



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Facultad de Ciencias

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FIN

DE MÁSTER

***SENSORES FOTOCRÓMICOS PARA APLICACIONES
BIOTECNOLÓGICAS***

Presentado por:

D^a. Emma Guerrero Ortega

Realizado en la Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Inorgánica

Curso académico: 2023/2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Ana por darme la oportunidad de trabajar y dedicarme a la investigación a través del proyecto Detección y monitorización in-situ de iones inorgánicos en suelos mediante el uso de polioxometalatos (TED2021-130392A-I00), por animarme en las últimas semanas de experimental y por ser una gran investigadora y madre.

Gracias a Josema por todas las ideas que ha aportado a este trabajo y por su cariño. Agradecer a Víctor por el buen rollo que desprende y a Gloria jefa por todas las comidas que hemos compartido en la sala de becarios. A Laura Sabio y Manu por ser excelentes personas.

También agradecer a mis compañeros de laboratorio Marta, Fran, Laura, Belensita, Pablo, Alessandra y Gloria por estar siempre dispuestos a ayudar y por hacer más amenas las horas de laboratorio.

Por último pero no menos importante agradecer a mi familia por apoyarme en todos los sentidos y siempre animarme a hacer lo que más me gusta.

INDICE

• Resumen	1
• Plan de trabajo: Diagrama de Gantt	1
• Palabras clave	1
1. Introducción	5
1.1 Descripción de los POMs. Estructura	5
1.1.1 Clasificación	6
1.2 Propiedades	6
1.3 Iones metálicos en suelos	7
1.4 Iones metálicos en muestras biológicas	8
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. Material y métodos	12
3.1 Descripción general de las técnicas utilizadas	12
3.1.1 Equipamiento y material utilizado	12
3.1.2 Reactivos utilizados	12
3.2 Síntesis PMO	12
3.3 Reacción de iones metálicos con los POMs	12
3.4 Optimización de la determinación de hierro con polioxometalatos	13
3.4.1 Estudio de diferentes concentraciones de hierro frente a PMO y PMA	13
3.4.2 Recta patrón para la determinación de Fe^{2+} con PMO y PMA	13
3.4.3 Reacción de la hidroxilamina con PMO y PMA	14
3.4.4 Recta patrón para la determinación de Fe^{3+} con PMA	14
3.5 Determinación del contenido de hierro en tierra	15
3.5.1 Determinación de Fe^{2+} en tierra sin modificación del pH	15
3.5.2 Determinación de Fe^{2+} en tierra con modificación del pH	15
3.5.3 Determinación de Fe^{3+} en tierra	15
3.5.4 Determinación de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en tierra	16
3.6 Determinación de iones de hierro en apoferritina y ferritina	16
3.6.1 Eliminación de apoferritina	16
3.6.2 Determinación de la cantidad de hierro por proteína	17

4. Resultados y discusión	17
4.1 Reacción de iones metálicos con los polioxometalatos.....	17
4.2 Optimización de la determinación de hierro mediante polioxometalatos	19
4.2.1 Análisis de diferentes concentraciones de Fe^{2+} frente a PMO y PMA	19
4.2.2 Recta patrón para la determinación de hierro con PMO y PMA	20
4.2.3 Reacción de la hidroxilamina con PMO y PMA	22
4.2.4 Recta patrón para la determinación de Fe^{3+} con PMA	24
4.3 Estudio del método para la determinación de hierro total en modelos de situaciones reales.....	25
4.3.1 Determinación de Fe^{2+} en tierra	26
4.3.2 Determinación de Fe^{3+} en tierra enriquecida	27
4.3.3 Determinación de hierro total en tierra enriquecida	28
4.4 Determinación de hierro en ferritina	29
5. Conclusión.....	32
6. Referencias.....	33

• RESUMEN

Los polioxometalatos (POMs) son materiales electrocrómicos descritos como clústeres aniónicos o fragmentos moleculares de óxidos metálicos capaces de aceptar electrones mediante procesos químicos o fotoquímicos, dando lugar a especies coloreadas de valencia mixta. Los organismos vivos y algunas biomoléculas pueden actuar como donantes de electrones frente a estos materiales, de modo que las propiedades cromáticas de los POMs pueden relacionarse directamente con una determinada actividad biológica o con la presencia de una biomolécula en una muestra. Esta propiedad los hace candidatos ideales para el diseño de sensores colorimétricos, que permitan detectar a simple vista la presencia de una biomolécula o especie química en un determinado tipo de muestra. Por tanto son de especial utilidad para ser usados como sensores en biomedicina, en agricultura, en química, etc.

En este trabajo se ha desarrollado un sensor basado en POM para la detección hierro y se ha aplicado como prueba de concepto en dos escenarios diferentes, por un lado para la determinación de hierro en la proteína ferritina y por otro, en tierras, para posible aplicación en agricultura.

La ferritina es la proteína encargada de almacenar hierro en todas las células. Su concentración en sangre correlaciona con anemia e inflamación hepática. En los análisis convencionales se mide la concentración de proteína pero no propiamente la cantidad de hierro que alberga. La falta de un método fácil para medir este hierro ferritínico es un reto actual que hemos pretendido abordar en este trabajo. Por otra parte, la falta de hierro en plantas conlleva un cambio de color en las hojas, una falta de desarrollo en las raíces y por consecuencia un atraso en el crecimiento de la planta. El hierro es necesario para el crecimiento de las plantas y por lo tanto, resulta de vital importancia obtener una forma sencilla y precisa que pueda cuantificar la cantidad de hierro en suelo para la optimización del cultivo.

Proponemos por tanto un nuevo sensor que resulta más rápido y sencillo que los métodos actuales y que se basa en el cambio de color de un POM lo que permite cuantificar la cantidad de hierro en una muestra para posteriormente ejercer el tratamiento adecuado si fuese necesario.

- **PLAN DE TRABAJO (DIAGRAMA DE GANTT)**

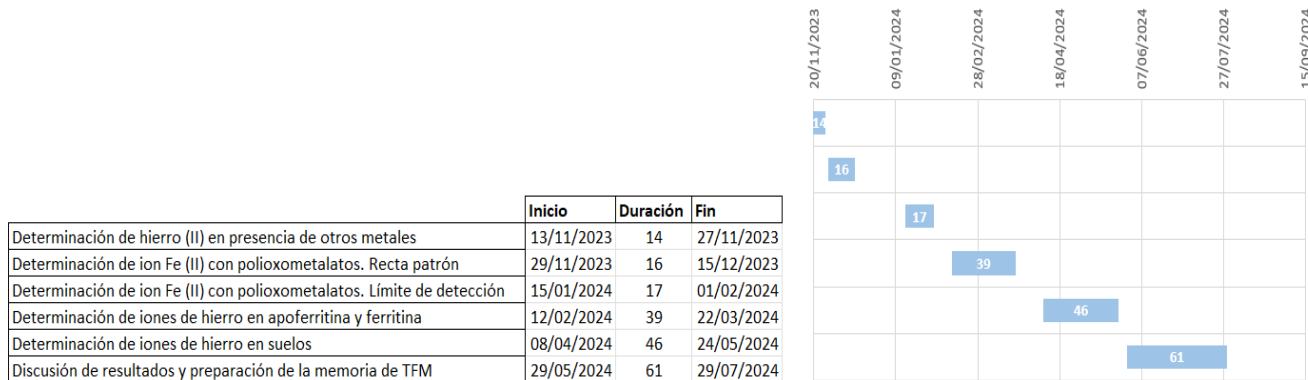


Gráfico 1. Diagrama de Gantt

- **PALABRAS CLAVE**

Polioxometalatos; Espectrofotómetro UV-Vis; Ferritina; Hierro

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción de los POMs. Estructura.

Los polioxometalatos (POMs) son materiales electrocrómicos de fórmula general $[X_xM_mO_y]^{n-}$ (donde $M = Mo, W, V \dots$ y $X = P, Si, As \dots$). Estos compuestos son capaces de aceptar electrones mediante procesos químicos o fotoquímicos, dando lugar a especies coloreadas de valencia mixta. En general, son estructuras complejas y muy reactivas, por lo que se han hallado diversas aplicaciones de los mismos en áreas muy distintas como por ejemplo catálisis, fotoquímica y biomedicina.¹

1.1.1 Clasificación

Centrándonos en la composición, se pueden clasificar en dos grupos que son los que sólo están formados por un metal (isopolioxometalatos) o los que comprenden un heteroátomo (heteropolioxometalatos).¹

A. Isopolioxometalatos

Los isopolioxometalatos están constituidos por el agrupamiento de octaedros MO_6 . En este tipo de polioxometalatos sólo interviene el metal y el oxígeno. Los oxígenos de los octaedros de las unidades MO_6 no son equivalentes por lo que los octaedros están deformados. La estructura más importante es la de Lindqvist $[Nb_6O_{19}]^{8-}$.¹

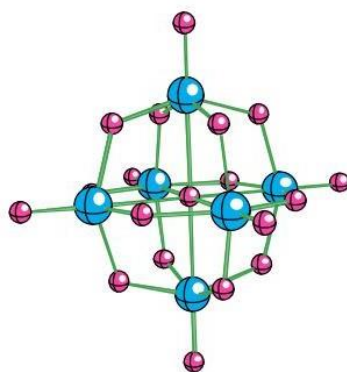


Figura 1. Estructura de Lindqvist

La estructura de Lindqvist está basada en la fusión de seis octaedros con la compartición de un vértice que es un oxígeno enlazado a los seis centros metálicos.¹

B. Heteropolioxometalatos

En ocasiones, se introducen en la estructura del polianión elementos que ejercen como heteroátomos. La función de heteroátomo puede ser realizada por muchos elementos exceptuando los gases nobles. Los elementos que suelen actuar como heteroátomos son el fósforo o el silicio.¹ Estructuras típicas de estos heteropolioxometalatos son las mostradas en la Figura 2.

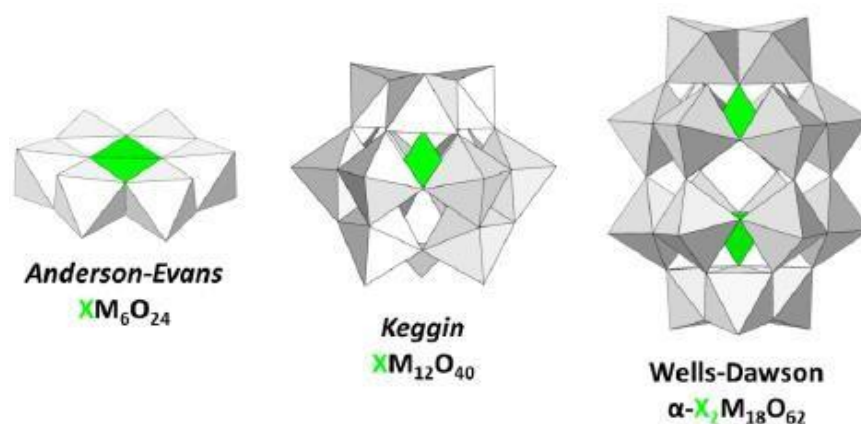


Figura 2. Representación de estructuras de algunos heteropolioxometalatos

1.2 Propiedades

Las diferentes propiedades que presentan estos polioxometalatos los hacen ser utilizados en diversos campos aplicaciones. Por ejemplo, la estabilidad térmica de los POMs es imprescindible en el campo de la catálisis heterogénea ya que la actividad catalítica puede verse afectada irreversiblemente si se descompone. Por lo que la funcionalidad del POM se perdería.²

Además, los POMs presentan generalmente estructuras hidratadas (con hasta cincuenta moléculas de agua por anión) lo que convierte a estos compuestos en muy solubles tanto en agua como en disolventes polares. Así, existen sales con cationes pequeños como el litio y el sodio que experimentan una alta solubilidad, o sales formadas por cationes orgánicos que son insolubles en agua, pero altamente solubles en disolventes orgánicos. Cuando un POM está disuelto en agua en esa disolución pueden coexistir diversas especies en equilibrio en función del pH de la misma.²

Por otro lado, muchos de los POMs son ácidos fuertes de Brønsted por lo que esta propiedad va a ser importante cuando los POMs estén en disolución. Los ácidos de wolframio por lo general son ácidos más fuertes que los de molibdeno. Es crucial mencionar que la fuerza ácida disminuye conforme aumenta la reducción del heteropolianión. La fuerza ácida de los POMs es mucho mayor que la de ácidos conocidos como fuertes (por ejemplo, H_2SO_4 o HNO_3).²

Sin embargo, de entre todas estas propiedades, será de interés para este trabajo la capacidad que tienen los POMs de presentar una actividad redox muy amplia, ya que los átomos metálicos de muchos de ellos se encuentran en su estado de oxidación más alto por lo que pueden llegar a actuar como agentes oxidantes.²

El centro metálico que posean estos POMs va a determinar estas propiedades redox. Por ejemplo, los

POMs que incorporan molibdeno como centro metálico suelen dar reducción química directa mientras que aquellos que tienen un centro metálico como wolframio van a requerir la fotoactivación, que se puede conseguir mediante el empleo de la luz UV.³

Por tanto, los POMs pueden aceptar electrones mediante procesos químicos o fotoquímicos, dando lugar a especies coloreadas de valencia mixta. Los organismos vivos y algunas moléculas inorgánicas pueden actuar como donantes de electrones para estos materiales, de modo que las propiedades cromáticas de los POMs pueden relacionarse directamente con una determinada actividad biológica o con la presencia de una molécula específica. Esto es exactamente lo que ocurre por ejemplo con las siguientes especies, el compuesto sintético PMO cuya fórmula química es $\text{Na}_6[\text{P}_2\text{Mo}_{16}\text{O}_{62}] \cdot (\text{H}_2\text{O})_{24}$, el ácido fosfomolibdico o PMA cuya fórmula es $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, y el llamado ácido fosfotúngstico o PTA que tiene como fórmula $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

El grupo donde he realizado mi trabajo fin de máster tiene amplia experiencia utilizando PMO, PMA y PTA para sensores de diferentes tipos. Algunas de las aplicaciones que ha reportado este grupo han sido el diseño de una pulsera que avisa del exceso de exposición solar y que se puede personalizar para todo tipo de pieles;⁴ un test para la detección de actividad bacteriana;⁵ la detección de etanol en sudor y saliva mediante el empleo de un sensor reutilizable⁶ y un test para el diagnóstico de vaginosis bacteriana.⁷

En la búsqueda de nuevos escenarios donde este tipo de aplicación de los POMs podría ser de interés en este trabajo nos hemos centrado en la detección rápida y fácil de hierro que pueda tener aplicaciones en agricultura o en biomedicina.

1.3 Iones metálicos en suelos.

Algunos de los metales más comunes que se suelen estudiar en plantas, ya que son los que más se acumulan, son cobre (Cu), cromo (Cr), manganeso (Mn), níquel (Ni), zinc (Zn) e hierro (Fe). Estos metales se suelen almacenar en torno a toda la planta y especialmente en hoja, tallo y raíz. Por ejemplo, el hierro es un componente muy abundante en suelos (en torno a 3,8% en masa).⁸ Este metal es un micronutriente esencial para que la planta tenga un correcto desarrollo y la falta del mismo ocasiona el amarilleamiento de las hojas, que afecta al correcto desarrollo en las raíces y por consecuencia provoca un atraso en el crecimiento de éstas. Este déficit de hierro es conocido como clorosis férrica. Los patrones de absorción y acumulación de los metales descritos varían en función de las condiciones edáficas, es decir, las condiciones del suelo, donde juega un papel fundamental el pH. Los suelos se pueden clasificar en suelos ácidos cuando hay formación de H_2SO_4 por oxidación de compuestos reducidos del azufre,

electrolitos minerales de hidrólisis ácida o alta concentración de H^+ . También ocasionan acidez al suelo los grupos ácidos de la materia orgánica parcialmente descompuesta. Por otro lado, los suelos son básicos o alcalinos cuando hay grupos alcohólicos de materia orgánica humificada, protones de grupos OH o bicarbonatos de sodio.⁹ La acumulación de Mn y Zn se suele dar en suelos más ácidos, mientras que la acumulación de Cr es más característica de los suelos básicos.¹⁰ En el caso concreto del hierro, al tener una alta abundancia en suelos no debería haber ningún problema de asimilación en plantas. Sin embargo, cuando el pH que tienen los suelos es alcalino la solubilidad de los óxidos férricos es mínima. Una de las soluciones para mejorar la solubilidad es la adición de productos que aseguren una permanencia en forma soluble en el suelo como pueden ser los quelatos.¹¹ Los quelatos son compuestos capaces de captar y transportar hierro insoluble y reducirlo a un estado que puede aprovechar la planta. En este caso, el hierro en estado de oxidación +3 es reducido a un estado de oxidación +2 y de esta forma la planta es capaz de asimilarlo.

Este mismo problema es el que existe en la determinación de hierro en muestras de suelo, pues al estar quelatado,¹¹ el hierro no está completamente disponible para ser detectado.

Debido a la enorme variación de paisajes existentes en Andalucía los tipos de suelos en esta región se pueden clasificar en tres grandes tipos: neutros que abarcan lugares como marismas y valles de los ríos, básicos sobre todo en las Béticas, sierras del sureste y de Cazorla y Segura y por último ácidos en Sierra Morena, las campiñas del Guadalquivir y algunas partes de Sierra Nevada.¹² Como se puede observar Andalucía cuenta con suelos de todo tipo por lo que es de vital importancia conocer bien el tipo de suelo que se va a analizar y contar con los métodos adecuados para ello.

Las técnicas tradicionales de detección de iones de hierro en suelo son la Espectroscopía de Reflectancia, Espectrofotometría de Absorción Atómica, Espectroscopía de Emisión por Acoplamiento de Plasma Inductivo y Detección Óptica (ICP-OES). Todas estas técnicas, aunque con un grado de sensibilidad muy alto, son costosas y complejas, y precisan de equipamiento específico y personal experimentado.¹³

1.4 Iones metálicos en muestras biológicas.

Respecto a muestras biológicas, algunos de los metales más característicos que predominan son cobre (Cu), mercurio (Hg), zinc (Zn), plomo (Pb), cadmio (Cd) e hierro (Fe). La exposición directa y frecuente a metales pesados genera efectos adversos que ya han sido documentados como, por ejemplo: dolor de cabeza, náuseas, fatiga o daño cerebral, llegando a ser irreversibles en algunos casos. La toxicidad que genera el cobre se atribuye a la ingesta accidental o exposición mediante la piel o vías respiratorias. Respecto al mercurio, una de las exposiciones más característica es mediante el consumo de alimentos contaminados, siendo los valores permitidos en sangre y pelo no superiores a 5,0 mg/mL y 1,0 mg/g respectivamente. Por su parte, el plomo es capaz de incorporarse al organismo por vía aérea o por vía

oral. Existe evidencia experimental que indica que niveles de plomo en sangre $> 10 \mu\text{g/dL}$ son capaces de tener efectos perjudiciales en la función cerebral. Por otro lado, el cadmio es un metal pesado que entra en contacto con el organismo por medio de una exposición directa o por ingesta de algunas comidas, consumo de agua o inhalación. Los niveles elevados de este metal generan toxicidad y es capaz de inducir daño en tejidos.¹⁴ Por último, el hierro es un metal esencial en el organismo, por ejemplo, en un varón adulto el contenido total de hierro es de 4 a 5 g. El hierro se distribuye en la hemoglobina, mioglobina, en enzimas y el resto en la ferritina y hemosiderina. En el plasma o fluidos extracelulares apenas hay un 0,1% de hierro. Una de las afecciones más recurrentes por deficiencia de hierro es la anemia. Por otro lado, también existen afecciones derivadas de una acumulación en exceso de hierro, como la conocida como hematomacrosis, pues el hierro es esencial pero un exceso del mismo también puede generar toxicidad. Conocer qué concentración de hierro es la adecuada en todo momento resulta crucial y por ello también lo es tener un método de detección sencillo y rápido para este tipo de muestras.¹⁵

De todas las técnicas analíticas que existen, las espectroscópicas son las mejores para detectar el contenido elemental de hierro en muestras biológicas. Una de las limitaciones que conllevan los análisis elementales de este tipo de muestras líquidas es por el alto contenido de proteínas y sales que llegan a saturar el canal inyector de la antorcha. Normalmente lo que se suele realizar con las muestras líquidas es una dilución y en el caso de los tejidos primeramente se efectúa un ataque de microondas.¹⁶ Para llevar a cabo el análisis del contenido de hierro en este tipo de muestras las técnicas más indicadas son las espectroscópicas. La Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (ETAAS) y la Espectrofotometría de Absorción Atómica de llama (FAAS) son las más utilizadas en el ámbito clínico. Sin embargo, volvemos a estar frente a técnicas que requieren experiencia para el muestreo, el correcto almacenamiento y transporte de las muestras y también se necesita de personal cualificado y formado para llevar a cabo el análisis, lo que en ocasiones dilata la obtención de los resultados.

En este trabajo se persigue desarrollar un nuevo método de detección que sea más fácil y sea menos costoso, es decir, buscamos diseñar un sensor de fácil uso que sea capaz a tiempo real de determinar la presencia o no de hierro en la muestra y cuantificarla.

Bajo esta premisa, se pretende desarrollar un nuevo sensor colorimétrico aprovechando las propiedades redox características de los polioxometalatos previamente descritos PMO y PMA para la detección de los nutrientes fundamentales para seres vivos, concretamente la cantidad de hierro en muestras de diferente naturaleza. Con este propósito se llevará a cabo una serie de experimentos con diferentes condiciones químicas donde se determinarán las mejores condiciones para la puesta a punto de este nuevo método de detección.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar un método colorimétrico de bajo coste y fácil uso para la determinación de hierro en muestras biológicas y agrícolas.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de POMs para ser reducidos por hierro (Fe^{2+}) y generar un cambio de color de transparente (POM) a azul (POM reducido).
- Obtener una recta patrón que correlacione la concentración de Fe^{2+} con la intensidad del color del POM reducido.
- Elegir las mejores condiciones para el diseño del método colorimétrico y establecer el límite de detección del mismo.

Estudiar esta reacción con otros iones metálicos para determinar la especificidad del sensor por Fe^{2+} .

Aplicar el método para determinar hierro en suelos.

Aplicar el método para determinar la cantidad de hierro en la proteína ferritina.

3. METODOLOGÍA

3.1 Descripción general de las técnicas utilizadas.

3.1.1 Equipamiento y material utilizado

Para la preparación de las diferentes disoluciones, los reactivos se pesan empleando una balanza BOECO Balance BAS 31 plus ($d = 0,1$ mg).

En el desarrollo de este trabajo se emplea la misma técnica para las medidas de absorbancia de las muestras analizadas, la espectrofotometría de ultravioleta-visible (UV-Vis). Para ello, se utiliza el espectrofotómetro Cary UV-Vis Multicell Peltier donde se emplean cubetas para las medidas. Por otro lado, se utilizan placas de 96 pocillos que son medidas en el lector de placas Nanoquant Infinite M200 Pro que permite realizar varias medidas de absorbancia en poco tiempo.

3.1.2 Reactivos utilizados

Los reactivos tierra Compo Sana, PMA ($H_3[P(Mo_3O_{10})_4] \cdot xH_2O$) (CAS: 51429-74-4), sulfato ferroso heptahidratado $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (CAS: 7782-63-0), dihidrato de molibdato sódico $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (CAS: 10102-40-6), fosfato sódico dibásico heptahidratado $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ (CAS: 7782-85-6), PTA ($H_3[P(W_3O_{10})_4] \cdot xH_2O$, CAS: 12501-23-4), nitrato férrico nonahidratado $Fe_2(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (CAS: 15244-10-7), clorhidrato de hidroxilamina $NH_2OH \cdot HCl$ (CAS: 5470-11-1), apoferritina (CAS: 9013-31-4) y ferritina bazo de caballo (CAS: 9013-31-4) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

3.2 Síntesis PMO

PMO $Na_6[P_2Mo_{18}O_{62}] \cdot (H_2O)_{24}$ se sintetiza disolviendo 24,19 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ y 1,52 g de $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ en 15 mL de $HClO_4$ 70% y se lleva hasta 100 mL con H_2O . La disolución se deja en una estufa a 40 °C y hasta la aparición de unos cristales amarillos. La mezcla no se debe dejar evaporar completamente. La disolución que nos queda después de evaporar se filtra y secamos los cristales. Por último, se realiza un espectro de IR el cual muestra las bandas características del polianión. IR (KBr pellet, cm^{-1}): 1078 (ν P-O vs.), 941 (ν Mo=O vs.), 906 (ν Mo-O-Mo vs.), 778 (ν Mo-O-Mo vs.).¹⁷

3.3 Reacción de iones metálicos con los POMs.

Se examina la reacción entre los tres polioxometalatos, PMO, PMA y PTA con los iones metálicos Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} . Para ello se prepararán disoluciones stock 5 mM de cada uno de los polioxometalatos pesando 456, 723,2 y 838 mg de PMA, PTA y PMO respectivamente y disolviéndolos en 10 mL de H_2O . Por otro lado, se prepararán 20 mL de disolución acuosa a concentración 2 mM de Fe^{2+} y Cd^{2+} pesando 11,1 y 30,7 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y $CdSO_4$ respectivamente y disolución 5 mM de Mn^{2+} y Cu^{2+} pesando

16,9 y 24,9 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ respectivamente. Se toma 750 μL de las disoluciones stock de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y CdSO_4 y 300 μL de las disoluciones stock de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y se llevan a los diferentes eppendorfs donde también se añade 150 μL de las disoluciones stock de los diferentes polioxometalatos. Para finalizar se añade H_2O hasta alcanzar un volumen total de 1,5 mL de manera que las concentraciones finales de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CdSO_4 , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ son 1 mM y la de PMO, PMA y PTA es de 0,5 mM. Posteriormente, se toman 200 μL de cada eppendorf por duplicado y se llevan a pocillos en una placa de 96. Se realiza una medida de espectro completo desde 400 hasta 900 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro.

3.4 Optimización de la determinación de hierro con polioxometalatos.

3.4.1 Estudio de diferentes concentraciones de hierro frente a PMO y PMA.

En primer lugar, se realiza un barrido de concentraciones de 0 a 1,6 mM de Fe^{2+} frente a PMO y PMA. Se prepara una disolución acuosa de Fe^{2+} de concentración 2 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y disoluciones stock 25 mM de PMO y PMA del mismo modo que se ha indicado en el apartado anterior.

A continuación, se preparan en diferentes eppendorfs concentraciones de Fe^{2+} tomando de la disolución stock de Fe^{2+} 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720, 780, 840, 900 μL completando con H_2O hasta un volumen final de 1200 μL . Por último, en cada eppendorf se añaden 300 μL de la disolución stock 25 mM de PMO o PMA según corresponda de manera que queda una concentración final de PMO o PMA de 5 mM y concentraciones de Fe^{2+} de 0; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32; 0,4; 0,48; 0,56; 0,64; 0,72; 0,8; 0,88; 0,96; 1,04; 1,12; 1,2 mM. Posteriormente, se toman 200 μL de cada eppendorf por duplicado y se llevan a pocillos en una placa de 96. Se realiza una medida de espectro completo desde 400 hasta 900 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro.

3.4.2 Recta patrón para la determinación de Fe^{2+} con PMO y PMA

Para realizar una recta patrón, se estudia la reacción de PMA y PMO con concentraciones crecientes de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para ello, se prepara una disolución stock de Fe^{2+} 100 mM pesando 27,8 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que se disuelven en 1 mL de H_2O destilada. A continuación, se realizan una serie de disoluciones seriadas, tomando 100 μL de la disolución stock que se llevan a un eppendorf donde se completa con H_2O hasta un volumen final de 1 mL y así consecutivamente para obtener nuevas disoluciones stock con concentraciones de 10, 1 y 0,1 mM.

Para la recta patrón con PMO, se preparan en una serie de eppendorfs diferentes disoluciones de Fe^{2+} tomando 0, 20 y 40 μL de la disolución stock 0,1 mM, luego 20, 40, 60, 80, 120 y 160 μL de la disolución stock 1 mM y, por último, 20, 24, 28, 32, 36 y 40 μL de la disolución stock 10 mM. Se completan todas ellas a un volumen final de 200 μL con H_2O . Posteriormente, en una placa de 96 pocillos se añaden a

cada pocillo 80 μL de la disolución stock de PMO 25 mM, 70 μL de agua y 50 μL de cada eppendorf preparado anteriormente. De este modo, las concentraciones finales de Fe^{2+} son 0; 2,5; 5; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400; 450 y 500 μM y la de PMO 10 mM.

También se prepara una recta patrón siguiendo la misma metodología descrita anteriormente con PMA pero en otro rango de concentraciones de Fe^{2+} . En este caso, se toman 0, 4, 20, 40, 60 y 80 μL de la disolución stock 1 mM y 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72 μL de la disolución stock 10 mM y llevándolas todas ellas a un volumen final de 200 μL con H_2O . De nuevo en una placa de 96 pocillos, se añaden a cada pocillo 80 μL de la disolución stock de PMA 25 mM, 70 μL de agua y 50 μL de cada eppendorf preparado anteriormente. En este caso, las concentraciones finales de Fe^{2+} son 0, 5, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, μM y la de PMA 10 mM.

Las muestras se preparan por duplicado y se realiza una medida de espectro completo desde 400 hasta 900 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro.

3.4.3 Reacción de la hidroxilamina con PMO y PMA

En primer lugar, se prepara una disolución stock de 10% (m/v) hidroxilamina pesando 10 g y disolviéndolo en 100 mL de H_2O . De la disolución stock se toman 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 μL que se ponen en eppendorfs y se completa con H_2O hasta 1 mL. De esta manera tenemos concentraciones de hidroxilamina desde 1% hasta 8%.

A continuación, se diluye cada disolución 5 veces tomando 40 μL de hidroxilamina que se llevan hasta un volumen final de 200 μL con H_2O . De aquí, se toman ahora 50 μL por duplicado que se llevan a la placa donde previamente hay 80 μL de PMO o PMA (según corresponda) y 70 μL de H_2O . De este modo, las concentraciones finales de hidroxilamina quedan como 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35 y 0,4 % (m/v). Se realizan medidas de espectro completo desde 400 hasta 900 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro cada 2 minutos durante un total de 30 minutos.

3.4.4 Recta patrón para la determinación de Fe^{3+} con PMA

Primeramente, se prepara una disolución stock de Fe^{3+} de 100 mM pesando 40,4 mg y disolviéndolo con H_2O hasta un volumen de 1 mL.

A continuación, se realizan una serie de disoluciones seriadas, tomando 100 μL de la disolución stock que se llevan a un eppendorf donde se completa con H_2O hasta un volumen final de 1 mL y así consecutivamente para obtener nuevas disoluciones stock con concentraciones de 10 y 1 mM. Por otro lado, se prepara una disolución de clorhidrato de hidroxilamina al 8% (m/v) pesando 800 mg de reactivo y disolviéndolo en 10 mL de H_2O .

A continuación, se preparan una serie de eppendorfs donde prepararemos disoluciones de Fe^{3+} -hidroxilamina. Al añadir el hierro, se toman 0, 4, 20, 40, 60 y 80 μL de la disolución stock 1 mM y 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80 μL de la disolución stock 10 mM. Después, se añade a cada eppendorf 40 μL de la disolución stock de hidroxilamina al 8% y se completan todos hasta un volumen final de 200 μL con H_2O . Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se añaden a cada pocillo 80 μL de la disolución stock de PMA 25 mM, 70 μL de agua y 50 μL de cada eppendorf preparado anteriormente. En este caso, las concentraciones finales de Fe^{3+} son 0, 5, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μM y la de PMA 10 mM.

Las muestras se preparan por duplicado y se realiza una medida de espectro completo desde 400 hasta 900 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro.

3.5 Determinación del contenido de hierro en tierra

3.5.1 Determinación de Fe^{2+} en tierra sin modificación del pH.

En primer lugar, se pesa 1g de tierra, al que se añaden alrededor de 3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y a 10 mL de H_2O . La concentración molar final de Fe^{2+} se calcula de acuerdo a la masa de reactivo pesada y esta ha de estar entorno a 1 mM. La mezcla se deja agitando y se toman alícuotas cada 5 minutos. De cada alícuota se toman 50 μL que se añaden a un pocillo de una placa de 96 junto con 80 μL de la disolución stock 25 mM de PMA y se completan con 70 μL de H_2O . Se mide la absorbancia a 840 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro.

3.5.2 Determinación de Fe^{2+} en tierra con modificación del pH.

En primer lugar, se pesa 1 g de tierra, al que se añaden alrededor de 3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 8 mL de HCl 0'5 M. La concentración molar final de Fe^{2+} se calcula de acuerdo a la masa de reactivo pesada y esta ha de estar entorno a 1 mM. La mezcla se deja agitando y se toman alícuotas cada 5 minutos hasta un total de 15. De cada alícuota se toman 50 μL que se añaden a un pocillo de una placa de 96 junto con 80 μL de la disolución stock 25 mM de PMA y se completan con 70 μL de H_2O . Se mide la absorbancia a 840 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro. Las muestras se analizan por duplicado y se calcula el promedio y desviación estándar y errores absolutos y relativos de las concentraciones obtenidas en el tratamiento de datos.

3.5.3 Determinación de Fe^{3+} en tierra

En primer lugar, se pesa 1 g de tierra, a los que se añaden alrededor de 4 mg de $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, 2 mL de clorhidrato de hidroxilamina al 8% y 8 mL de HCl 0'5 M. La concentración molar final de Fe^{2+} se calcula de acuerdo a la masa de reactivo pesada y esta ha de estar entorno a 1 mM. La mezcla se deja

agitando y se toman alícuotas cada 5 minutos hasta un tiempo total de 45 minutos. De cada alícuota se toman 50 μL que se añaden a un pocillo de una placa de 96 junto con 80 μL de la disolución stock 25 mM de PMA y se completan con 70 μL de H_2O . Se mide la absorbancia a 840 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro. Las muestras se analizan por duplicado y se calcula el promedio y desviación estándar y errores absolutos y relativos de las concentraciones obtenidas en el tratamiento de datos.

3.5.4 Determinación de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en tierra

Se pesa 1 g de tierra, a los que se añaden alrededor de 2 mg de $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, alrededor de 3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 8 mL de HCl 0,5 M. La concentración molar final de Fe^{2+} e Fe^{3+} se calcula de acuerdo a las masas de reactivos pesadas y la de hierro total será la suma de ambas. La mezcla se deja agitando y se toman alícuotas cada 5 minutos. Después de 20 minutos se adicionan 2 mL de clorhidrato de hidroxilamina al 8% y se vuelven a tomar alícuotas cada 5 minutos hasta un tiempo total de 1 hora y 20 minutos. De cada alícuota se toman 50 μL que se añaden a un pocillo de una placa de 96 junto con 80 μL de la disolución stock 25 mM de PMA y se completan con 70 μL de H_2O . Se mide la absorbancia a 840 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro. Las muestras se analizan por duplicado y se calcula el promedio y desviación estándar y errores absolutos y relativos de las concentraciones obtenidas en el tratamiento de datos.

3.6 Determinación de iones de hierro en apoferritina y ferritina

3.6.1 Eliminación de hierro de apoferritina

Para la obtención de apoferritina libre de hierro, se realizó una diálisis durante dos días. Se tomaron 8 μL de ferritina que se diluyeron en 1992 μL de buffer de acetato sódico 0,1 M. Esta disolución se coloca en el interior de la membrana de diálisis (MWCO: 12400) junto con un exceso de hidrosulfito sódico y ferrozina. La diálisis se realiza durante 48 h frente a 1 L de NaCl 0,1 M que se va renovando cada 3 horas. Al cabo de dos días, el color característico del complejo creado por la ferritina y la ferrozina (morado intenso) se pierde y la membrana de diálisis queda completamente transparente. Esto es indicativo de que proteína ha perdido el hierro que puede contener y en la membrana ya tenemos la apoferritina limpia. Para comprobarlo se hace un espectro de UV-Visible utilizando CARY y se registra el máximo de absorbancia a 280 nm. Se calcula la concentración de proteína usando la ley de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción que es 468000 mol^{-1} (cubetas de 1 cm de paso óptico).

3.6.2 Determinación de la cantidad de hierro por proteína.

Para determinar la cantidad de hierro en la proteína ferritina se siguen dos métodos distintos. Para ello, se

prepara por duplicado una disolución de ferritina tomando 8 μL que se disuelven en 1992 μL de H_2O .

A una de ellas se añade un exceso de hidrosulfito sódico y ferrozina. La muestra se diluye 10 veces y se toma un espectro de ultravioleta-visible a 562 nm. La concentración de hierro se calcula utilizando el coeficiente de extinción del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$ que es de $27900 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A la otra, se añaden 40 mg de clorhidrato de hidroxilamina y la mezcla se pone en agitación durante 5 minutos. De esta mezcla de proteína se cogen 50 μL que se llevan a una placa de 96 pocillos donde se añaden 80 μL de PMA 25 mM y 70 μL de H_2O . Se mide la absorbancia a 840 nm utilizando el espectrofotómetro Nanoquant Infinite M200 Pro y se calcula la concentración de hierro en la muestra.

Finalmente, utilizando el dato de concentración molar de hierro obtenido en cada caso, se calcula la cantidad de hierro por proteína utilizando la relación $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{Proteína apoferritina}]$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Reacción de iones metálicos con los polioxometalatos

En primer lugar, se pretende detectar la presencia de Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} mediante la capacidad que presentan estos iones de oxidarse a la vez que reducen a PMO, PMA y/o PTA.

En un primer experimento se utilizó PMA a concentración 0,5 mM frente a una concentración 1 mM de los metales mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, donde se observa que aparece la banda de ultravioleta-visible centrada en 740 nm característica del PMA reducido solo frente a Fe^{2+} y no para el resto de los metales ensayados.

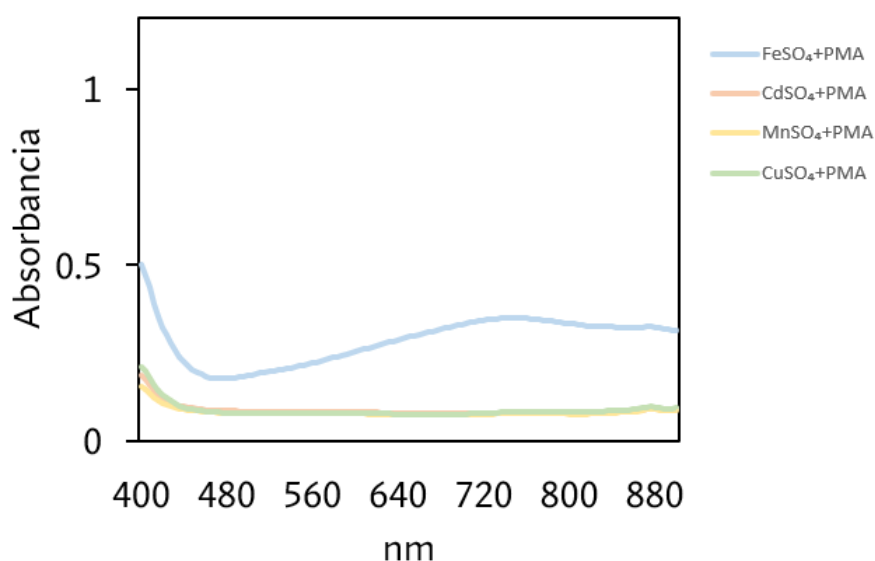


Figura 3. Espectro PMA frente a los diferentes metales

Cuando se realiza el mismo experimento en presencia de PMO se observa que aparece la banda típica de PMO reducido centrada en 780 nm frente a Fe^{2+} . En este segundo experimento se observa que tampoco hay interacción de los otros metales con el PMO. Los resultados se muestran en la Figura 4.

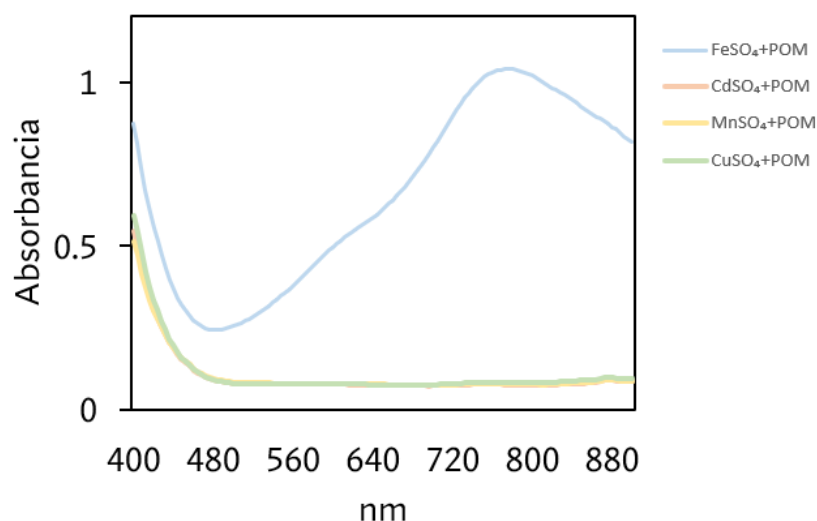


Figura 4. Espectro PMO frente a los diferentes metales

La diferencia entre ambos experimentos es que a la misma concentración de Fe^{2+} con PMO conseguimos una mayor absorción (mayor intensidad del color) que con PMA.

Cuando se probó con PTA, no se obtuvo ninguna reducción y por tanto no se detectó ninguna banda, por lo que podemos afirmar que no existe interacción entre PTA y los diferentes metales ensayados. Los resultados se muestran en la Figura 5.

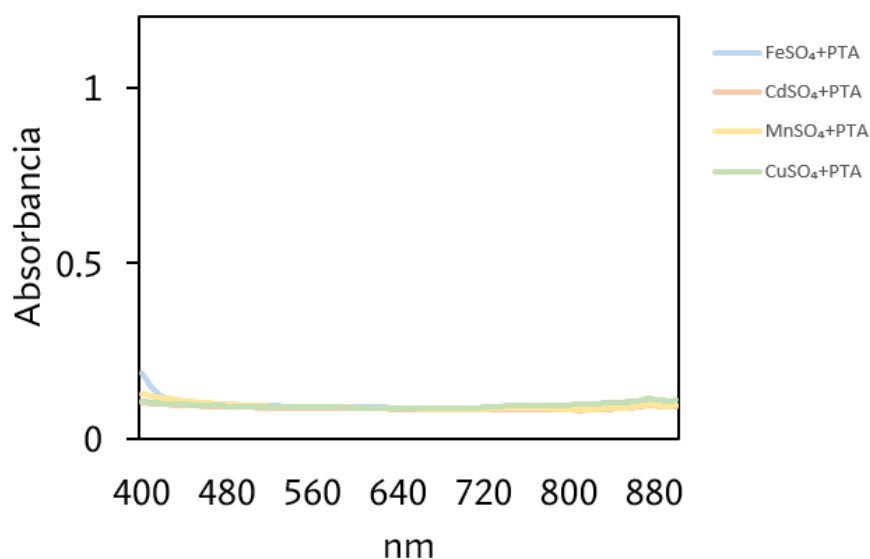


Figura 5. Espectro PTA frente a los diferentes metales

De los resultados de este experimento podemos determinar que el Fe^{2+} es capaz de reducir tanto a PMO como a PMA, mientras que el resto de metales no son capaces de reducir a dichos polioxometalatos, lo que es de interés puesto que nos permitiría detectar Fe^{2+} en muestras que contengan estos otros iones metálicos.

4.2 Optimización de la determinación de hierro mediante polioxometalatos

Una vez establecido que solo el Fe^{2+} es capaz de reducir a PMA y PMO, se procedió a optimizar este proceso para desarrollar un sensor de hierro con potencial aplicación en muestras reales. Para ello, es fundamental conocer si existe una relación lineal entre la concentración de hierro y la intensidad de la banda de absorción típica de ambos polioxometalatos reducidos, así como, establecer la concentración mínima de Fe^{2+} que se puede determinar con este método (sensibilidad del método). Además, se pretende que el método permita detectar también el Fe^{3+} presente en una muestra mediante un proceso en dos etapas, la reducción completa de Fe^{3+} a Fe^{2+} y seguidamente la determinación de Fe^{2+} con PMO o PMA. En este último proceso será necesario seleccionar un reductor de Fe^{3+} que no afecte a PMO o PMA.

4.2.1 Análisis de diferentes concentraciones de Fe^{2+} con PMO y PMA

En primer lugar, se pretende establecer si la intensidad de la banda de los polioxometalatos reducidos a una concentración fija aumenta al aumentar la concentración del Fe^{2+} y si en tal caso, la relación es lineal. En la Figura 6 se muestran los espectros de absorción de PMO frente a concentraciones crecientes de Fe^{2+} y donde se observa que el máximo de la banda, centrado en 780 nm, aumenta al aumentar la concentración de Fe^{2+} desde 0,1 mM hasta 1,2 mM y que esto lo hace de forma lineal.

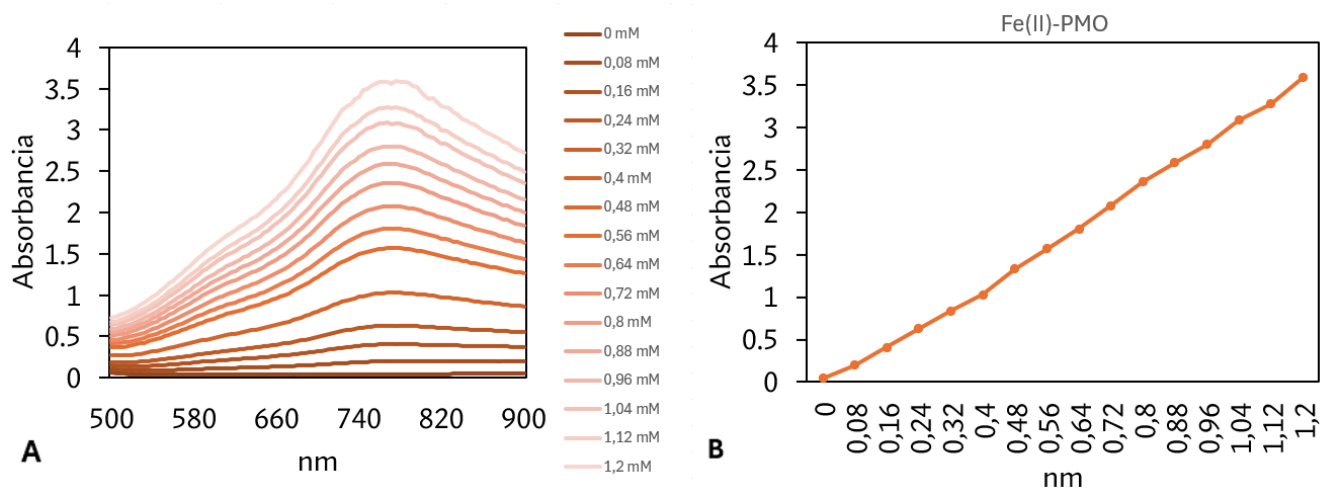


Figura 6. A. Espectro PMO frente a diferentes concentraciones de Fe^{2+} . B. Absorbancia máxima a 780 nm frente a las concentraciones de Fe^{2+} .

Sabiendo que el PMA también es sensible al Fe^{2+} se procedió a realizar el mismo experimento con este otro polioxometalato. Los resultados se muestran en la Figura 7, donde de nuevo podemos observar que existe un aumento de la intensidad de la señal cuando aumenta la concentración de Fe^{2+} y que la relación existente metal-PMA es lineal. A su vez, se estudia la linealidad también para la absorbancia a 840 nm

pues las concentraciones más bajas tienen el máximo de absorbancia en esta longitud de onda.

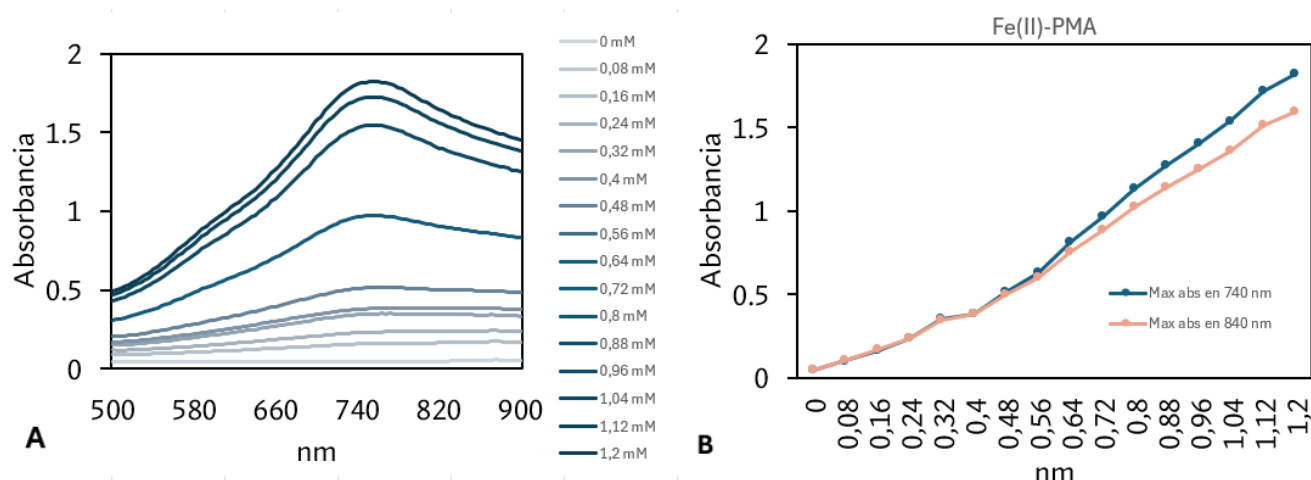


Figura 7. A. Espectro PMA frente a diferentes concentraciones Fe^{2+} . B. Absorbancia máxima a 740 y 840 nm frente a las concentraciones de Fe^{2+} .

4.2.2 Recta patrón para la determinación de Fe^{2+} con PMO y PMA

Tras establecer que la intensidad de la banda aumenta tanto para PMO como PMA cuando aumenta la concentración de hierro, y conociendo en qué rango de concentraciones ocurre, se procedió a repetir las medidas y establecer una zona lineal que cumpla la ley de Lambert-Beer, calculándose además la recta de calibrado correspondiente y el valor de R cuadrado. En esta ocasión también, se aumenta la concentración de los polioxometalatos de 5 a 10 mM para así ser capaces de llegar a concentraciones menores de Fe^{2+} .

Para ello, se tuvo en cuenta el rango de concentraciones de hierro que dan absorbancias máximas de PMO y PMA reducido que quedan en valores entre 0 y 1, lo que corresponde a concentraciones de Fe^{2+} de 0 a 500 μM para PMO y de 0 a 900 μM para PMA. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 8 y 9 para PMO y PMA, respectivamente. Tal y como se observa en las figuras, se obtiene una tendencia lineal. Para PMO presenta una pendiente 0,0023 y un R cuadrado de 0,9908 y en el caso de PMA la pendiente es de 0,001 y el R cuadrado 0,9927. A su vez, se puede determinar que la concentración mínima de hierro que podemos cuantificar con este sistema es de 5 μM para ambos polioxometalatos.

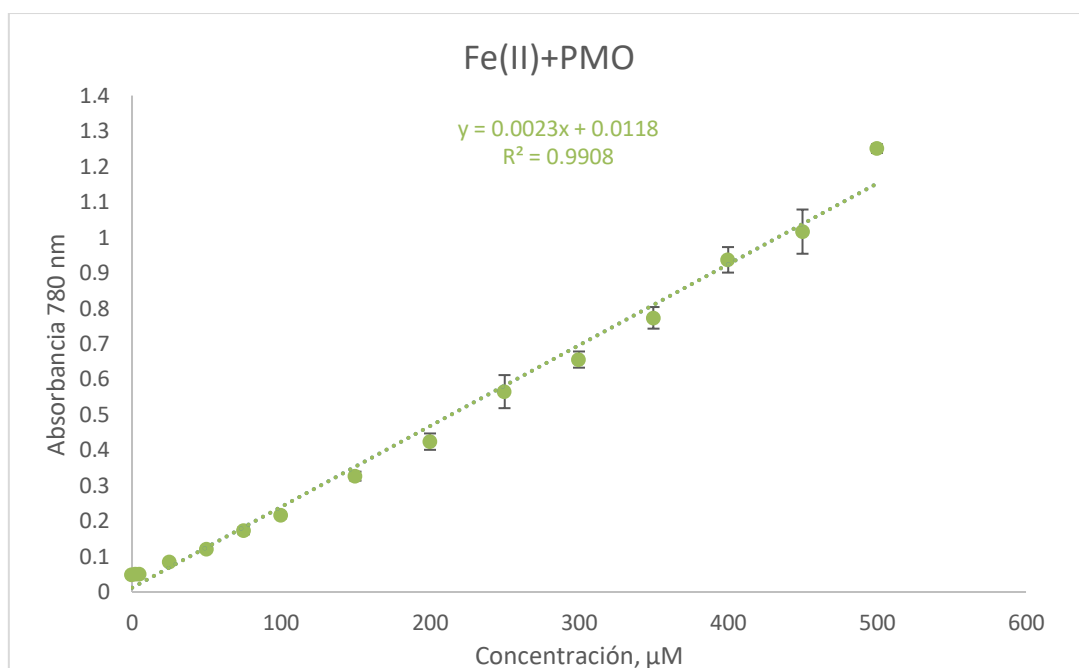


Figura 8. Recta patrón de Fe^{2+} con PMO

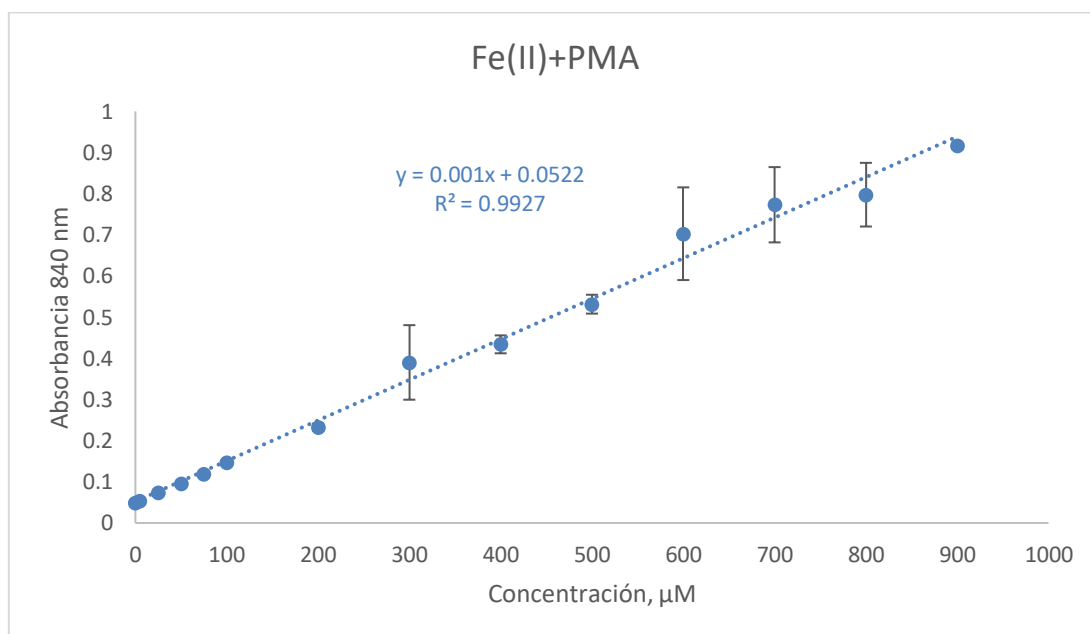


Figura 9. Recta patrón de Fe^{2+} con PMA

4.2.3 Reacción de la hidroxilamina con PMO y PMA

Una vez definida la linealidad para determinar Fe^{2+} mediante el empleo tanto de PMO como de PMA, procedimos a establecer un método para la determinación de Fe^{3+} y por tanto, la determinación del contenido total de hierro en una muestra. Para ello, tal y como se ha descrito con anterioridad será necesario realizar una reducción previa del Fe^{3+} a Fe^{2+} para que este último sea detectado por los polioxometalatos. El clorato de hidroxilamina es un reductor químico ampliamente utilizado para esta labor, sin embargo,

será necesario establecer si este mismo compuesto es capaz a su vez de reducir a PMO o PMA y si esta posible reducción sería una interferencia para el método de detección de Fe^{2+} que estamos desarrollando. En esta labor, se realizó un experimento donde se utilizó un gradiente de concentraciones crecientes de clorato de hidroxilamina de entre 0,05 y 0,4 % (m/v) frente a PMO y PMA 10 mM, que son las concentraciones que se han empleado en el diseño de las correspondientes rectas de calibrado. Para conocer si existe interferencia, se midió la absorbancia máxima a 780 nm para PMO y 840 nm para PMA frente a cada % de hidroxilamina durante 30 minutos tomando una medida cada 5. De este modo podremos ver si existe reacción entre los compuestos y si esta se da desde el primer momento como ocurre con el hierro o si necesita tiempo para producirse, estableciendo así qué concentración de hidroxilamina utilizar para reducir el Fe^{3+} sin que tengamos también reducción de uno u otro polioxometalato.

Para PMO, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10, donde se visualiza que existe un aumento de la absorbancia máxima a 740 nm con respecto al tiempo de reacción, siendo a tiempos más largos la interacción entre estos dos compuestos mayor. A su vez, este comportamiento se da para todas las concentraciones de hidroxilamina ensayadas, por lo que podemos determinar que PMO sí reacciona frente a este reductor, aunque se precisa cierto tiempo para ver la respuesta.

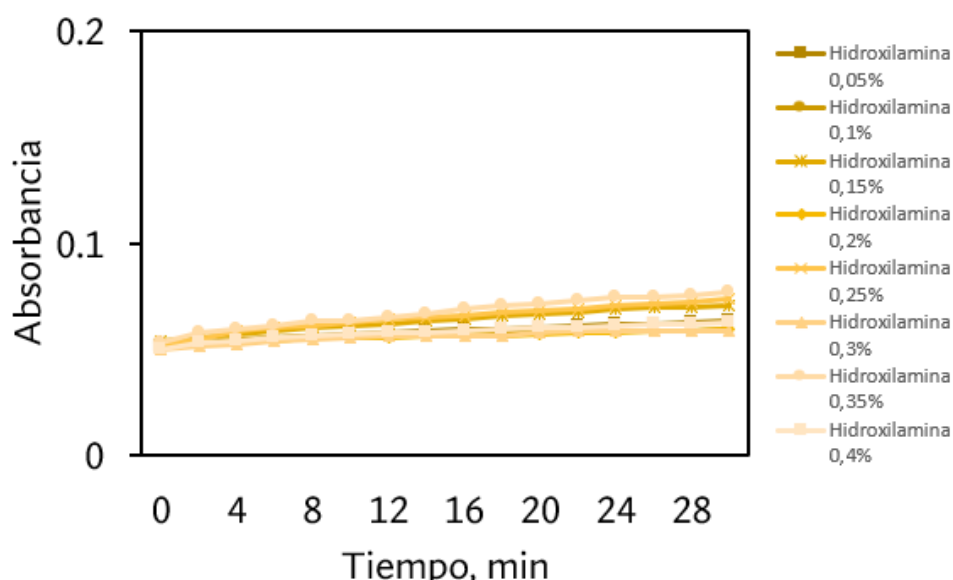


Figura 10. Absorbancia máxima a 740 nm de PMO frente a diferentes concentraciones de hidroxilamina

Por su parte, para el caso de PMA, las señales de absorbancia máxima se podrían definir como mínimas o casi insignificantes, ya que a pesar de que pase tiempo, éstas aumentan muy poco y este aumento es menor que el detectado para el PMO. Estos resultados se muestran en la Figura 11.

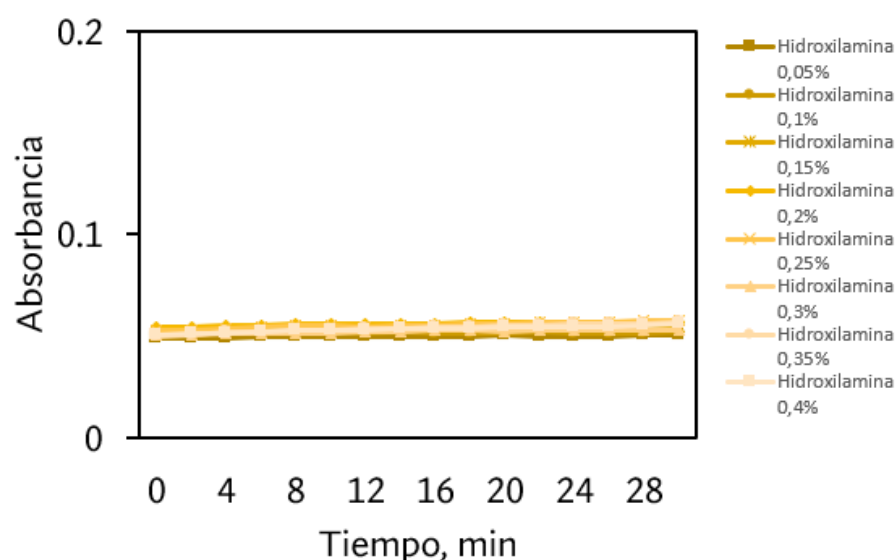


Figura 11. Absorbancia máxima a 840 nm de PMA frente a diferentes concentraciones de hidroxilamina

El hecho de que PMA no muestre interacción con el clorato de hidroxilamina a ninguna de las concentraciones probadas nos permite seleccionar este POM para nuestro método final. Además, se tomará la concentración máxima ensayada como la adecuada para reducir el Fe^{3+} y así conseguir su reducción total de forma rápida.

4.2.4 Recta patrón para la determinación de Fe^{3+} con PMA

Del mismo modo que se realizó la recta patrón para Fe^{2+} se procede ahora a realizar una recta patrón que parta de concentraciones conocidas de Fe^{3+} que son previamente reducidas en su totalidad a Fe^{2+} utilizando clorato de hidroxilamina y posteriormente examinadas por su respuesta frente a PMA. Esta recta ha de ser similar a la ya obtenida para Fe^{2+} -PMA.

Para ello, se sigue el protocolo descrito en la sección de metodología en la que el clorato de hidroxilamina a concentración 1,6% reacciona en primer lugar con las diferentes concentraciones de Fe^{3+} y posteriormente un volumen de esta reacción es mezclado con PMA 10 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

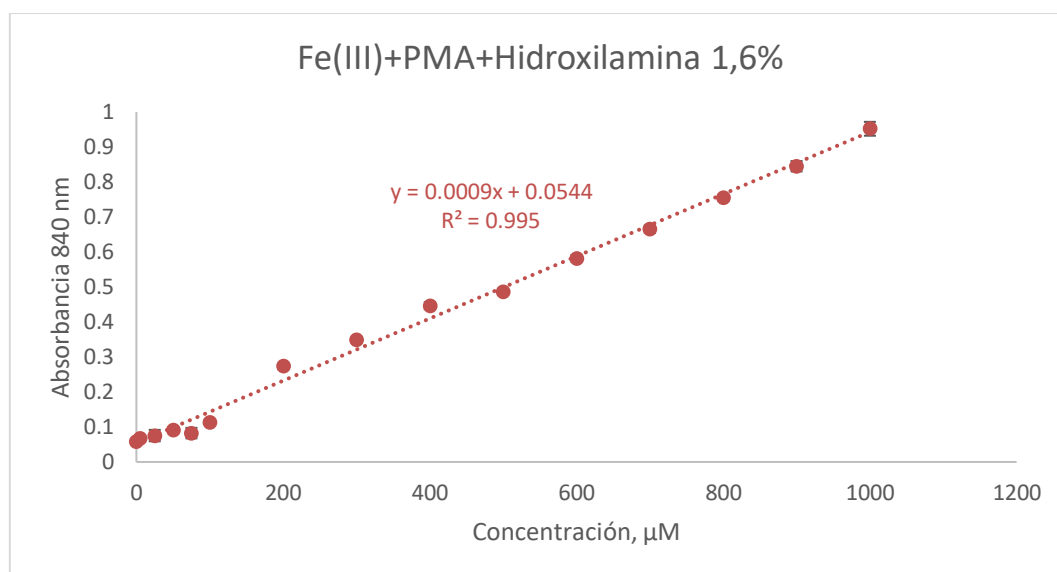


Figura 12. Recta patrón de Fe^{3+} con PMA e hidroxilamina

Tal y como era de esperar la recta de calibrado obtenida resulta muy similar a la de Fe^{2+} -PMA quedando la recta obtenida para Fe^{3+} -hidroxilamina-PMA como $y = 0,0009 + 0,0544$ ($R^2 = 0,995$) y la de Fe^{2+} -PMA como $y = 0,001 + 0,0522$ ($R^2 = 0,993$). Por tanto, se puede concluir que el uso de PMA permite la determinación directa de Fe^{2+} y que el uso de hidroxilamina, permite, primero la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , que posteriormente es determinado mediante PMA. En definitiva, usando PMA e hidroxilamina, podemos conocer la concentración total de hierro así como las cantidades exactas de cada uno de los iones, Fe^{3+} o Fe^{2+} .

4.3 Estudio del método para la determinación de hierro total en modelos de situaciones reales.

Una vez definidos todos los parámetros necesarios para la determinación de Fe^{2+} y Fe^{3+} , y por tanto de la cantidad de hierro total, dimos un paso más para probar la potencial aplicación de este método en situaciones reales. Para ello se utilizaron dos modelos de situaciones reales, por un lado, y como modelo de muestra agrícola, se determinó el contenido de hierro total en tierra para cultivo mediante la utilización de tierra a la que añadimos una concentración conocida de Fe^{2+} , Fe^{3+} o una mezcla de ambos. Por otro lado, y como modelo de muestra biológica, se determinó el contenido en hierro de la proteína ferritina y se obtuvo el número de átomos de hierro por proteína.

En ambos casos la metodología a seguir fue la misma. En primer lugar, y tras el tratamiento adecuado a la muestra se tomará una alícuota de la misma que será mezclada con PMA para determinar primero el contenido en Fe^{2+} de la muestra. Seguidamente, la muestra se tratará con clorato de hidroxilamina al 1,6 % y se tomará una alícuota que al ser mezclada con PMA permitirá determinar el contenido en hierro total de la muestra. El contenido de Fe^{3+} en la muestra se podrá calcular por la diferencia entre la cantidad

de hierro total y la de Fe^{2+} , según la expresión siguiente:

$$[\text{Fe}^{3+}] = [\text{Hierro total}] - [\text{Fe}^{2+}]$$

4.3.1 Determinación de Fe^{2+} en tierra

Para este experimento se utiliza una tierra comercial que hemos enriquecido con Fe^{2+} mediante la adición de una concentración conocida de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 mM). Para ello, se pesa 1g de tierra y se coloca en 8 mL de agua destilada a los que se añaden en este caso 3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ para tener una concentración final de Fe^{2+} de 1 mM en la muestra. La muestra se dejó en agitación y se tomaron alícuotas cada 5 minutos, que se mezclaron con PMA para medir la absorbancia correspondiente a 840 nm. Según la recta de calibrado previamente realizada y teniendo en cuenta la dilución que se ejerce a la muestra, la absorbancia teórica que se ha de registrar sería de 0,302. Sin embargo, cuando se toman alícuotas y se mide la absorbancia, el valor de la misma fue 0,052 y, además, ésta se mantiene en el tiempo o incluso va bajando. De hecho, el espectro completo registrado para una de las alícuotas (Figura 13) no muestra ninguna banda característica de la reducción de PMA. Esto podría indicarnos dos cosas, o bien el Fe^{2+} añadido no llega a disolverse en la muestra y/o se oxida por las condiciones o componentes de la tierra que estamos utilizando.

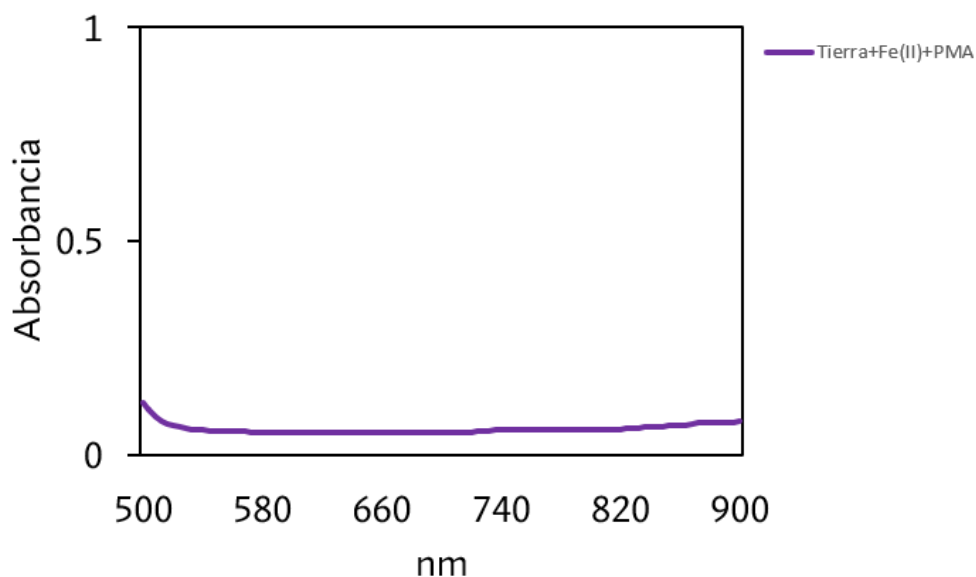


Figura 13. Espectro PMA frente a tierra con Fe^{2+}

Debido a estos resultados se decidió modificar el pH de la muestra que contiene la tierra para acidificarlo y comprobar si de esta manera el problema en la detección de Fe^{2+} es debido a una falta de solubilidad del ion metálico por pH. Por lo tanto, en esta ocasión, la tierra (1 g) se añadió sobre 8 mL de HCl 0,5 M junto con 3,3 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, lo que equivale a una concentración de hierro teórica de 1,48 mM. Se tomaron de nuevo alícuotas cada 5 minutos y se midió la absorbancia en el espectro UV-vis de su reacción con PMA 10 mM. En esta ocasión, y a cada tiempo, se registraron los valores de absorbancia que aparecen

recogidos en la tabla superior de la Figura 14, lo que equivale a concentraciones de $1,35 \pm 0,011$ mM, $1,34 \pm 0,011$ mM y $1,40 \pm 0,003$ mM para las medidas a 5, 10 y 15 minutos respectivamente, llegándose a alcanzar la concentración teórica de hierro en este intervalo de tiempo. Respecto al error absoluto cometido considerando la concentración teórica como exacta este sería de 0,08 mM, mientras que el error relativo sería de 0,054 o 5,4 %.

Tierra+Fe(II)+HCl(0.5 M)	Abs	[Fe(II)], μ M	Promedio	Dsvt
5'	0.40	1386	1355	0.01
5'	0.38	1323		
10'	0.38	1318	1349	0.01
10'	0.40	1380		
15'	0.40	1396	1403	0.00
15'	0.41	1411		

Figura 14. Determinación de Fe^{2+} en tierra con PMA

4.3.2 Determinación de Fe^{3+} en tierra enriquecida

Para este experimento se siguió la metodología anterior, es decir, se enriqueció tierra comercial pero en esta ocasión se utilizó $Fe_2(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ 1 mM. Por esta razón, se pesó 1 g de tierra y se colocó en 8 mL de HCl 0,5 M junto con 4,5 mg de $Fe_2(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ y 2 mL de una disolución de clorato de hidroxilamina al 8% de forma que el Fe^{3+} se pueda reducir y ser determinado por PMA. Esto equivale por tanto a una concentración teórica de hierro de 1,11 mM. Se tomaron alícuotas cada 5 minutos y se midió la absorbancia de su reacción con PMA (10 mM). Los valores de absorbancia aparecen recogidos en la tabla de la Figura 15 y se observa como tras 45 min de agitación, las absorbancias registradas dan una concentración de $1,01 \pm 0,009$ mM, valor próximo al total de hierro teórico calculado. En esta ocasión el error absoluto quedaría como 0,1 mM y el relativo como 0,9 o 9%.

Tierra+Fe(III)+HCl(0.5 M)+Hidroxilamina 1.6%	Abs	[Fe(II)], μ M	Promedio	Dsvt
20'	0.17	503	495	0.00
20'	0.16	487		
25'	0.20	636	626	0.00
25'	0.19	616		
30'	0.23	768	746	0.01
30'	0.22	724		
35'	0.24	827	816	0.00
35'	0.24	806		
40'	0.27	943	906	0.01
40'	0.25	869		
45'	0.29	1047	1019	0.01
45'	0.28	990		

Figura 15. Determinación de Fe^{2+} y Fe^{3+} con PMA a lo largo del tiempo

4.3.3 Determinación de hierro total en tierra enriquecida

Una vez establecidas las condiciones óptimas para determinar tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} de forma individual

en una muestra, se realizó otro experimento donde se enriqueció la tierra con ambas especies. Para ello, se pesó 1 g de tierra y se colocó en 8 mL de HCl 0,5 M junto con 1,7 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 2 mg de $\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, lo que equivale a una concentración teórica de hierro total de 1,38 mM, siendo la de Fe^{2+} de 0,76 mM y la de Fe^{3+} de 0,62 mM. Se tomaron alícuotas cada 5 minutos y se midió la absorbancia en el espectro UV-vis tras su reacción con PMA (10 mM). Los valores de absorbancia se registran en la tabla superior de la Figura 16, lo que equivale a concentraciones de $0,96 \pm 0,003$ mM, $0,84 \pm 0,002$ mM y $0,68 \pm 0,004$ mM. Esta concentración equivaldría a la de Fe^{2+} puesto que aún no se ha añadido clorato de hidroxilamina a la muestra que permita la reducción del Fe^{3+} y tal y como se puede observar se va produciendo una disminución de la misma con el tiempo, lo que podría deberse a que el Fe^{2+} esté sufriendo una oxidación parcial. Por ello se decidió añadir a la muestra 2 mL de una disolución de clorato de hidroxilamina al 8%, para que de esta manera el posible Fe^{2+} oxidado a Fe^{3+} se redujera de nuevo y pudiera ser determinado por PMA. Considerando que tras la adición de este reductor la muestra sufre una dilución, la concentración teórica de hierro total ahora sería de 1,11 mM, es decir, la suma de Fe^{2+} (0,61 mM) e Fe^{3+} (0,50 mM). De esta manera, en este punto, se observa como las absorbancias registradas comienzan de nuevo a aumentar con el tiempo hasta que tras 1h y 20 minutos de reacción se registra una concentración de $1,09 \pm 0,001$ mM (Figura 16). De este modo, y para el cálculo de hierro total, el error absoluto quedaría como 0,02 y el relativo como 0,02 o 2%.

Podemos por tanto concluir que nuestro método es válido y que nos permite determinar el total de hierro añadido a una muestra de tierra comercial, ya sea de forma individual para las especies de Fe^{2+} o Fe^{3+} o de forma conjunta para ambas.

Tierra+Fe(II)/Fe(III)+HCl(0.5 M)	Abs	[Fe(II)], μM	Promedio	Dsvt
5'	0.29	950	958	0.00
5'	0.29	967		
10'	0.26	846	840	0.00
10'	0.26	833		
15'	0.23	695	683	0.00
15'	0.22	671		



se añade 2 mL hidroxilamina 8%

Tierra+Fe(II)/Fe(III)+HCl(0.5 M)+Hidroxilamina 1.6%	Abs	[Fe(II)], μM	Promedio	Dsvt
20'	0.24	752	747	0.00
20'	0.24	742		
25'	0.22	683	685	0.00
25'	0.22	687		
30'	0.23	702	700	0.00
30'	0.23	698		
35'	0.23	713	723	0.00
35'	0.24	732		
40'	0.25	788	778	0.00
40'	0.24	769		
45'	0.26	829	818	0.00
45'	0.25	808		
50'	0.27	871	869	0.00
50'	0.27	867		
55'	0.29	931	926	0.00
55'	0.28	922		
1H	0.28	923	915	0.00
1H	0.28	907		
1H20'	0.32	1084	1087	0.00
1H20'	0.32	1089		

Figura 16. Determinación de Fe^{2+} y Fe^{3+} con PMA a lo largo del tiempo

4.4 Determinación de hierro en ferritina

El cuerpo humano ha desarrollado toda una maquinaria química específica para el transporte, utilización y almacenamiento de hierro. Entre este conjunto de proteínas y moléculas destinadas para tal fin, la ferritina juega un papel primordial, el almacenamiento de hierro en la célula. Puesto que el hierro es esencial para la célula pero es tóxico en exceso, cuando la célula tiene un exceso de hierro, éste es almacenado en forma no tóxica para que pueda ser utilizado con posterioridad cuando la célula lo requiera.

La ferritina es una proteína de alto peso molecular (450 KDa) de estructura esférica capaz de captar Fe^{2+} que la célula no necesita y almacenarlo en su interior como Fe^{3+} . De este modo, y gracias a la cavidad interior con la que cuenta, puede almacenar miles de átomos de hierro.¹⁸

Aunque la ferritina es una proteína intracelular, el hígado expulsa a la sangre ferritina por razones y mecanismos que todavía no son conocidos. La cantidad de ferritina en sangre correlaciona con el metabolismo de hierro, de tal forma que bajos contenidos de la ferritina ponen de manifiesto un proceso de anemia, mientras que altos contenidos, sugieren procesos inflamatorios en el hígado. Los análisis médicos existentes actualmente determinan la concentración de la proteína en sí, pero no la cantidad de

hierro en dicha proteína. Poder determinar la cantidad de hierro por proteína sería muy informativo puesto que revelaría el estado de los hepatocitos: un alto contenido en hierro pondría de manifiesto un exceso de hierro a nivel hepático, un bajo contenido, la existencia de déficit de hierro.

Existen métodos tradicionales para determinar a nivel de laboratorio cuál es la cantidad de hierro que contiene una ferritina de un tejido específico pero no existen métodos aprobados para uso clínico. El método de laboratorio más común utiliza la formación del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$ mediante la previa reducción de hierro ferritínico, la adición de ferrozina y estudio por espectroscopía UV-vis, mediante la medida de la banda de absorción a 562 nm para calcular la concentración de Fe^{2+} . Dado el interés, decidimos aplicar el método de detección de hierro desarrollado para determinar el contenido de hierro en una ferritina de bazo de caballo, considerada como ferritina estándar.

Para ello, primeramente determinamos la concentración de la proteína ferritina, eliminado todo el hierro presente en la proteína. Esto se consigue gracias a un proceso de diálisis en presencia de un reductor químico (el hidrosulfito sódico) que permite reducir todo el hierro presente en la muestra para que después sea captado por ferrozina y así eliminado del medio. El proceso de diálisis se realiza durante 48 horas hasta que desaparece el color rosa-violeta característico del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{ferrozina})_3]^{2+}$. De este modo, se obtuvo la concentración de proteína aplicando la ley de Lambert-Beer a la medida del espectro de ultravioleta visible con máximo a 280 nm y con el coeficiente de extinción conocido de 468000 mol^{-1} (cubetas de 1 cm), estableciéndose una concentración de proteína de $0,66 \mu\text{M}$.

Seguidamente, para conocer la concentración de hierro total en la proteína, usamos el método tradicional, previamente explicado. Para ello, se preparó de nuevo una muestra de proteína igual que al anterior a la que se añadió un exceso de hidrosulfito sódico (para reducir todo el Fe^{3+}) y ferrozina (para captar el Fe^{2+} formado). En esta ocasión, en vez de dializar, se deja 5 minutos reaccionando y a continuación, se tomó una alícuota y se midió la absorbancia a 562 nm. El valor de absorbancia registrado equivale una concentración total de hierro de $0,189 \text{ mM}$.

Para aplicar nuestro método, se preparó una nueva muestra de proteína a la que se añadieron 40 mg de clorato de hidroxilamina y se dejó agitando 5 minutos. Se tomaron alícuotas cada 5 minutos y se midió la absorbancia de su reacción con PMA (10 mM). Los valores de absorbancia se registran en la tabla de la Figura 17, donde se puede observar que cuando se alcanzan los 30 minutos la concentración de hierro es de $0,184 \text{ mM}$, valor muy próximo al determinado por el método tradicional de la ferrozina. Por tanto, podemos establecer que en 30 minutos de reacción determinamos la misma cantidad de hierro que utilizando el otro método descrito.

A partir de la relación de las concentraciones de hierro, de $0,184 \text{ mM}$ y proteína, de $0,66 \mu\text{M}$, se obtuvo un valor de 278,8 átomos de hierro por ferritina.

Ferritina+Hidroxilamina 1.6%	Abs	[Fe(II)] μM	Promedio	Dsvt
5'	0.07	49	46	0.00
5'	0.06	43		
10'	0.07	63	62	0.00
10'	0.07	61		
15'	0.07	88	101	0.00
15'	0.08	114		
20'	0.08	131	128	0.00
20'	0.08	125		
25'	0.09	148	157	0.00
25'	0.09	166		
30'	0.10	183	184	0.00
30'	0.10	185		

Figura 17. Determinación de hierro mediante el sensor PMA a lo largo del tiempo

5. CONCLUSIÓN

Tras la realización de este trabajo se ha podido llevar a cabo el diseño de un método para la determinación de hierro total en una muestra, método que ha sido probado utilizando dos modelos biotecnológicos como son el contenido en hierro en tierra apta para cultivo o el contenido en hierro en la proteína ferritina. De forma más específica las conclusiones han sido:

1. Se ha desarrollado un método colorimétrico fácil, económico y rápido para determinar hierro en muestras de tierra y en la proteína ferritina. El método está basado en la reacción redox entre un polioxometalato (PMA o PMO) y Fe^{2+} . La reducción del PMA o PMO mediante Fe^{2+} hace que aparezca el color azul intenso del PMA o PMO reducido.
2. Se ha establecido que la correlación entre la intensidad del color azul (banda a 740 nm para PMA y 780 nm para PMO) y la concentración de Fe^{2+} es lineal, con un límite de detección por debajo de 1 mM Fe^{2+} .
3. La presencia de otros iones metálicos divalentes, como Cd^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} no afecta a la determinación de Fe^{2+} PMO puesto que dichos iones metálicos no reaccionan con PMO o PMA.
4. Utilizando hidroxilamina como reductor de Fe^{3+} es posible determinar el hierro total en una muestra y las concentraciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} utilizando PMA.
5. Es posible determinar la cantidad de hierro total y de Fe^{2+} y Fe^{3+} en tierras previamente enriquecidas con dichos iones metálicos.
6. El método desarrollado permite determinar la cantidad de hierro existente en la proteína ferritina.

6. REFERENCIAS

- [1] Menéndez Vázquez, L. C. (2020). Polioxometalatos heterometálicos que contienen metales 3d y 4f.
- [2] El Bakkali, B. (2016). Catalizadores heterogéneos basados en polioxometalatos: aplicaciones en reacciones de interés industrial y medioambiental.
- [3] Papaconstantinou, E. (1989). Photochemistry of polyoxometallates of molybdenum and tungsten and/or vanadium. *Chemical Society Reviews*, 18(0), 1–31
- [4] Zou, W.; González, A.; Jampaiah, D.; Ramanathan, R.; Taha, M.; Walia, S.; Sriram, S.; Bhaskaran, M.; Dominguez-Vera, J. M.; Bansal, V. Skin Color-Specific and Spectrally-Selective Naked-Eye Dosimetry of UVA, B and C Radiations. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1).
- [5] González, A.; Gálvez, N.; Clemente-León, M.; Dominguez-Vera, J. M. Electrochromic Polyoxometalate Material as a Sensor of Bacterial Activity. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (50).
- [6] Sánchez, M.; González, A.; Sabio, L.; Zou, W.; Ramanathan, R.; Bansal, V.; Dominguez-Vera, J. M. Photochromic Polyoxometalate-Based Enzyme-Free Reusable Sensors for Real-Time Colorimetric Detection of Alcohol in Sweat and Saliva. *Mater. Today Chem.* **2021**, 21, 100491
- [7] González Garnica, AI (2018). Materiales bioinspirados basados en bacterias: Aplicaciones biomédicas.
- [8] Acevedo-Sandoval, O., Ortiz-Hernández, E., Cruz-Sánchez, M., & Cruz-Chávez, E. (2004). El papel de óxidos de hierro en suelos. *Terra Latinoamericana*, 22(4), 485-497.
- [9] Zapata Hernández, R. D. (2004). Química de la acidez del suelo. *Facultad de Ciencias*.
- [10] Lázaro, J. D., Kidd, P., & Monterroso, C. (2002). Biodisponibilidad de metales en suelos y acumulación

en plantas en el área de Trás-os-Montes (NE Portugal): influencia del material original. *Edafología*, 9(3), 313-328.

[11] Lucena, J. J. (2009). El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes. *Revista Ceres*, 56(4), 527-535.

[12] Arrébola, J. R. (2000). *Caracoles terrestres de Andalucía*. Verlag nicht ermittelbar.

[13] González, D., Almendros, P., & Álvarez, J. M. (2009). Métodos de análisis de elementos en suelos: disponibilidad y fraccionamiento. *Anales de Química de la RSEQ*, 105(3), 205-205.

[14] Amador, L. R. T., Martínez, F. D. G., Hernández, L. J. M., Vergara, L. A. W., & Suárez, J. N. C. (2015). Niveles de metales pesados en muestras biológicas y su importancia en salud. *Revista Nacional de Odontología*, 11(21).

[15] Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J., & López, G. (1999). Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. *Arch Latinoamer Nutr*, 49(2), 106-113.

[16] Fernández Menéndez, S. (2012). *Determinación de hierro en muestras biológicas por IDA-ICP-MS* (Master's thesis).

[17] Strandberg, ROLF (1975). Polianiones multicomponente. 12. La estructura cristalina de Na₆Mo₁₈P₂O₆₂ (H₂O) 24, un compuesto que contiene aniones de 18-molibdodifosfato coordinados con sodio. *Acta Química. Scand., Ser. A*, 29, 350.

[18] González, A., Sabio, L., & Domínguez-Vera, J. M. (2023). Érase una vez el hierro. *Anales De Química De La RSEQ*, 119(2), 87. <https://doi.org/10.62534/rseq.aq.1830>