

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDOS HÚMICOS POR NANOPRECIPITAÇÃO

B. A. G. MELO<sup>1</sup>, F. L. MOTTA<sup>1</sup>, M. H. A. SANTANA<sup>1</sup>

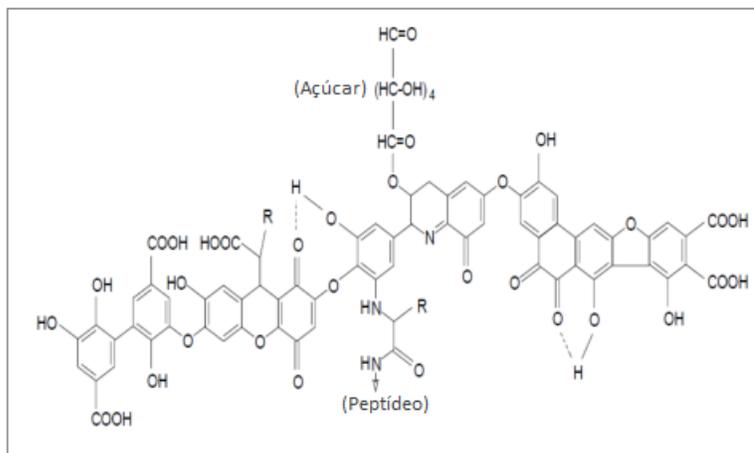
<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos.  
E-mail para contato: [g.melo.bruna@gmail.com](mailto:g.melo.bruna@gmail.com)

**RESUMO** – Ácidos húmicos (AH) são complexos poliméricos de ácidos orgânicos constituídos por diversos grupos funcionais que atuam em várias aplicações, algumas já bem estabelecidas como na agricultura e outras com grande potencial em fármacos e cosméticos. Com o objetivo de contribuir para as aplicações farmacêuticas e em cosméticos, este trabalho apresenta um estudo da produção de nanopartículas de AH mediada pela redução da sua solubilidade com o pH e agitação mecânica. A dispersão do polímero em nanopartículas é vantajosa por aumentar a área superficial, que tende a melhorar a sua eficiência de ação no meio biológico. As partículas foram caracterizadas pelo diâmetro médio, distribuição populacional, morfologia e potencial zeta. Os resultados mostram a factibilidade da produção de nanopartículas esféricas de AH, em processo simples, escalonável e de etapa única. As propriedades físico-químicas das nanopartículas foram controladas pela razão molar entre NaOH e HCl, usado inicialmente para a solubilização do AH. O compromisso entre as concentrações iniciais do ácido e base, pH final, grau de dissociação e as propriedades das nanopartículas é discutido com base nos resultados obtidos.

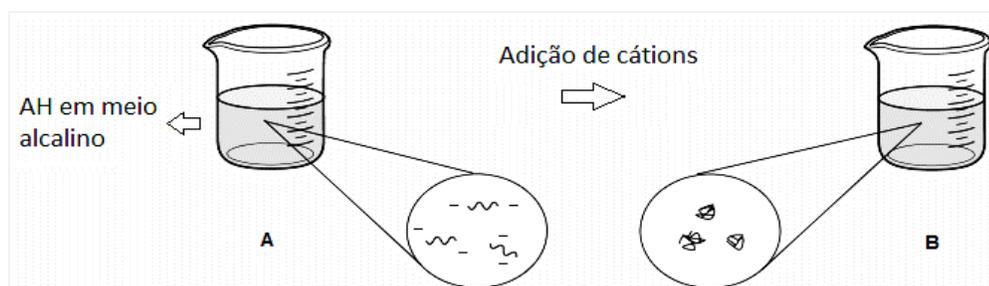
## 1. INTRODUÇÃO

Ácidos húmicos (AH) são macromoléculas orgânicas constituídas de diversos grupos funcionais, que vêm sendo amplamente usados na agricultura como nutriente de solo e também como fungicida. Dentre os seus grupos funcionais estão os aromáticos, que não lhe conferem toxicidade (Thiel *et al.*, 1981), e os grupos carboxílicos que são responsáveis pelas suas características fungicidas (Siddiqui *et al.*, 2009). Na área de cosméticos os AH são usados em máscaras para tratamento facial, sendo também reconhecidos como compostos dermatocosméticos e dermatoterapêuticos (Wollina, 2009).

As moléculas de AH são formadas por uma longa cadeia polimérica com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que, em meio alcalino, onde são solúveis, adotam uma configuração estendida devido à desprotonação dos grupos carboxílicos e hidroxilas e à repulsão entre as cargas negativas (Figura 1-A). Na presença de cátions, a repulsão das cargas é minimizada, fazendo com que a cadeia se enovele e adquira uma estrutura compacta, com sua porção hidrofóbica ficando no interior e a hidrofílica em contato com o meio ocorrendo assim sua precipitação (Figura 1-B).



(A)



(B)

Figura 1- (A) Modelo de estrutura dos AH de acordo com Stevenson (1982); R pode ser alquil, aril ou aralquil. (B) Moléculas precipitadas de AH após adição de cátions ao meio com conformação compacta.

Estudos anteriores demonstraram a agregação de moléculas de AH com o abaixamento do pH e completa precipitação em pHs muito ácidos, entre 2 e 3. A agregação mediada por cátions metálicos conduz à formação de pseudo-micelas, assim denominadas por semelhança com micelas de tensoativos, as quais também precipitam através de um processo sequencial de intra e inter-agregação, conforme evidenciado por von Wandruszka *et al.* (1997), a partir do comportamento de fluorescência de espécies não polares, como o pireno, em solução de AH.

Em geral, a formação de nanopartículas por precipitação de um polímero dissolvido em solvente, ocorre após a adição de um não solvente, no qual o solvente é miscível. Entretanto, a nanoprecipitação também pode ser mediada pela adição de cátions ou outros polímeros de carga oposta (Schubert *et al.*, 2011; Bicudo, 2012). Em todos os casos, a agitação mecânica tem a função de homogeneizar o meio e reduzir a agregação inter-partículas.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da produção de partículas de AH por nanoprecipitação mediada pela redução do pH e agitação mecânica do meio.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Produção de nanopartículas de AH por nanoprecipitação

Seis ensaios foram realizados em triplicata para estudar a produção de AH pelo processo da nanoprecipitação mediada pelo pH e agitação mecânica. Nesses ensaios variaram-se a concentração e o volume da solução de HCl adicionados à solução de NaOH usada para solubilizar inicialmente os AH comerciais (Sigma-Aldrich).

Os AH na forma de pó, com tamanhos de partículas variados, foram adicionados a uma solução de NaOH 0,1N, de modo a obter-se uma concentração de 5 mg/L. Para auxiliar na dissolução, a solução foi deixada sob agitação magnética por 10 minutos e, posteriormente, por 5 minutos em banho sonicador. Foram preparados seis frascos contendo 5 mL dessa solução onde, sob agitação mecânica (400 rpm) e temperatura controlada (20°C), a solução de HCl foi gotejada com auxílio de micropipeta, de acordo com os ensaios mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de concentração de HCl e razão NaOH/HCl utilizada para a nanoprecipitação dos AH

Ensaio	Concentração HCl (M)	Número de mols HCl	Número de mols NaOH	Razão molar NaOH/HCl
1 (controle)	0	0	5,0E-4	---
2	0,05	1,0E-5	5,0E-4	50
3	0,05	2,0E-5	5,0E-4	25
4	0,5	1,0E-4	5,0E-4	5
5	0,5	2,0E-4	5,0E-4	2,5
6	1	2,0E-4	5,0E-4	2,5
7	1	4,0E-4	5,0E-4	1,3
8	5	1,0E-3	5,0E-4	0,5
9	5	2,0E-3	5,0E-4	0,25

### 2.2. Caracterização

Amostras de cada um dos ensaios foram coletadas e caracterizadas quanto ao diâmetro médio e polidispersidade, sendo realizadas três medidas para cada ensaio, através de espalhamento de luz utilizando laser de alta potência, em equipamento Autosizer 4700, Zetasizer Nano (Malvern) com ângulo de 173°C em relação ao feixe de luz incidente (laser He-Ne). Os resultados foram analisados em termos de intensidade de luz espalhada (distribuição I) e de distribuição populacional em número de partículas predominantes (distribuição N). O potencial zeta foi caracterizado no mesmo equipamento, realizando-se três medidas para cada ensaio.

A morfologia, assim como a distribuição das nanopartículas na dispersão, foi determinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), (Leo 440i, LEO Electron Microscopy/Oxford,

Cambridge, Inglaterra). A voltagem de aceleração foi de 20 kV e a corrente do feixe igual a 100 pA. A amostra recebeu pulverização catódica (SC7620, VG Microtech, Inglaterra) com 92 Å de espessura de Au.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

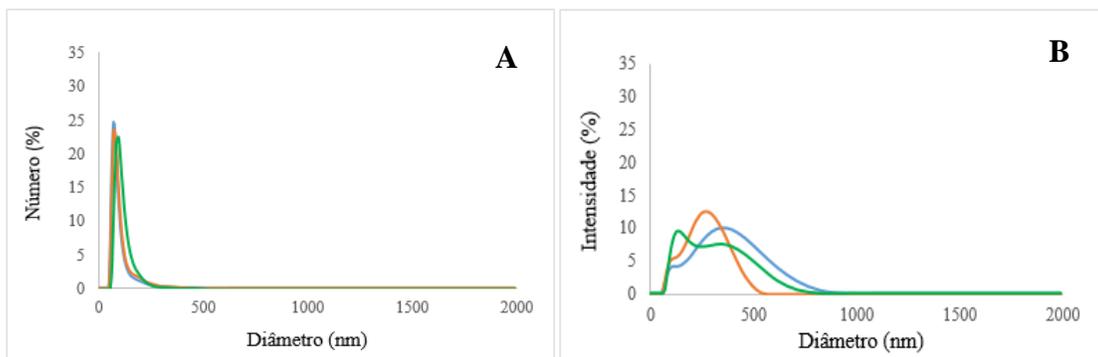
A Figura 2 mostra a distribuição de tamanhos das partículas de AH referentes aos ensaios 1 (controle), 5, 7 e 8, cujas razões base/ácido foram de 2,5; 1,3 e 0,5 respectivamente.

As caracterizações foram realizadas quanto à distribuição de intensidade de luz espalhada pelas partículas (distribuição-I), que é a primeira distribuição gerada pela análise de dados, e a partir dela se obtém a distribuição populacional em número de partículas (distribuição-N). As distribuições I e N são proporcionais ao diâmetro das partículas elevado à sexta e primeira potência, respectivamente, e portanto, é necessário considerar as duas distribuições para análise mais completa dos resultados.

A distribuição-I do ensaio controle mostra uma grande variedade de tamanhos, enquanto a distribuição-N apresentou diâmetro médio em torno de 80 nm.

Com a adição de HCl a distribuição-I passa a ser mais homogênea, como observado no ensaio 5. O diâmetro médio das partículas de AH aumentou com a adição do ácido, sendo este 190 nm para o ensaio 5, 600 nm para o ensaio 7 e 1200 nm para o ensaio 8. Este último obteve também populações mais heterogêneas, como é possível observar na sua distribuição-I, e confirmado pela medida do índice de polidispersidade, que foi de 0,505, enquanto que para todos os outros ensaios esse índice variou entre 0,300 e 0,400.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos ensaios 5 e 8, indicam a formação de partículas esféricas e nas dimensões verificadas na análise de diâmetros. A Figura 3 mostra que as nanopartículas obtidas no ensaio 5, de razão NaOH/HCl igual a 2,5, estão bastante dispersas na solução, com apenas alguns pontos de agregação. Na Figura 4 é possível observar que as nanopartículas obtidas através da adição de HCl 5 M, de razão base/ácido igual a 0,5 se agregaram, devido à sua desestabilização eletrostática. É possível observar também que houve formação de cristais de NaCl devido ao excesso de ácido adicionado, o que não foi constatado no ensaio 5.



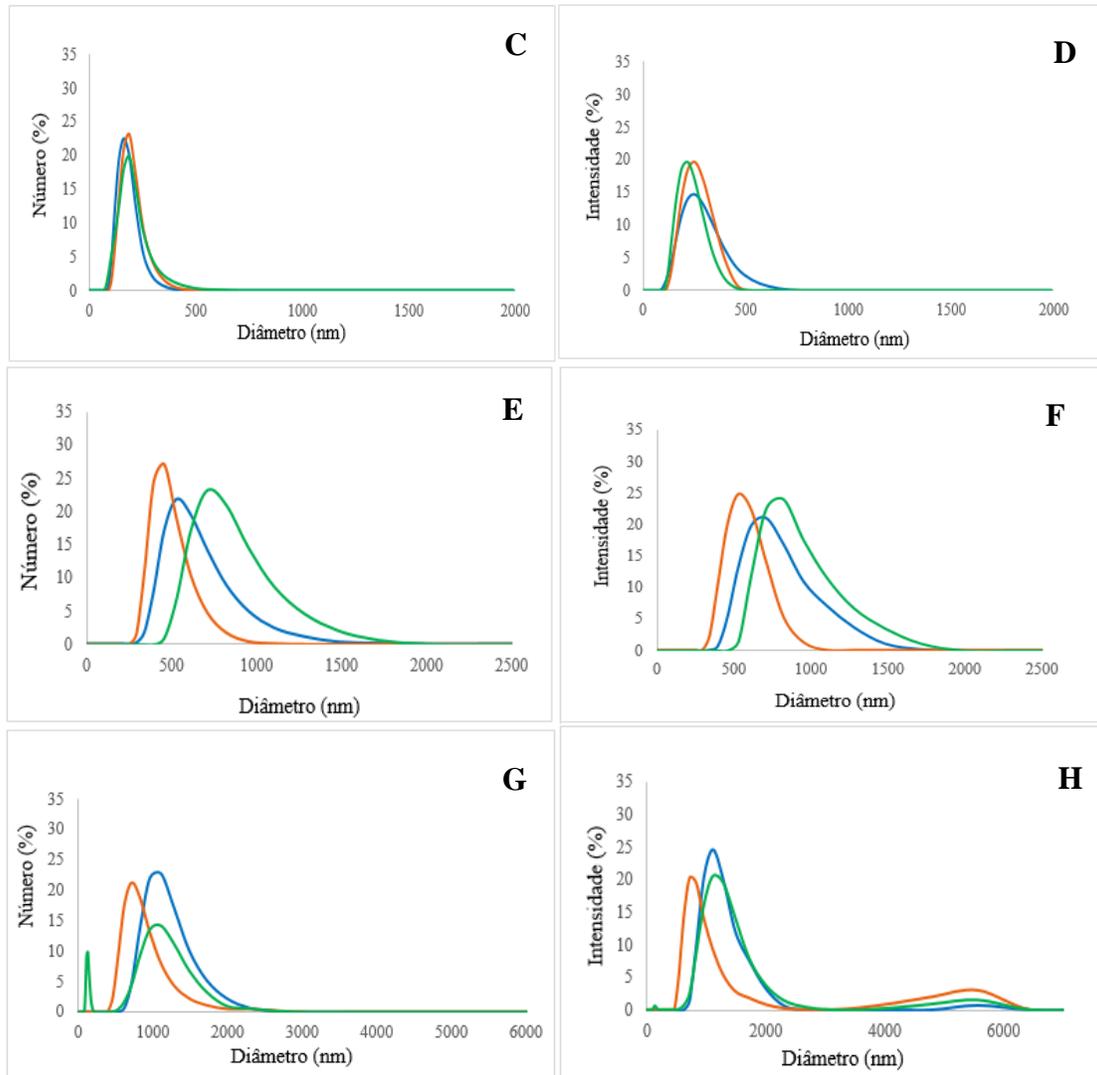


Figura 2 – Distribuições populacionais de diâmetros das partículas em número (distribuição- N), curvas à esquerda e em intensidade (distribuição –I), curvas à direita. Ensaio controle, sem adição de HCl (A e B); Ensaio 5, de razão base/ácido igual a 2,5 (C e D); Ensaio 7, de razão igual a 1,3 (E e F) e Ensaio 8, de razão igual a 0,5 (G e H). As curvas representam o valor médio de cada triplicata.

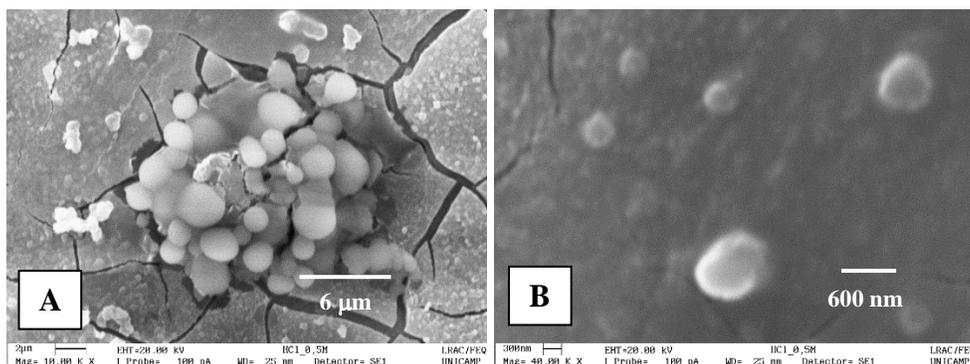


Figura 3 – Imagens das partículas de AH produzidas por nanoprecipitação através da adição de 200 µL de HCl 0,5 M, obtida por MEV. Partículas maiores agregadas (A) e nanopartículas dispersas (B).

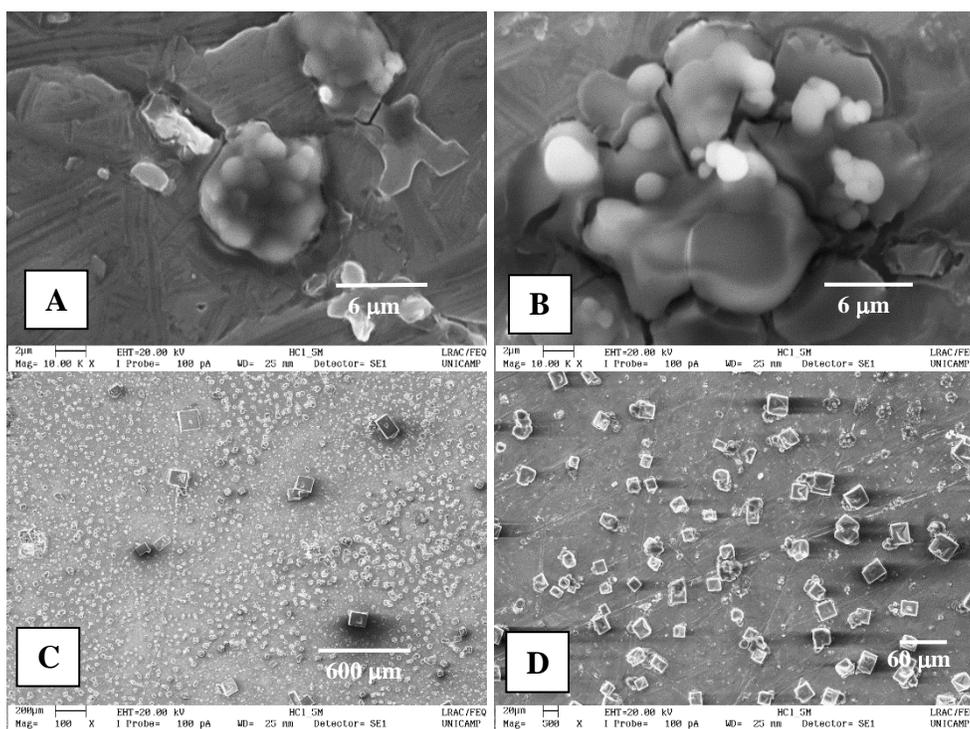


Figura 4 – Imagens das partículas de AH produzidas por nanoprecipitação através da adição de 400 µL de HCl 5 M, obtida por MEV. Diferentes pontos de aglomeração das partículas (A e B) e cristais de NaCl formados pelo excesso de ácido (C e D).

A Figura 5 mostra os resultados das análises de potencial zeta correspondentes aos ensaios realizados (Tabela 1). O valor do potencial zeta permaneceu igual ao controle até a concentração de 1 M, indicando que as modificações de carga na camada de Stern foram significativas somente a partir dessa concentração, e à menor razão molar. Com 5 M de HCl, o potencial zeta foi praticamente reduzido a zero.

A análise conjunta das distribuições de diâmetros e potencial zeta indicam que as interações intra-moleculares ocorreram predominantemente nos ensaios 2 a 6, enquanto que nas condições dos ensaios 7 a 9 houve também interações inter-moleculares que favoreceram a agregação das partículas, com conseqüente instabilidade eletrostática. Em todos os casos, o pH final das dispersões ainda foi distante do pH neutro, indicando a necessidade de redução das concentrações de ácido e base para as mesmas razões estudadas.

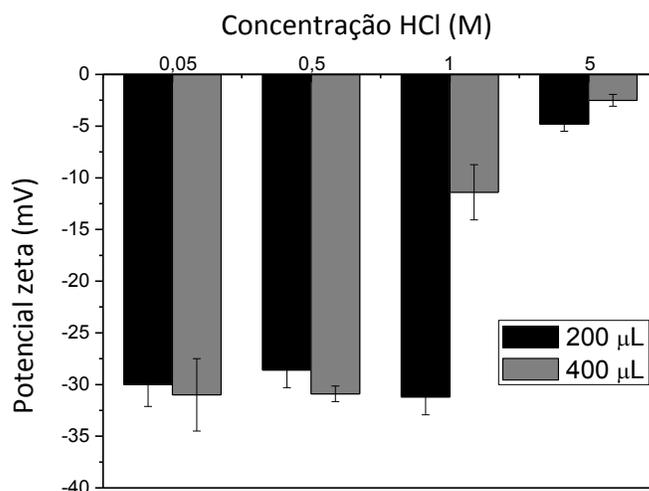


Figura 5 - Potencial zeta das partículas de AH em função da concentração de HCl.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que a produção de nanopartículas de AH por nanoprecipitação é factível, e é controlada pela razão base/ácido. Trabalhos futuros devem otimizar as concentrações iniciais de ácido e base utilizadas, para as mesmas razões, assim como avaliar a possibilidade de utilização de ácidos fracos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BICUDO, R. C. S.; SANTANA, M. H. A. Production of hyaluronic acid (HA) nanoparticles by a continuous process inside microchannels: Effects of non-solvents, organic phase flow rate, and HA concentration. *Chem. Eng. Sci.*, v. 84, p. 134–141, 2012.
- SCHUBERT, S.; DELANEY, J. T.; SCHUBERT, U. S. Review nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *J. R. Soc. Chem.*, v. 7, p. 1581–1588, 2011.
- SIDIQUI, Y.; MEON S.; ISMAIL, R.; RAHMANI, M.; ALI A. In vitro fungicidal activity of humic acid fraction from oil palm compost. *Int. J. Agr. Biol.*, v. 11, p. 448-452, 2009.

THIEL, K. D.; HEIBIG, B., KLOCHING R.; VUTZIER, P., SPROSSIG; M. SCHWEIZER, H. Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus. *Pharmazie*, v. 36; p. 50-53, 1981.

UWE WOLLIN. Peat: a natural Source for dermatocosmetics and dermatotherapeutics. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, v. 2, p. 17–20, 2009.

VON WANDRUSZKA, R.; RAGLE, C.; ENGBRETSON, R. The role of selected cations in the formation of pseudomicelles in aqueous humic acid. *Talanta*, v. 44, p. 805-809, 1997.