

Comparación de ensayos de ninhidrina para la cuantificación de nanopartículas

Ninhydrin test comparison for amino group quantifying on nanoparticles with potential application in wastewater



Fuente: <https://www.kienyke.com/medio-ambiente/nanoparticulas-descontaminan-aguas-residuales>

García-García J. Daniel^a, Arredondo-Valdés Roberto^a, Ramos-González Rodolfo^b, Segura-Ceniceros Elda Patricia^a, Chávez-González Mónica Lizeth^a, Martínez-Hernández José Luis^a, Govea-Salas Mayela^a, Iliná Anna^{a*}

^a Cuerpo Académico de Nanobiociencia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad de Ciencias Químicas, Venustiano Carranza s/n Col. República. 25280, Saltillo, Coahuila, México. ^bCatedrático CONACYT-UADEC.

*Correspondencia para autor: Anna Iliná
Universidad Autónoma de Coahuila
Correo electrónico: annailina@uadec.edu.mx

Resumen

Las nanopartículas son nanomateriales muy prometedores en la actualidad. Las nanopartículas de magnetita son muy fáciles de obtener ya que existen diferentes métodos para su síntesis y su aplicación ha sido muy amplia y se pueden reutilizar varias veces. Se ha reportado el uso de nanopartículas recubiertas con quitosán para la inmovilización de enzimas, ligandos, azúcares, microorganismos, compuestos fenólicos, entre otras. Esta capacidad es brindada por la capacidad del quitosán, el cual proporciona los grupos aminos para enlazarse con compuestos. Sin embargo, la cantidad de compuesto ligado en la superficie está relacionado con la concentración de los grupos aminos que le provee el quitosán a la nanopartícula. Es por esto por lo que se evaluaron dos metodologías para la determinación de estos grupos aminos en nanomateriales. La síntesis de nanopartículas se llevó a cabo en un solo paso con Fe^{+2} y quitosán. Se evaluaron los dos métodos en las nanopartículas, siendo una de las principales diferencias entre los métodos la concentración de ninhidrina. Los resultados mostraron que la técnica con una mínima concentración de ninhidrina mantenía una mayor estabilidad del cromóforo y por ende una lectura más fácil, mientras que la técnica con mayor concentración de ninhidrina reaccionaba altamente impidiendo la lectura de la muestra. Los resultados observados permiten tener una técnica fácil para la determinación de los grupos amino en nanomateriales como lo son las nanopartículas recubiertas con quitosán.

Palabras clave: magnetita, quitosán, ninhidrina, grupos amino, aguas residuales.

Abstract

Nanoparticles are very promising nanomaterials today. Magnetite nanoparticles are very easy to obtain since there are different methods for their synthesis, and their application has been extensive and can be reused several times. The use of nanoparticles coated with chitosan has been reported for the immobilization of enzymes, ligands, sugars, microorganisms, phenolic compounds, among others. This ability is provided by chitosan, which includes amino groups to bind to compounds. However, the amount of compound bound on the surface is related to the concentration of amino groups that chitosan provides to the nanoparticle. This is the reason why two methodologies for the determination of these amino groups in nanomaterials were evaluated. The nanoparticle synthesis was carried out in a single step with $\text{Fe} + 2$ and chitosan. The two methods were assessed on the nanoparticles, one of the main differences between the methods being the

concentration of ninhydrin. The results showed that the method with a minimum concentration of ninhydrin maintained higher stability of the chromophore, while the method with a higher concentration of ninhydrin reacted highly, preventing the reading of the sample. The results observed allow us to have an easy technique for the determination of amino groups in nanomaterials such as nanoparticles coated with chitosan.

Keywords: magnetite, chitosan, ninhydrin, amino group, wastewater.

Introducción

Las aplicaciones de las nanopartículas en el medio ambiente se han enfocado en la remoción contaminantes en el agua como el plomo, además también se han aplicado en el mejoramiento de los sensores de emisiones de gases al punto de ser capaz de detectar partes por billón, tal y como lo han demostrado Xu y col. (2015) en la fabricación de estos sensores. La reacción de ninhidrina ha sido utilizada para el análisis principalmente de aminoácidos, péptidos, proteínas y compuestos de interés médicos y biológicos que contengan grupos aminos (Friedman, 2004). Algunos aminoácidos como triptófano, glicina, lisina han sido cuantificados en jugos comerciales y frutas. Existen estudios en los cuales se demuestra la capacidad de utilizar este método para materiales solubles e insolubles (Hill y Stewart, 2019). Natsuga y colaboradores desarrollaron el método para evaluación de la relación de los componentes (la sucrosa, NRQ y ácido glutámico) de los sabores característicos del cacahuete. Observaron la precisión del método en comparación con los métodos cromatográficos, lo cual permite ver la viabilidad del método sin la necesidad de costosos análisis cromatográficos (Natsugay col. 2008).

Las nanopartículas magnéticas son un material muy flexible para su utilización en una diversa cantidad de aplicaciones. Han sido utilizadas para le remoción de plomo en aguas residuales, la purificación selectiva de compuestos como proteínas y enzimas, la inmovilización de microorganismos, entre otras aplicaciones (Gregorio-Jauregui y col., 2012). Una de las grandes ventajas de las nanopartículas magnéticas es la facilidad de poder reutilizarlas varias veces, lo cual se ve reflejado en la disminución de costos. Además, la modificación adecuada de la superficie de la nanopartícula con el compuesto adecuado permite que este material sea una alternativa para un sinfín de usos. Sin embargo, estos compuestos no pueden ser fijados la superficie de la nanopartícula sin la ayuda de compuestos que recubran la superficie de la nanopartícula, siendo el quitosán el material que permite la unión

de los compuestos a la nanopartícula debido a los grupos amino disponibles para reaccionar con los compuestos de interés.

Tradicionalmente, el recubrimiento de la nanopartícula se lleva a cabo en dos etapas, la primera consiste en la síntesis de la nanopartícula, la cual puede ser llevada a cabo por diversos métodos, y su posterior recubrimiento con el quitosán (Carneiro y Ward, 2018). En nuestro grupo de trabajo se desarrolló un método para la síntesis de nanopartículas recubiertas con quitosán en una sola etapa, lo cual demostró ser eficaz en comparación con los métodos tradicionales (Gregorio-Jauregui y col., 2012).

Uno de los retos que se presenta con este tipo de nanopartículas, es la determinación de los grupos amino disponibles para reaccionar y así poder determinar la cantidad de compuestos posibles a unirse en la reacción utilizada. Es por esto que la reacción de ninhidrina se ha utilizado para la cuantificación de estos grupos amino. Existen algunas adaptaciones que se han reportado, de las cuales, nosotros tomamos dos de ellas para la comparación de estas en nanopartículas. Este estudio tiene como propósito la comparación de dos técnicas utilizadas para la determinación de grupos amino y evaluar la aplicación de ellas en nanopartículas recubiertas con quitosán.

Metodología

Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se realizó mediante el método de coprecipitación en una sola etapa (Osuna y col. 2012) con algunas modificaciones: 5 g de sulfato ferroso se disolvieron en 50 mL de agua destilada junto con 0.125% de quitosán. La temperatura se mantuvo a 50 °C, agregándose hidróxido de sodio 8 M hasta alcanzar un pH de 12. Se dejó en agitación vigorosa durante una hora. Se lavaron con agua destilada hasta llegar a pH 7 apoyándonos de la aplicación de un campo magnético externo para remover las nanopartículas magnéticas sintetizadas. Las nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosán (NPMQ) se dejan en la estufa a 30 °C para su secado durante 24 h y se almacenan hasta su uso.

Cuantificación de grupos amino mediante el método A

Los grupos amino presentes en la superficie de las nanopartículas recubiertas con quitosán fueron determinados realizando la prueba de ninhidrina, utilizando glicina como estándar (Sánchez-Ramírez et al., 2017). Se utilizaron, 0.1 g de nanopartículas dispersadas en 1 mL de agua destilada; posteriormente se le

añadió 0.6 mL de una solución de ninhidrina al 5 % disuelta en etanol al 70 %. La mezcla fue llevada a ebullición durante 30 min, se dejó enfriar. Se realizó una lectura en el espectrofotómetro UV a 570 nm. La curva de calibración se realizó utilizando glicina en un rango de concentraciones de 0 a 2 mM con quitosán de bajo peso molecular de 0.125 a 0.750 %. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Cuantificación de grupos amino mediante el método B

La solución de ninhidrina consiste de 4 g de Na_2PO_4 , 6 g de KH_2PO_4 , 0.3 g de fructosa y 0.5 g de ninhidrina en 100 mL de agua deionizada. 0.250 g de nanopartículas recubiertas con quitosán se suspenden en 0.5 mL de agua deionizada y agregan 0.250 mL de la solución de ninhidrina. Se ponen en baño maría a ebullición por 16 min, y posterior a este tiempo se deja enfriar 20 min o hasta que llegue a una temperatura ambiente de 25 °C. Se diluye con una solución de KIO_4 al 0.2% y se lee a 570 nm. La curva de calibración se realiza con glicina de 0 a 2 mM y con quitosán de bajo peso molecular de 0.125 a 0.750 % (Spedding y col., 2012).

Resultados y Discusión

Caracterización de las nanopartículas obtenidas.

En la figura 1 presentamos el difractograma de rayos X, debido a que ambos difractogramas el patrón de magnetita tomado de Crystallography Open Database (COD) en la cual se observan las señales correspondientes a este material. En el segundo difractograma se presenta a la magnetita recubierta con el quitosán, de lo cual se puede observar que el quitosán no modifica la estructura cristalina del material conservando su identidad. Esto concuerda con reportes previos en el grupo de trabajo donde se ha trabajado con el mismo material, lo cual nos permite ver la reproducibilidad de la técnica de coprecipitación en un solo paso (Gregorio-Jauregui y col., 2014; Osuna y col., 2012). Esto mismo se observa en el espectro de IR (figura 2), en el cual se observa las señales correspondientes a los enlaces Fe-O en 584 cm^{-1} en el espectro de magnetita sin y con quitosán, además en el espectro de magnetita con quitosán se observan las bandas en 3363 cm^{-1} para O – H y N – H, 2874 cm^{-1} para las vibraciones C-H correspondientes a la estructura del quitosán. De este modo, se puede corroborar la identidad de las nanopartículas de magnetita (Pérez-Guzmán y col., 2019).

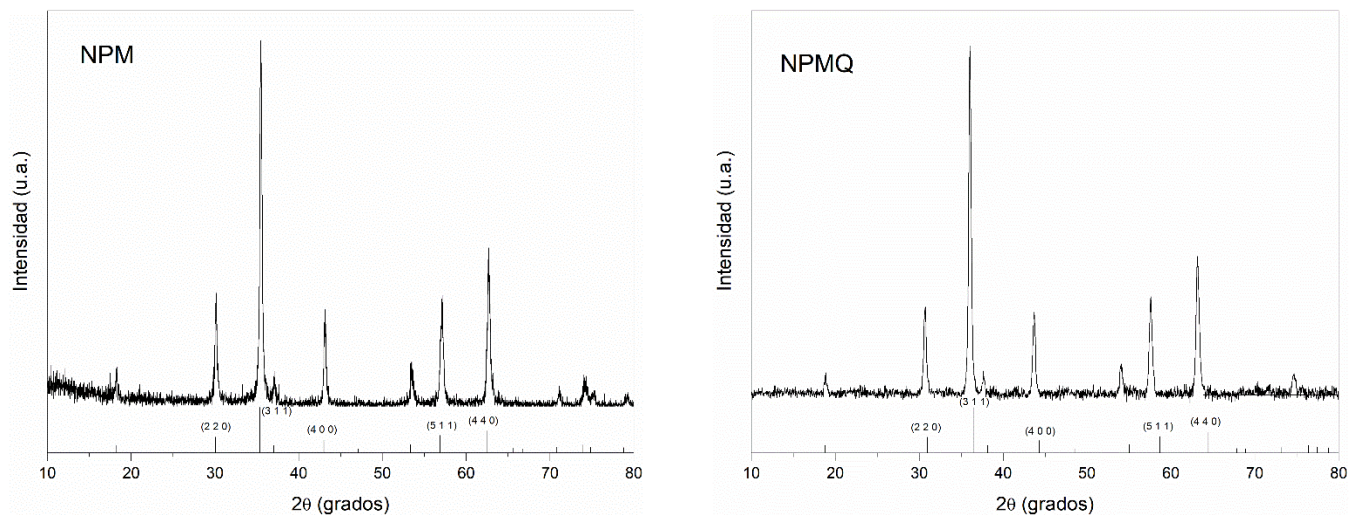


Figure 1. Difractogramas de nanopartículas magnéticas: a) Nanopartícula magnética (NPM); b) Nanopartícula magnética recubierto con quitosán (NPMQ). Patrón de magnetita tomado del COD con número de carta: 00-900-2318.

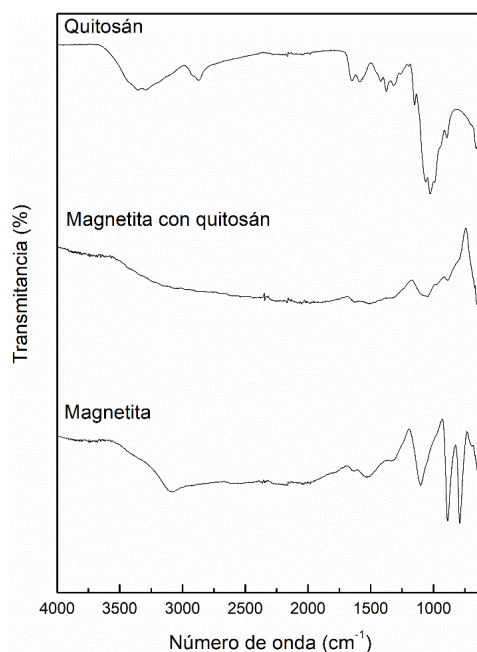


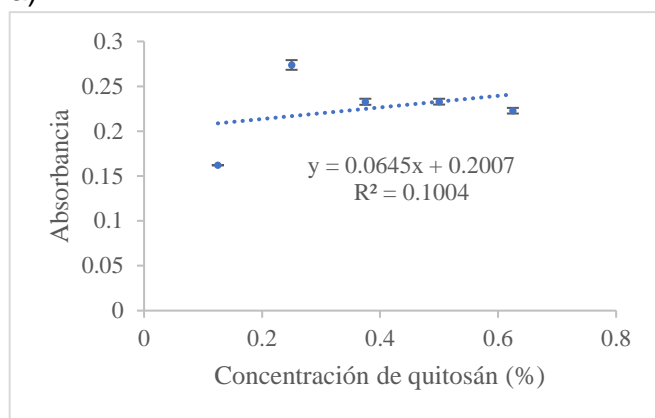
Figura 2. Infrarrojo de Quitosán, Magnetita con quitosán y magnetita

Comparación de los métodos para la cuantificación de grupos amino

Al realizar la curva de calibración, se pudo observar en el método A una falta de linealidad en el método A, lo cual se puede observar en la figura 3a, donde el coeficiente de correlación es 0.1004, dato que nos dice que no hay una correlación

lineal entre la concentración entre la concentración y la absorbancia de la muestra. Este resultado se observa en la intensidad del color en los tubos de reacción (Figura 3b), la imagen mostrada revela que no existe un incremento gradual en el color. De acuerdo a algunos reportes previos, la ninhidrina reacciona con el grupo amino de la muestra, formando un intermediario y produce una amina condensada que da lugar al compuesto púrpura conocido como “Púrpura de Ruhemann” (Friedman, 2004). Debido a que la sensibilidad de esta prueba es muy alta, se ha demostrado que a altas concentraciones de ninhidrina no se lleva a cabo la reacción. El método A se utilizó con alta concentración de ninhidrina al considerar la gran cantidad de grupos amino que el quitosán pudiese tener, y que de este modo todos los grupos amino del quitosán pudieran reaccionar, sin embargo, los resultados demostraron que esto no era posible. Caso contrario fue el segundo método, en donde se utiliza una baja concentración de ninhidrina y manteniendo una linealidad cercana a 1 (0.9846) (Figura 3c), mismo que se puede ver en el aumento gradual en la intensidad del color (Figura 3d). Una de las diferencias considerables entre estos métodos es el pH. El método A no considera el efecto de pH, ya que se realiza con agua destilada, mientras que en el método B, se utilizan soluciones buffer en pH de 5.5. Esto, de acuerdo a diversos autores, es un factor importante, ya que el mecanismo propuesto que lleva a la formación del Púrpura de Ruhemann es llevado a cabo a pH de 5.5 (Spedding y col., 2012), además que de acuerdo a algunos reportes, el pH utilizado en esta técnica también favorece la estabilidad del reactivo por más de dos semanas (Zemljič, Tkavc, Vesel, & Šauperl, 2013). Otro de los factores observados es el tiempo de exposición al calor, ya que de acuerdo a la literatura largos periodos de tiempo, como los utiliza el método A, conduce a la oxidación del reactivo lo cual se traduce en un color muy intenso ilegible para el equipo de espectrofotometría. Existen diferentes técnicas reportadas en las cuales el tiempo de exposición al calor es no mayor a 20 min, tenido tiempos cortos hasta de 5 min (Procedure, 2013), lo cual si se considera un factor importante en esta reacción. Una de las grandes ventajas que se observa en el método B es el reactivo de disolución utilizado. Según algunos reportes, el KIO_3 favorece la estabilización del Púrpura de Ruhemann (Friedman, 2004; Spedding y col., 2012).

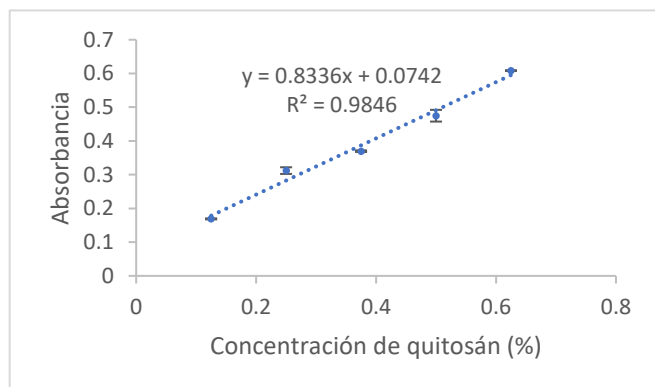
a)



b)



c)



d)

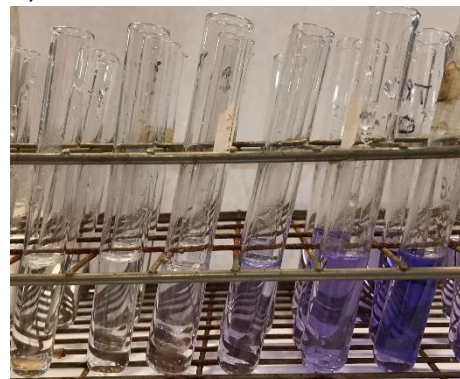


Figura 3. Curvas de calibración de ninhidrina con quitosán y sus respectivas imágenes. a) curva de calibración método A. b) Imagen de los tubos en orden de crecimiento de la curva de calibración del método A. c) Curva de calibración método B. b) Imagen de los tubos en orden de crecimiento de la curva de calibración del método B.

Actualmente el uso de esta metodología es para la detección de proteínas, péptidos, huellas digitales, entre otros. Sin embargo, para la detección de grupos amino en materiales como lo son las nano partículas de magnetita, no encontramos el empleo de esta técnica. Es por esto por lo que se realizó una prueba en estas nanopartículas recubiertas con quitosán.

Cabe resaltar que existe un estudio en donde se cuantifica por medio de la técnica de ninhidrina el quitosán adsorbido en una superficie de plástico PET utilizado en la industria de los alimentos. Es interesante observar que la confirmación de la concentración de grupos aminos es confirmado mediante XPS y FTIR-ATR, evidencia de la sensibilidad de la prueba de ninhidrina (Zemljič et al., 2013).

La glicina se utiliza también para la realización en las curvas de calibración en ambos métodos, es por eso que, una vez observado que el método B con una concentración mínima de ninhidrina presenta un mejor ajuste, procedimos a realizar la curva con glicina. La figura 4 presenta la curva de glicina de 0.6 a 2 mM. Se puede observar que la linealidad de la curva es cercana 1, lo cual muestra la factibilidad de la prueba de ninhidrina en estas concentraciones.

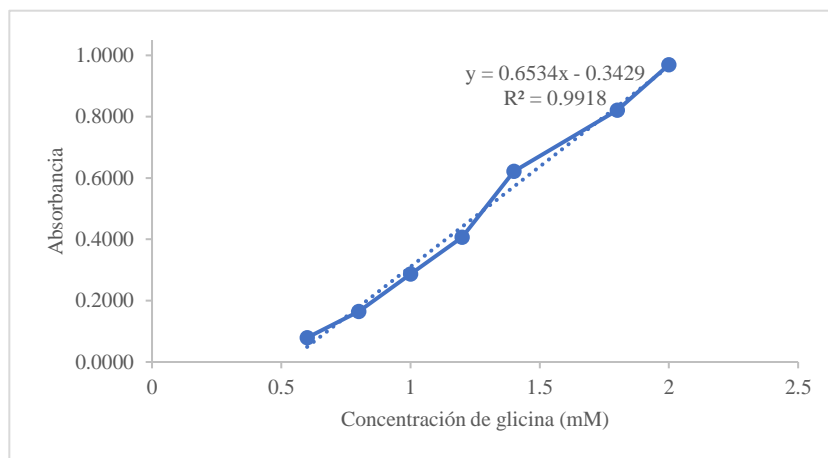


Figura 4. Curva de calibración con glicina de 0.6 – 2 mM

Conclusiones

Al analizar los dos métodos para la cuantificación de grupos amino, el método B resultó ser más viable, y al mismo tiempo la reducción de la concentración del reactivo (ninhidrina), lo cual se traduce en la reducción de costos de la técnica. El desarrollo de esta tecnología en sistemas magnéticos permite la estimación de la cantidad de ligando a inmovilizar sobre la superficie de la nanopartícula. Cabe resaltar que las nanopartículas de magnetita han sido utilizadas en el tratamiento de aguas residuales, es por eso que el presente trabajo favorece para la cuantificación de la cantidad de residuos que podrían ser atrapados por la nanopartícula. Actualmente el traslado de una técnica hacia menores volúmenes como lo es en microplaca, representaría una mayor reducción en los costos, y el tiempo de reacción, lo cual es una gran área de oportunidad.

Referencias Bibliográficas

- Carneiro, L. A. B. C., & Ward, R. J. (2018). Functionalization of paramagnetic nanoparticles for protein immobilization and purification. *Analytical Biochemistry*, 540–541(August 2017), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.005>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids,

- Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/jf030490p>
- Gregorio-Jauregui, K. M., Carrizalez-Alvarez, S. A., Rivera-Salinas, J. E., Saade, H., Martínez, J. L., López, R. G., Ilyina, A. (2014). Extraction and immobilization of SA- α -2,6-Gal receptors on magnetic nanoparticles to study receptor stability and interaction with *Sambucus nigra* lectin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 3721–3735. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0801-x>
- Gregorio-Jauregui, K. M., Pineda, M. G., Rivera-Salinas, J. E., Hurtado, G., Saade, H., Martínez, J. L., López, R. G. (2012). One-step method for preparation of magnetic nanoparticles coated with chitosan. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/813958>
- Hill, A. E., & Stewart, G. G. (2019). Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>
- Natsuga, M., Egashira, H., Sue, Y., Ikeda, T., & Oobac, M. (2008). Determination of constituent content of peanuts using near-infrared transmission spectroscopy and their relationship with taste test parameters. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16(3), 365–369. <https://doi.org/10.1255/jnirs.777>
- Osuna, Y., Gregorio-Jauregui, K. M., Gaona-Lozano, J. G., De La Garza-Rodríguez, I. M., Ilyina, A., Barriga-Castro, E. D., ... López, R. G. (2012). Chitosan-coated magnetic nanoparticles with low chitosan content prepared in one-step. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/327562>
- Pérez-Guzmán, A.K., Ilyina, A., Zugasti-Cruz, A., García-García, J. D., Segura-Ceniceros, E.P., Luis Martínez-Hernández, J.L., Ramos-González, R. (2019). Chitosan–heparin functionalised magnetic nanoparticles for the magnetic recovery of *Aspergillus niger* lipase enzyme. *Micro & Nano Letters*, 14(6), 623–628. <https://doi.org/10.1049/mnl.2018.5490>
- Procedure, T., Impression, F., Digital, E., Evidence, L., Issued, S., Forensic, L., ... Date, E. (2013). Technical Procedure for Ninhydrin 1.0. *Digital/Latent Forensic Scientist Manager*, 1–6.
- Spedding, G., Harrison, N. R., Ganske, F., & Dell, E. J. (2012). A New Way to Test the Free Amino Nitrogen Content in Alcoholic Beverages with the SPECTROstar Nano.
- Xu, L., Dai, Z., Duan, G., Guo, L., Wang, Y., Zhou, H., Liu, Y., Cai, W., Wang, Y., & Li, T. (2015). Micro/Nano gas sensors: a new strategy towards in-situ wafer-level fabrication of high-performance gas sensing chips. *Scientific reports*, 5, 10507. <https://doi.org/10.1038/srep10507>
- Zemljič, L. F., Tkavc, T., Vesel, A., & Šauperl, O. (2013). Chitosan coatings onto polyethylene terephthalate for the development of potential active packaging material. *Applied Surface Science*, 265, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.11.086>