muestra podría certificarse en tanto en descriptores de tamaño como en forma. Los descriptores de rugosidad presentan valores muy cercanos a la unidad y no se diferencian suficientemente. Estos datos muestran que la selección de partículas en la imagen pueden afectar las distribuciones de tamaño y forma reportadas.

Tabla H.3 Valores *p* de ANOVA de los descriptores de tamaño y forma de las mismas partículas obtenidas de las mismas imágenes analizadas por 6 laboratorios.

Descriptor	Valor <i>p</i>	Rango de orden
Tamaño		
Área	0.802	4
Feret	0.316	7
Feret mínimo	0.165	8
Perímetro	0.621	5
Diámetro circular equivalente	0.560	6
Perímetro circular equivalente	0.165	8
Forma elongacional		
Relación de aspecto	0.969	1
Redondez	0.826	3
Compacidad	0.830	2

H.3.4 Reproducibilidad de datos tomados en secuencia de la misma rejilla, dos laboratorios

Dos laboratorios participaron en una prueba de comparación entre laboratorios en la cual el Laboratorio 1 analizó una rejilla dada –ensayo 1-, seguido del análisis del Laboratorio 2 –ensayo 2- y terminó con un nuevo análisis de la propia rejilla por el Laboratorio 1 –ensayo 3-. El propósito de la secuencia fue aprender sobre posibles cambios sustanciales en la rejilla al someterse a una nueva prueba. La Tabla H.4 muestra los análisis de ANOVA de los tres ensayos. Los datos sugieren que dos de los descriptores, el área y la relación de aspecto, fueron similares entre los ensayos 1 y 2. Sin embargo después del ensayo 2 ninguna de las medias de los descriptores se encontraron similares, sugiriendo que la muestra pudo haber cambiado.

Tabla H.4. Valores p de ANOVA para ensayos secuenciales en una rejilla.

Descriptor	ensayo 1 vs ensayo 2	ensayo 2 vs ensayo 3	ensayo 1 vs ensayo 3
Tamaño			
Área	0.220	2 e-06	2 e-06
Perímetro	1e-06	1 e-06	1 e-06
Feret	0.002	2 e-06	2 e-06
Feret mínimo	0.009	2 e-06	2 e-06
Forma elongacional			
Relación de aspecto	0.780	2 e-06	2 e-06

12. Bibliografía

[Albers, 2015] Albers, P., et al., Physical boundaries within aggregates - differences between amorphous, paracrystalline, and crystalline Structures. *Cryst. Res. Technol.*, 2015. **50**(11): p. 846-865.

[ASTM, D3849] ASTM, D3849-14a Standard test method for carbon black - morphological characterization of carbon black using electron microscopy 2014, American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA.

[Babick, 2016] Babick, F., et al., How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particlesizing techniques at work. *J Nanopart Res*, 2016. **18**: p. 158.

[Becker, 2010] Becker, J., et al., The optimal aspect ratio of gold nanorods for plasmonic bio-sensing. *Plasmonics*, 2010. **5**: p. 161-167.

[Bonevich, 2010] 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. p. 13.

[Boyd, 2011] 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.

[Ferreira, 2012] Ferreira, T. and W. Rasband, ImageJ User Guide IJ 1.46m. 2012, NIH.

[Gulke, 2017] Gulke, E.A., et al., Size and shape distributions of primary crystallites in titania aggregates. *Adv. Powder Technol.*, 2017. **28**(7): p. 1647-1659.

[Gulke, 2018 a] Gulke, E.A., et al., Differentiating gold nanorod samples using particle size and shape distributions from transmission electron microscope images. *Metrologia*, 2018. **55**(2): p. 254- 267.

[Gulke, 2018 b] Gulke, E.A., et al., Size and shape distributions of carbon black aggregates by transmission electron microscopy. *Carbon*, 2018. **130**: p. 822-833.

[GUM] NMX-CH-140-IMNC Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones. Equivalente a JCGM 100:2008, GUM 1995 with minor corrections. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. The BIPM, 2008.

[ISO 9276-3] ISO 9276-3 Representation of results of particle size analysis - Part 3: fitting of an experimental cumulative curve to a reference model. 2008, ISO: Geneva.

[ISO 9276-6] ISO 9276-6 Representation of results of particle size analysis - Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology. 2008, ISO: Geneva. p. 23.

[ISO 13322-1] *ISO 13322-1 Particle size analysis - Image analysis methods - Part 1: Static image analysis methods*. 2004, ISO: Geneva. p. 39.

[ISO 14887] ISO 14887:2000(en) *Sample preparation - Dispersing procedures for powders in liquids*. 2000, ISO: Geneva, Switzerland.

[ISO 14488] ISO 14488:2007 Particulate materials - Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties. 2007, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.

[ISO 29301] ISO 29301:2010 Microbeam analysis -- Analytical transmission electron microscopy -- Methods for calibrating image magnification by using reference materials having periodic structures. 2010, International Standards Organization: Geneva, Switzerland.

[Jakubek, 2018] Jakubek, Z.J., et al., Characterization challenges for a cellulose nanocrystal reference material: dispersion and particle size distributions. submitted, 2018.

[Kestens, 2014] Kestens, V. and G. Roebben, The certification of equivalent diameters of a mixture of silica nanoparticles in aqueous solution: ERM[®]- FD102. 2014, European Commission, Joint Research Centre: Geel, Belgium. p. 112.

[Kestens, 2016] Kestens, V., et al., Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material. *J Nanopart Res*, 2016. **18**: p. 171.

[Lavric, 2017] Lavric, V., et al., A New Model for Nano-TiO₂ Crystal Birth and Growth in Hydrothermal Treatment Using an Oriented Attachment Approach. *Cryst. Growth Des.*, 2017. **17**(11): p. 5640-5651.

[Masuda, 1999] Masuda, H. and K. Gotoh, Study on the sample size required for the estimation of mean particle diameter. *Adv. Powder Technol.*, 1999. **10**(2): p. 159-173.

[Masuda, 1970] Masuda, H. and K. Iinoya, Theoretical study of the scatter of experimental data due to particle size-distribution. *J. Chem. Eng. Japan*, 1970. **4**(1): p. 60-66.

[Moon, 2011] Moon, R.J., et al., Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.*, 2011. **40**(7): p. 3941-3994.

[Morita, 2009] Morita, T., et al., Multiple small-angle X-ray scattering analyses of the structure of gold nanorods with unique end caps. *Chem. Phys.*, 2009. **364**(1-3): p. 14-18.

[Muhd Julkapli, 2017] Muhd Julkapli, N. and S. Bagheri, Nanocellulose as a green and sustainable emerging material in energy applications: a review. *Polym. Adv. Technol.*, 2017. **28**(12): p. 1583-1594.

[NIH, 2012] NIH, ImageJ. 2012.

[NIOSH/DUNE, 2012] NIOSH/DUNE Interlaboratory Study: Evaluation of a sample preparation technique for determination of TEM-based size distribution using NIST Reference Materials 8011, 8012, and 8013: gold nanoparticles. 2012, NIOSH/Dune Sciences. p. 11.

[NIST, 2007] NIST, Report of Investigation. Reference Material 8012. Gold nanoparticles, nominal 30 nm diameter. 2007, National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD. p. 10.

[NMX-CH-5725-1] NMX-CH-5725-1-IMNC-2006 ISO 5725-1:1994 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición -Parte 1: Principios Generales y definiciones.

[NRC, 2017] National Research Council Canada, NRC certified reference material. 2017; disponible en: www.nrc.ca/crm.

[NRC, 2018] National Research Council Canada. Certified reference materials (CRMs). 2018; disponible en: www.nrc.ca/crm.

[Ono, 2012] Ono, K., et al., Influence of furnace temperature and residence time on configurations of carbon black. Chem. Eng. J., 2012. **200-212**: p. 541-548.

[Pratsinis, 1996] Pratsinis, S.E., W. Zhu, and S. Vemury, The role of gas mixing in flame synthesis of titania powders. Powder Technol., 1996. **86**(1): p. 87-93.

[Reid, 2017] Reid, M.S., M. Villalobos, and E.D. Cranston, Benchmarking Cellulose Nanocrystals: From the Laboratory to Industrial Production. Langmuir, 2017. **33**(7): p. 1583-1598.

[Rice, 2013] Rice, S.B., et al., Particle size distributions by transmission electron microscopy: An interlaboratory comparison case study. Metrologia, 2013. **50**(6): p. 663-678.

[Roebben, 2017] ROEBBEN G., *VAMAS Guideline for the Design and Operation of Interlaboratory Comparisons - 2017*, VAMAS.

[Salas, 2014] Salas, C., et al., Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2014. **19**(5): p. 383-396.

[Sharma, 2009] Sharma, V., K. Park, and M. Srinivasarao, Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. Mater. Sci. Eng., R, 2009. **R65**(1-3): p. 1-38.

[Shishido, 2007] Shishido, F., et al., An investigation of primary particle growth and aggregate formation of soot using a numerical model considering the sintering of primary particles. Kagaku Kogaku Ronbunshu, 2007. **33**(4): p. 306-314.

[Souza, 2011] Souza, D.O.C. and F.C. Menegalli, Image analysis: Statistical study of particle size distribution and shape characterization. Powder Technology, 2011. **214**(1): p. 57-63.

[Song, 2009] Song, N.W., et al., Uncertainty estimation of nanoparticle size distribution from a finite number of data obtained by microscopic analysis. Metrologia, 2009. **46**: p. 480-488.

[Szekely] Szekely, G.J. and M.L. Rizzo. Testing for equal distributions in high dimension. 2004. Disponible (junio 2019) en: <https://pdfs.semanticscholar.org/ad5e/91905a85d6f671c04a67779fd1377e86d199.pdf>

[VAMAS, 2001] VAMAS guidelines for the design and operation of interlaboratory comparisons (ILCs). 2001, VAMAS: Washington, DC. p. 4.

[Vladar, 2011] Vladar, A.E. and B. Ming, Measuring the size of colloidal gold nanoparticles using high-resolution scanning electron microscopy, in NIST-NCL Joint Assay Protocol, PCC-15. Version 1.1, NIST, Editor. 2011, NIST-NCL: Washington, DC. p. 20.

[Yoshida, 2009] Yoshida, H., et al., Particle size measurement of standard reference particle candidates and theoretical estimation of uncertainty region. Adv. Powder Technol., 2009. **20**: p. 145-149.

[Yoshida, 2012] Yoshida, H., et al., Theoretical calculation of uncertainty region based on the general size distribution in the preparation of standard reference particles for particle size measurement. Adv. Powder Technol., 2012. **23**: p. 185-190.

13. Vigencia

La Norma Mexicana correspondiente al presente Proyecto de Norma entrará en vigor a los 60 días naturales contados a partir del día natural inmediato siguiente al día de la publicación de su declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación.

Ciudad de México, a **DÍA** de **MES** de 2020.

El Director General de Normas y Secretariado Técnico de la Comisión Nacional de Normalización,

Lic. Alfonso Guati Rojo Sánchez.