

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

Autor: João Marcelo Francisco Felício;

Orientador: Claudio Yamamoto Morassuti;

Co-Orientador: Jorge Vicente Lopes;

Co-Orientadora: Karina Feliciano Santos.

***Refinamento do Processo de Síntese do Pigmento Egyptian Blue para
Aplicação como Sensor em Tintas para Manufatura Aditiva de Scaffolds
Biocompatíveis***

*Improvement of the Egyptian Blue Synthesis Process for Use as a Sensor in Paints for
Additive Manufacturing of Biocompatible Scaffolds*

Resumo

A fluorescência é uma propriedade de certos elementos químicos, é gerada pela absorção de energia, como a energia provida pela radiação (fotoluminescência). Tal emissão pode ser utilizada para imageamento de tecidos biológicos, oferecendo uma alternativa a métodos como ressonância magnética. A dificuldade reside em encontrar materiais fluorescentes que operem nas janelas de transparência dos tecidos biológicos. O pigmento Egyptian Blue, com suas propriedades fluorescentes, é o foco deste estudo, que busca melhorar seu processo de síntese para criar tintas para scaffolds em manufatura aditiva para substituição óssea. A metodologia abrange a síntese química, homogeneização e impressão 3D de scaffolds biocompatíveis. Os resultados esperados incluem melhorias na síntese do Egyptian Blue, maximizando suas propriedades ópticas para futuras aplicações no imageamento tecidual, com análises por espectrometria e microtomografia, além de avaliar a adesão celular e citotoxicidade em escala laboratorial.

Palavras-Chave: Fluorescência; Egyptian Blue; Tecidos biológicos; Scaffolds; Síntese.

Abstract

Fluorescence is a property of certain chemical elements that are generated by some energy absorption such as provided by radiation (photoluminescence). This type of fluorescence can be used to image biological tissues, offering an alternative to methods such as magnetic resonance imaging. The difficulty lies in finding fluorescent materials that work in the transparency windows of biological tissues. The Egyptian Blue pigment, with its fluorescent properties, is the focus of this study, which seeks to improve its synthesis process to create paints for scaffolds in additive manufacturing for bone parts. The methodology includes chemical synthesis, homogenization, and 3D printing of biocompatible scaffolds. The expected results include improvements in the analysis of Egyptian Blue, maximizing its optical properties for future applications in tissue imaging, with spectrometric and microtomographic analyses, in addition to evaluating cell adhesion and cytotoxicity on a laboratory scale

Keywords: Fluorescence, Egyptian Blue; Biological Tissues; Scaffolds; Synthesis.

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

1. INTRODUÇÃO

A fluorescência é uma propriedade de certos elementos naturais, resultante da excitação por radiação, que pode ser utilizada para imageamento de tecidos biológicos, oferecendo uma alternativa a métodos como ressonância magnética e tomografia computadorizada (NICOLA et al., 2019; ACCORSI et al., 2009; GIL et al., 2021). O desafio para essa aplicação reside na necessidade de substâncias que sejam compatíveis com tecidos humanos e que operem nas janelas espectrais de radiação, como o pigmento Egyptian Blue (EB), que possui características de biocompatibilidade e transparência (CAI et al., 2022; GRIFA et al., 2016).

Este pigmento é eficaz na faixa do infravermelho próximo (NIR), crucial para a transparência dos tecidos biológicos (SMITH et al., 2009). Sua síntese envolve a mistura de cálcio, sílica e cobre, resultando em $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$, com fluorescência originada do decaimento dos íons Cu^{2+} (ACCORSI et al., 2009). Fatores como a mistura inadequada e a oxigenação podem afetar sua eficácia, tornando essencial um processo de síntese otimizado (GIMÉNEZ et al., 2017).

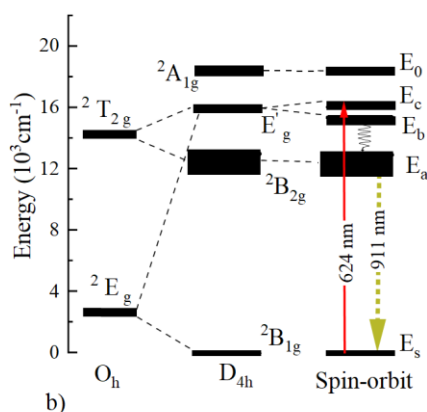


Figura 1: Decaimento do Cu^{2+} . Adaptado de Lin et al.

Portanto, o presente projeto busca aprimorar a síntese do Egyptian Blue, minimizando fases intermediárias e garantindo a pureza do pigmento para análises e desenvolvimento físico conclusivo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Compreensão Química da Síntese de $\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$

Inicialmente, para o desenvolvimento metodológico, estabelecem-se as fases processuais de síntese do pigmento, para posterior melhoria das mesmas. Desta forma, utilizou-se da metodologia de síntese de Johnson McDaniel (2014) para a obtenção do pó. A etapa de refinamento será feita por meio da homogeneização do mesmo após a primeira rampa de aquecimento e preparo para remoção da fase Tenorita, com tratamento de HCl. O mesmo consiste na adição do pó de Egyptian Blue sintetizado, em solução aquosa de proporção 70:30 com H_2O , para remoção da fase descrita acima. O processo, de forma detalhada, é explicitado no item “Refinamento”.

O processo de síntese é descrito na figura 2, como se demonstra abaixo:

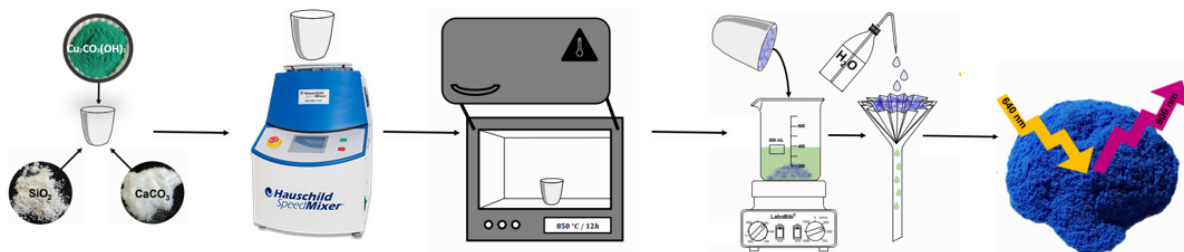


Figura 2: Composição e Aplicabilidade do EB. Adaptado de PUES et al., 2020.

Como explicita a figura acima, o processo de síntese se inicia com a mistura dos pós iniciais das substância formadoras, no caso, SiO_2 , CaCO_3 e $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$, a ser executada por equipamento específico, no caso, o SpeedMixer (Hauschild, DAC 250, Alemanha), para plena miscigenação dos componentes, em proporção molar de 1:4:1, na ordem dos elementos descritos. Na sequência, a mistura será submetida ao ciclo de sinterização, com submissão do conteúdo, por dezesseis horas, a 1000°C . Entretanto, quatro serão as amostras, em diferentes rampas de sinterização, para estabelecimento e compreensão da melhor metodologia. No presente estudo, obteremos a primeira rampa com 1000°C , para posterior submissão, após homogeneização amostral, em 1020°C , durante três horas. A segunda segue a mesma aplicação,

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

porém, na segunda rampa, ficará oito horas em 1020°C. A terceira, da mesma forma, ficará durante treze horas na última rampa. Uma quarta amostra será produzida, ficando dezesseis horas em 1020°C, variando o método empregado.

Após, as mesmas serão submetidas a imersão em solução aquosa de HCl, para refinamento, reduzindo por reação química, a fase com cobre, no caso, a tenorita. Depois de filtrado, lavado com água deionizada e seco em estufa, o resultado será a obtenção do Egyptian Blue otimizado.

Após a finalização do processo, o mesmo transpassa da coloração inicial da mistura de seus componentes, próxima do verde, para o azul esperado, originando o substância apresentada na Figura 3, o próprio Egyptian Blue, estabelecido pela reação descrita:



Figura 3: Egyptian Blue Sinterizado. **Autoria:** L’Oeil, 2023.

Desta maneira, implementa-se sua forma metodológica de produção, permitindo as futuras análises de fluorescência, entre outras.

3. RESULTADOS

Adaptação de Rampas de Aquecimento para Obtenção da Egyptian Blue

Para análise da melhor opção de sinterização da Cuprorivaita (fase EB), a partir da compreensão da metodologia de McDaniel et. al (JOHNSON-MCDANIEL, 2014), com exposição da amostra à uma temperatura de 16h, a 1020°C, apenas uma vez, preparou-se uma

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

única mistura prévia à exposição à rampa de aquecimento descrita pelo método, em proporção três vezes maior. Desta maneira, segmentou-a em quatro porções, submetendo-as ao processo de aquecimento das maneiras que a tabela 1 apresenta, selecionando, posteriormente aos testes de fluorescência, aquela que obtivesse melhores características de excitação e emissão, em regime NIR.

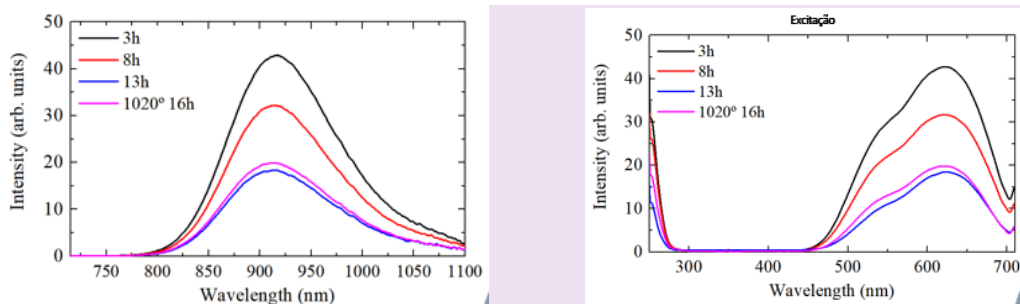
Amostra de EB	Tempo de Exposição à Rampa 1 (1000°C)	Tempo de Exposição à Rampa 2 (1020°C)
Porção 1	16 horas	3 horas
Porção 2	16 horas	8 horas
Porção 3	16 horas	13 horas
Porção 4	-	16h

[CYM1]

Tabela 1: Rampas de Sinterização das Amostras de Egyptian Blue. **Autoria Própria.**

Após a finalização das amostras, utilizando o fluorímetro Horiba Duetta, disponível nas instalações de pesquisa, utilizando a faixa de excitação próxima do infravermelho, obteve-se os gráficos de excitação e emissão de cada uma das amostras, obtendo-se a integralização das curvas para determinação de suas respectivas áreas, deste modo, selecionando a mais vantajosa para análises ópticas posteriores.

Deste modo, a seleção apresenta-se com a porção 1, com os dados que a fomentam descritos com os dados gráficos que se iniciam na Figura 4:



[CYM2]

Figura 4: Excitação e Emissão Comparadas. **Autoria Própria.**

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

Após a compreensão dos gráficos e integralização de suas respectivas curvas, constatou-se, pela área apresentada por cada uma, que a mais adequada, por características de excitação e emissão aprimoradas e mais elevadas, que a porção 1 seria a mais adequada para a continuidade das aplicações de refinamento, como apresenta a Figura 5:

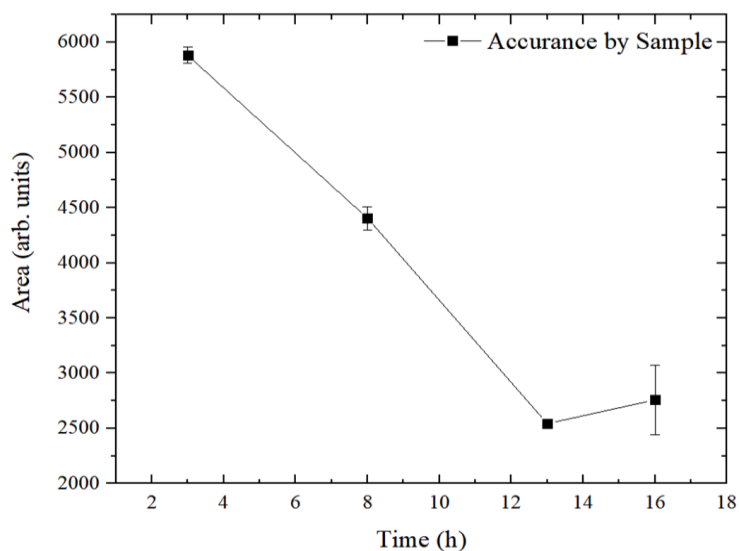


Figura 5: Excitação Integralizada Comparada. **Autoria Própria.**

Deste modo, seguiu-se, para cada uma das aplicações e obtenção de resultados com o uso do modelo de rampa 1, como descrito na tabela 2, acima exposta, detendo a mesma propriedades ópticas ainda mais vantajosas do que a inicialmente proposta por McDaniel na literatura utilizada como base.

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

Produção do Corpo Amostral de Testes

Dada a seleção da metodologia de sinterização, produziram-se seis amostras para posteriores testes, utilizando uma navícula cerâmica de alumina, visando a maior dispersão de oxigênio na superfície de contato com o composto da Egyptian Blue.

O corpo amostral foi dividido em dois grupos, intercalando entre as datas de produção, para que um fosse submetido ao refinamento com a solução de HCl, determinada e demonstrada na metodologia, como demonstra a Tabela 2.

Deste modo, de maneira visual, torna-se perceptível a potencialização da tonalidade azulada nas amostras que passaram pelo processo de refinamento, como apresenta a Figura 6, na sequência.

Amostra	Data de Produção	Tratamento com HCl
AM1	23/03/2024	Tratada
AM2	10/04/2024	Controle
AM3	16/04/2024	Tratada
AM4	18/04/2024	Controle
AM5	21/04/2024	Tratada
AM6	02/05/2024	Controle

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

Tabela 2: Discriminação de Amostras de EB. **Autoria Própria.**

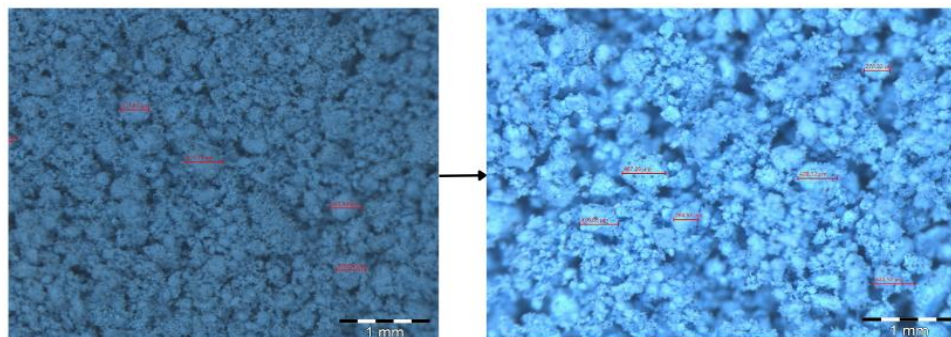


Figura 6: Microscopia de Particulado do Pigmento. **Autoria Própria.**

Com a obtenção das amostras tratadas, sendo estas AM1, AM2 e AM3, realizaram-se ensaios de microtomografia computadorizada para análise de tamanho do particulado das mesmas, comparadas com as não tratadas. Assim, submetendo-as ao processo do equipamento, obtiveram-se os gráficos de descritos na figura 11, possibilitando a inferência da diminuição da métrica das partículas analisadas nas amostras não refinadas, em comparação com as demais, que passaram pelo tratamento, já que a gaussiana (Xc) das mesmas é maior.

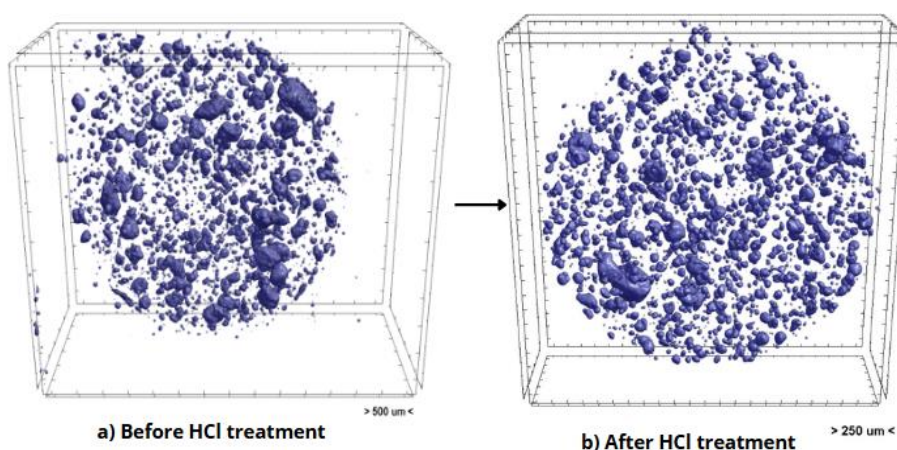


Figura 10: Microtomografia Comparada. **Autoria Própria.**

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

A reconstrução das amostras na Figura 10 revela que a população de partículas de EB tem diferentes tamanhos em escala micrométrica. A Figura 11 apresenta as distribuições de tamanhos das partículas encontradas nas amostras sintetizadas.

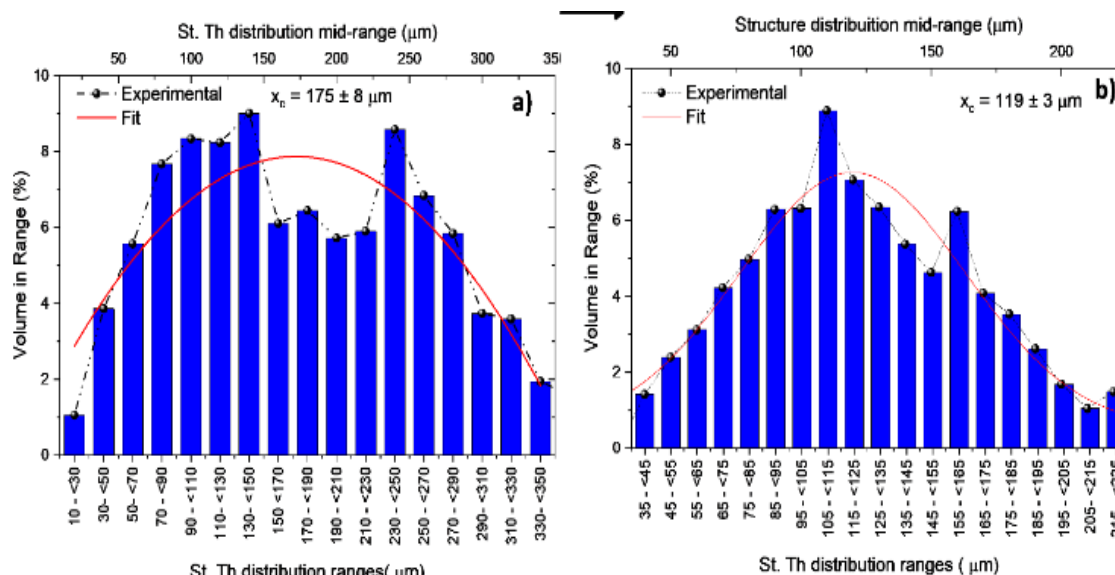


Figura 11: Distribuição de Particulado. **Autoria Própria.**

Nota-se na Figura 11 que após o tratamento com HCl, houve uma leve diminuição dos tamanhos médios das partículas, com seus respectivos centros localizados em 175 μm (controle) e tratada (119 μm). Isto indica na amostra haviam aglomerados de partículas que foram dispersas após o tratamento. Como mostra na Figura 10, e 11 houve uma diminuição do volume das maiores partículas.

CONCLUSÃO

O pigmento fluorescente Egyptian Blue (EB) foi sintetizado e caracterizado por espectroscopia óptica e microtomografia de raios X. Nota-se que na síntese do material, para o segundo aquecimento, o tempo de 3h a 1020° é o tempo que maximiza a intensidade de emissão dos íons de Cu^{2+} no infravermelho. Nota-se que o processo de refinamento com HCl, para a remoção da fase Tenorita (CuO) deixa a amostra com tonalidade mais azulada. Tal tonalidade é característica da fase Cuprorivaita ($\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$) que é a fase do pigmento EB. Portanto os

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

dados de microscopia indicam que o processo foi favorável. Este processo também causa a dispersão dos aglomerados de partículas como apontam os dados de microtomografia. A próxima fase do trabalho será a coleta dos dados de DRX para a realização do refinamento de Rietveld para a verificação (em percentual) das quantidades das fases presentes na amostra. Espera-se uma maximização da quantidade de fase da EB para as amostras tratadas com HCl.

REFERÊNCIAS

ACCORSI, G. et al. The exceptional near-infrared luminescence properties of cuprorivaite (Egyptian blue). **Chemical Communications**, n. 23, p. 3392, 2009.

BERKE, H. The invention of blue and purple pigments in ancient times. **Chem. Soc. Rev.**, v. 36, n. 1, p. 15–30, 2007.

CAI, Y. et al. Nanoengineering of Egyptian Blue Nanosheets: Advantages and Limitations for Near-Infrared Photoluminescence Applications. v. 1, n. 1, p. 465–472, 16 nov. 2022.

COOKE, Megan E.; ROSENZWEIG, Derek H. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. **APL bioengineering**, v. 5, n. 1, 2021.

Exfoliation of Egyptian Blue and Han Blue, Two Alkali Earth Copper Silicate-based Pigments | Protocol (Translated to Portuguese). **Disponível em:** <<https://www.jove.com/v/51686/exfoliation-egyptian-blue-han-blue-two-alkali-earth-copper-silicate?language=Portuguese>>. Acesso em: 4 out. 2023.

GIL, H. M. et al. NIR-quantum dots in biomedical imaging and their future. **iScience**, v. 24, n. 3, p. 102189, 19 mar. 2021.

GIMÉNEZ, J. et al. Effect of NaCl on the fabrication of the Egyptian blue pigment. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 14, p. 174–180, ago. 2017.

GOVONE, A. B. Desenvolvimento de um sistema de imagem de campo amplo de fluorescência para localização de linfonodo sentinela empregando a indocianina verde. **Disponível em:** <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-04052016-155225/en.php>>. Acesso em: 4 out. 2023.

GRIFA, C. et al. Beyond Vitruvius: New Insight in the Technology of Egyptian Blue and Green Frits. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 99, n. 10, p. 3467–3475, 29 jun. 2016.

JOHNSON-MCDANIEL, Darrah; SALGUERO, Tina T. Exfoliation of Egyptian blue and Han blue, two alkali earth copper silicate-based pigments. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 86, p. e51686, 2014.

PROJETO DE PESQUISA – PIBIC

KISS, A. et al. Synthesis of Egyptian Blue and mechanisms. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 167, p. 110738, ago. 2022.

KYLE, Stuart et al. 'Printability' of candidate biomaterials for extrusion based 3D printing: state-of-the-art. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 16, p. 1700264, 2017.