



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Puesta a punto de un método óptico para la determinación de la  
hormona tiroxina T4**

**José Ignacio Junquera San José**

**Julio 2016, Oviedo**



**Alfonso Fernández González**, técnico de los servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo; tutor del presente trabajo

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado *“Puesta a punto de un método óptico para la determinación de la hormona tiroxina T4”*

Ha sido realizado por el alumno **José Ignacio Junquera San José** bajo mi dirección, constituyendo su trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo

Oviedo, 11 de julio de 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alfonso Fernández González', written over a horizontal line.

Fdo. Alfonso Fernández Gonzalez

## Resumen

La tiroxina es una hormona tiroidea con actividad biológica que se caracteriza por contener yodo. Esta hormona cumple dos funciones principalmente en los seres humanos como son el desarrollo y la conservación de la homeostasis metabólica.

La fluorescencia se define como la emisión espontánea de radiación desde una especie excitada electrónicamente o vibracionalmente que no está en equilibrio térmico con su entorno.

La fosforescencia es un fenómeno similar a la fluorescencia en el cual ciertos electrones son excitados por una fuente de radiación, pasando a un nivel energético de mayor energía y cuando son desactivados por distintos procesos liberan parte de esa energía en forma de fotones.

La diferencia principal entre ambos fenómenos es que en la fosforescencia la liberación de energía por medio de fotones sucede con retraso, aún cuando la fuente estimulante ya no está presente, al contrario de la fluorescencia, en el cual la liberación de fotones es casi inmediata a su absorción.

En el presente trabajo se pretende determinar la tiroxina por métodos ópticos. Para ello se utilizarán principalmente 3 técnicas:

- Espectrometría UV-VIS: se caracteriza la tiroxina en disolución, realizando una recta de calibrado.
- Espectrofluorimetría: la tiroxina será caracterizada también en disolución, realizando posteriormente una recta de calibrado.
- Espectrofosimetría: la tiroxina será inmovilizada sobre un soporte sólido (papel) para intentar aumentar su fosforescencia. Se llevarán a cabo varios experimentos para intentar optimizar el método.

**Palabras clave:** fluorescencia, fosforescencia, espectros de absorción, espectros de emisión, absorción, intensidad.

## ÍNDICE

1. Introducción.	1
1.1. Tiroxina.	1
1.1.1. Tiroides.	1
1.1.2. Síntesis de hormonas tiroideas.	2
1.1.2.1. Captación de yoduro.	3
1.1.2.2. Oxidación y yodación.	3
1.1.2.3. Formación de tiroxina y triyodotironina a partir de yodotirosina.	3
1.1.3. Conversión de tiroxina en los tejidos periféricos.	4
1.1.4. Transporte de hormonas tiroideas en sangre.	4
1.1.5. Desintegración y eliminación.	4
1.1.6. Relación del yodo con la función tiroidea.	4
1.1.7. Acciones de las hormonas tiroideas.	5
1.1.7.1. Crecimiento y desarrollo.	5
1.1.7.2. Acción calórica.	5
1.1.7.3. Efectos metabólicos.	5
1.1.7.4. Efectos cardiovasculares.	5
1.2. Espectrometría de luminiscencia molecular.	5
1.2.1. Fundamentos de la fluorescencia y de la fosforescencia.	6
1.2.2. Espín electrón.	7
1.2.3. Estados excitados singulete/triplete.	7
1.2.4. Diagrama de niveles de energía	

para las moléculas fotoluminiscentes.	8
1.2.5. Velocidad de absorción y de emisión.	9
1.2.6. Procesos de desactivación.	9
1.2.6.1. Relajación vibracional.	9
1.2.6.2. Conversión interna.	10
1.2.6.3. Conversión externa.	10
1.2.6.4. Cruce entre sistemas.	10
1.2.7. Fosforescencia.	10
1.2.8. Variables que afectan a la fluorescencia y la fosforescencia.	11
1.2.8.1. Rendimiento cuántico.	11
1.2.8.2. Tipos de transiciones en fluorescencia.	11
1.2.8.3. Fluorescencia y estructura.	11
1.2.8.4. Efecto de la rigidez estructural.	12
1.2.8.5. Efectos de la temperatura y del disolvente.	12
1.2.8.6. Efecto del pH en la fluorescencia.	13
1.2.8.7. Efecto del oxígeno disuelto.	13
1.2.8.8. Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia.	13
1.2.9. Espectros de emisión y de excitación.	14
1.2.10. Instrumentos para la medida de la fluorescencia y de la fosforescencia.	15
1.2.11. Componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros.	16
1.2.12. Diseños de instrumentos.	17

1.2.12.1.	Fluorómetros.	17
1.2.12.2.	Espectrofluorímetros.	18
1.2.12.3.	Fosforímetros.	19
1.2.12.4.	Calibrado del instrumento.	20
1.2.12.5.	Aplicaciones y métodos fotoluminiscentes.	21
2.	Objetivos.	21
3.	Material y métodos.	21
3.1.	Reactivos.	21
3.1.1.	Levo-tiroxina o L-tiroxina.	21
3.1.2.	Fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).	22
3.1.3.	Hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ) o sosa cáustica.	22
3.1.4.	Ioduro potásico o KI.	23
3.1.5.	Eosina Y.	23
3.1.6.	Rodamina.	23
3.2.	Material.	24
3.3.	Instrumentación.	25
4.	Experimentación.	25
4.1.	Caracterización por espectrofotometría visible-ultravioleta de la T4 y estudio de la influencia del pH. Obtención de las figuras de mérito para el análisis espectrofotométrico de T4 a los dos pH seleccionados.	25
4.2.	Caracterización espectrofluorimétrica de la hormona T4 y	

estudio de la influencia del pH. Obtención de las figuras de mérito para el análisis espectrofluorimétrico de T4 al pH seleccionado.	32
4.3. Caracterización por fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) de la T4 en soporte sólido. Sustitución del átomo pesado por T4 y estudio de la dependencia de la RTP con la concentración de T4.	37
4.3.1.RTP de tiroxina en disolución.	37
4.3.2.RTP de T4 en soporte sólido.	38
4.3.2.1. Caracterización del papel.	38
4.3.2.2. Caracterización de la tiroxina en papel.	39
4.3.3.Determinación de T4 por RTP empleando sondas fosforescentes.	40
4.3.3.1. Caracterización de la rodamina y la eosina en papel.	40
4.3.3.2. Influencia de la T4 por RTP empleando sondas fosforescentes.	41
4.3.3.3. Efecto del yoduro potásico.	47
5. Conclusiones.	48
6. Perspectivas futuras.	49
7. Bibliografía.	49



## 1. **Introducción.**

### 1.1. **Tiroxina.**

Las hormonas tiroideas son los únicos compuestos que contienen yodo con actividad biológica. Poseen dos funciones principalmente: En animales y seres humanos en desarrollo, estos compuestos son especialmente esenciales en el desarrollo normal, especialmente para el sistema nervioso central (SNC), pero además, en individuos adultos, las hormonas tiroideas ejercen un papel en la conservación de la homeostasis metabólica, ya que afectan a la función de casi todos los sistemas. Para llevar a cabo estas funciones, hay grandes reservas de hormonas preformadas dentro del tiroides. (Marín, 2010).

El metabolismo de las hormonas tiroideas se lleva a cabo, principalmente en el hígado, aunque también existe actividad metabólica en algunos tejidos diana como es el caso del cerebro. Las concentraciones séricas de dichas hormonas son reguladas por la hormona hipofisaria tirotropina o TSH, mediante un sistema clásico de retroalimentación negativa. Los principales efectos de esta hormona están mediados por la unión a receptores específicos (receptores nucleares de hormonas tiroideas), así como por la regulación de la transcripción de genes específicos. Estas hormonas tiroideas comparten el mismo mecanismo de acción que las hormonas esteroideas, vitamina D y retinoides, cuyos receptores conforman una superfamilia de receptores nucleares (Brandan et al., 2014)

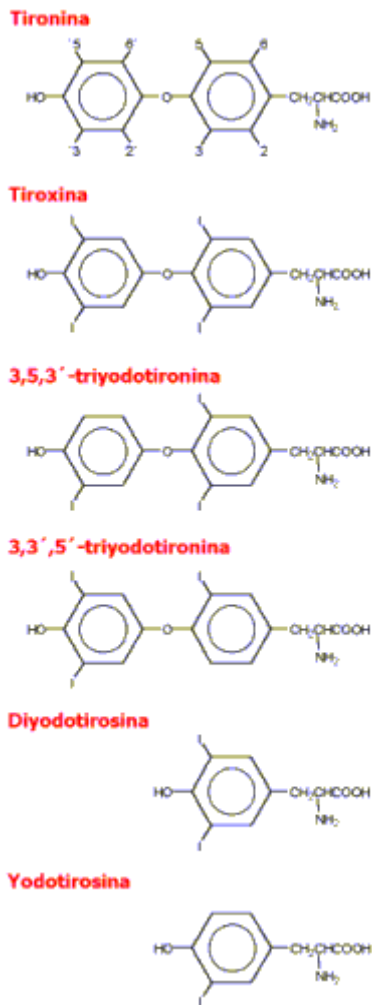
#### 1.1.1. **Tiroides.**

El tiroides fue descrito por primera vez por Galeno y, en 1656, Wharton lo denominó *glandulae thyroidaeae* (Quiroga-Sánchez, 2013)

Inicialmente, la glándula tiroides se reconoció como un órgano de importancia cuando se observó que el agrandamiento del mismo estaba estrechamente relacionado con una serie de cambios que afectaban, principalmente a los ojos y el corazón, síntomas que se relacionan con el padecimiento de lo que hoy se denomina hipertiroidismo (Brandan et al., 2014).

En 1961, gracias al descubrimiento de la calcitonina, se observó que el tiroides en sí, también participa en la regulación del  $Ca^{2+}$  (Ardila, 1981).

Las principales hormonas del tiroides se caracterizan por ser aminoácidos que contienen yodo, derivados de la tironina: tiroxina (T4) y T3 (triyodotironina; 3,5,3'-triyodotironina) (Morales y Rodríguez, 2005).



**Figura 1. Tironina, hormonas tiroideas y precursores.**

### 1.1.2. Síntesis de hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas se sintetizan y almacenan como residuos de aminoácidos de tiroglobulina, proteína que constituye la mayor parte del coloide folicular del tiroides. En concreto, esta glándula es singular porque almacena grandes cantidades de hormona potencial de ésta manera, y la tiroglobulina extracelular puede constituir una porción grande de la masa de la glándula. La tiroglobulina es una glucoproteína formada por dos subunidades que parecen ser idénticas (Chemburkar et al., 2010).

Los principales pasos en la síntesis, el almacenamiento, la liberación e interconversión de hormonas tiroideas son:

- Captación del ion yoduro por la glándula.
- Oxidación del yoduro y yodación de grupos tirosil de la tiroglobulina.
- Acoplamiento de residuos de yodotirosina mediante enlace éter para generar las yodotironinas.
- Proteólisis de la tiroglobulina y liberación de tiroxina y triyodotironina hacia la sangre.
- Conversión de tiroxina en triyodotironina en tejidos periféricos. (Morales y Rodríguez, 2005)

#### **1.1.2.1. Captación de yoduro.**

El yodo ingerido en la dieta alcanza la circulación en forma de yoduro. El sistema de transporte va a ser estimulado por la tirotrópina (hormona estimulante del tiroides, TSH) y bajo el control de un mecanismo autorregulador que va a aumentar la captación de yoduro cuando las reservas de yodo tiroideo son bajas lo que viene a señalar que la administración de yoduro puede ser capaz de revertir la situación (Chemburkar et al., 2010).

#### **1.1.2.2. Oxidación y yodación.**

La oxidación del yoduro hacia su forma activa se lleva a cabo mediante la peroxidasa tiroidea, que es una enzima que contiene el grupo “hemo” y utiliza peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como oxidante. (Morreale de Escobar y Escobar del Rey, 2008).

#### **1.1.2.3. Formación de tiroxina y triyodotironina a partir de yodotirosinas.**

El siguiente paso sería el acoplamiento de dos residuos diyodotirosil para formar tiroxina. El mecanismo comprende la transferencia enzimática de grupos, quizá como radicales libres yodotirosil o iones con carga positiva, dentro de la tiroglobulina.

La tiroxina se forma de manera primaria cerca del aminoterminal de la proteína, a diferencia de la triyodotironina que se sintetiza, casi toda, cerca del carboxiterminal.

La concentración de hormona estimulante del tiroides así como la disponibilidad del yoduro van a influir en las tasas de actividad sintética en los diversos tejidos.

Dado que la triyodotironina es al menos cinco veces más activa que la tiroxina y sólo contiene tres cuartas partes del yodo de ésta última, un decrecimiento en la disponibilidad del yodo necesita tener poco efecto sobre la cantidad efectiva de hormona tiroidea elaborada por la glándula. Cuando hay un decrecimiento en la disponibilidad de yoduro y se favorece la formación de triyodotironina sobre la tiroxina, una deficiencia de diyodotirosina puede alterar la síntesis de ambas formas de hormona (Chemburkar et al., 2010).

#### 1.1.3. **Conversión de tiroxina en triyodotironina en los tejidos periféricos.**

Aunque el tiroides secreta triyodotironina, el metabolismo de la tirosina origina mediante monodesyodación secuencial en los tejidos periféricos cerca del 80% de la triyodotironina circulante. La eliminación del yodo en la posición 5' conduce a la formación de triyodotironina. A esta vía se la denomina vía metabólica activadora.

La yodotironina 5'- desyodasa, es la enzima encargada de convertir la tiroxina en triyodotironina (Galofre et al., 2006).

#### 1.1.4. **Transporte de hormonas tiroideas en sangre.**

Las hormonas tiroideas se transportan en la sangre en relación fuerte, pero no covalente, unidas a alguna proteína plasmática. La globulina unida a la tiroxina es la principal transportadora de hormonas tiroideas. La triyodotironina se une de manera más débil.

La unión de hormonas tiroideas a las proteínas plasmáticas protege a las hormonas contra el metabolismo y secreción y por esta razón sus vidas medias en circulación son largas (Vélez et al., 2007).

#### 1.1.5. **Desintegración y eliminación.**

La tiroxina se elimina con lentitud, ya que tiene una vida media de 6 ó 7 días.

Las hormonas tiroideas se degradan principalmente en el hígado sin desyodación, la tiroxina y la triyodotironina se conjugan con los ácidos glucorónico y sulfúrico por medio de un grupo hidroxilo fenólico, y se excretan en la bilis.

Existe una circulación enteropática de hormonas tiroideas, estas últimas se liberan por medio de hidrólisis de los conjugados en el intestino donde se reabsorben. Parte del material conjugado llega al colon sin cambios, donde se hidroliza y se elimina por las heces como compuestos libres (Galofre et al., 2006).

#### **1.1.6. Relación del yodo con la función tiroidea.**

Para un buen funcionamiento del tiroides es necesaria la ingesta adecuada de yodo ya que sin éste no se pueden sintetizar las cantidades normales de hormona. Se requiere una ingesta de 1 a 2 mg/Kg de peso, en adultos, debiéndose incrementar en el embarazo y la lactancia. (Domínguez et al., 2004).

#### **1.1.7. Acciones de las hormonas tiroideas.**

El mecanismo bioquímico por medio del cual estas hormonas ejercen sus efectos es el siguiente: La triyodotironina regula la transcripción de genes, uniéndose a receptores nucleares de alta afinidad (Montero-Pedrazuela, 2006).

##### **1.1.7.1. Crecimiento y desarrollo.**

Esta hormona es crítica para el desarrollo cerebral, en el momento de la neurogénesis es cuando aparecen los receptores funcionales para la hormona tiroidea. Si hay deficiencia de esta hormona durante este periodo de neurogénesis activa se producirá un retraso mental irreversible acompañado de diversas alteraciones morfológicas del cerebro (Carrasco, 2010).

##### **1.1.7.2. Acción calórica.**

En animales homeotérmicos, la hormona tiroidea provoca un incremento en el consumo de oxígeno que afecta a casi todos los tejidos periféricos siendo notorio en el caso del corazón, músculo esquelético, hígado y riñones (Obregón, 2007), (Zaninovich, 2001).

##### **1.1.7.3. Efectos metabólicos.**

Las hormonas tiroideas estimulan el metabolismo del colesterol hacia ácidos biliares, incrementando la unión específica de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por las células hepáticas. También aumenta la respuesta lipolítica de las células adiposas de otras hormonas (Navarro, 2005), (Ferrando y Boza, 1990).

##### **1.1.7.4. Efectos cardiovasculares.**

La hormona tiroidea también ejerce su acción sobre la función cardíaca ya sea directa o indirectamente, siendo especialmente notorio en casos de disfunción tiroidea (Navarro, 2005).

#### **1.2. Espectrometría de luminiscencia molecular.**

La IUPAC define la luminiscencia como la emisión espontánea de radiación desde una especie excitada electrónicamente o vibracionalmente que no está en equilibrio térmico con su entorno. Existen distintos tipos de luminiscencia, según cuál haya sido la fuente de excitación de la especie emisora. En particular se denomina fotoluminiscencia a la luminiscencia producida por fotoexcitación directa de la especie emisora. Esta fotoluminiscencia puede clasificarse, a su vez, en fluorescencia y fosforescencia, siendo éstos los fenómenos en los que vamos a centrar nuestro estudio.

La fluorescencia se diferencia de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas responsables de la fluorescencia no conllevan un cambio en el espín del electrón. Como consecuencia, la fluorescencia presenta un tiempo de vida corto, cesando la luminiscencia casi inmediatamente después de la excitación ( $<10^{-5}$  s). Por el contrario, las emisiones de fosforescencia están acompañadas por un cambio en el espín del electrón, fenómeno prohibido por la mecánica cuántica, lo que produce que el tiempo de vida del estado excitado sea varios órdenes de magnitud superior a los de la fluorescencia, llegando en ocasiones a los segundos e incluso minutos. En la mayoría de los casos, la emisión fotoluminiscente, tanto si es de fluorescencia como de fosforescencia, es de mayor longitud de onda que la radiación utilizada para su excitación.

Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su inherente sensibilidad, con límites de detección que suelen ser de uno a tres órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en la espectroscopia de absorción. Los límites de detección característicos son del orden de partes por billón o  $\mu\text{M}$ . Otra ventaja de los métodos fotoluminiscentes radica en sus amplios intervalos de linealidad, que también suelen ser significativamente mayores que los encontrados en los métodos de absorción. Debido a su alta sensibilidad, los métodos luminiscentes cuantitativos suelen sufrir serios efectos de interferencias procedentes de la matriz de la muestra (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

### 1.2.1. **Fundamentos de la fluorescencia y de la fosforescencia.**

La fluorescencia tiene lugar en sistemas químicos gaseosos, líquidos y sólidos, tanto sencillos como complejos. Muchas especies moleculares también presentan dispersión Rayleigh, sin embargo, es mucho más frecuente encontrar bandas de fluorescencia (o fosforescencia) molecular centradas en longitudes de onda más largas que la línea de resonancia. Este desplazamiento hacia longitudes de onda más largas, o menores energías, se denomina *desplazamiento Stokes*.

Para comprender la diferencia entre los dos fenómenos fotoluminiscentes, se requiere una revisión del *espín del electrón* y de los *estados excitados singulete/triplete* (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

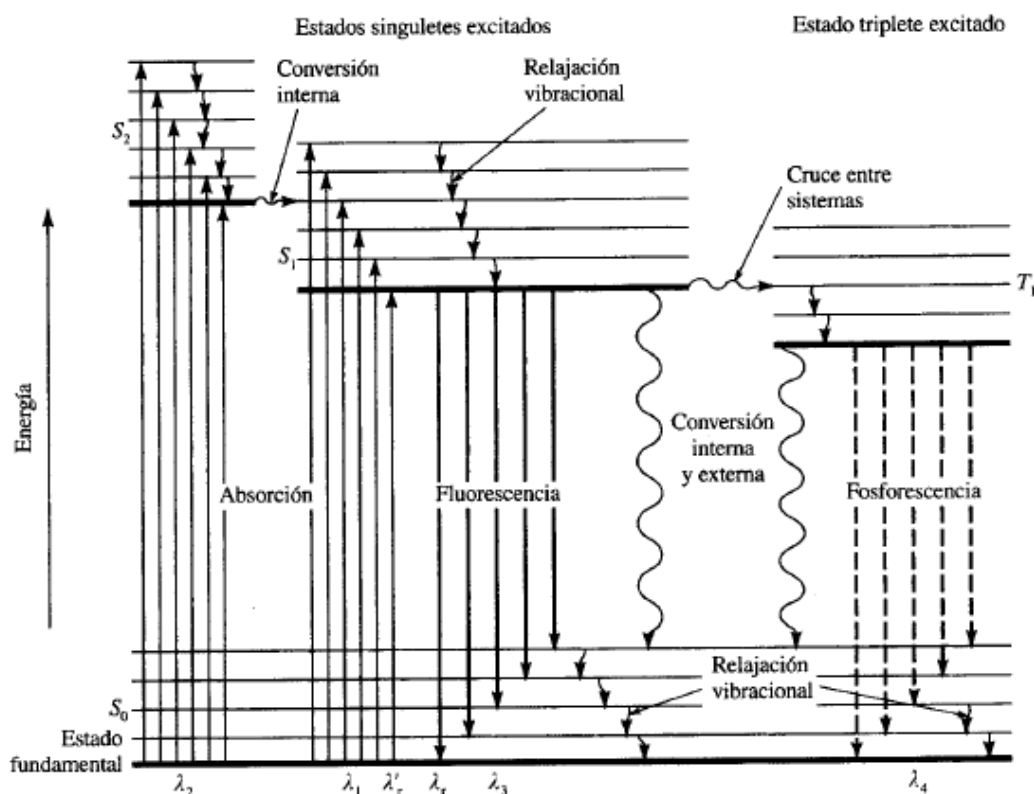
### 1.2.2. **Espín del electrón.**

El principio de exclusión de Pauli establece que en un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales. Esta restricción requiere que no haya más de dos electrones en un orbital y además, los dos deben tener los estados de espín opuestos. Cuando esto ocurre se dice que los espines están apareados. Cuando los espines están apareados la molécula es diamagnética y cuando estos tienen electrones desapareados, se dice que la molécula es paramagnética (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

### 1.2.3. **Estados excitados singulete/triplete.**

Un estado *electrónico* molecular en el cual todos los espines de los electrones están apareados se llama estado *singulete* y cuando la molécula se expone a un campo magnético no se produce un desdoblamiento de niveles de energía. Por otro lado, el estado fundamental para un radical libre, es un estado *doblete*, porque el electrón impar puede tomar dos orientaciones en un campo magnético, lo que comunica ligeras diferencias de energía al sistema. Cuando uno de los electrones de una molécula es excitado a un nivel de energía superior puede continuar apareado con el electrón del estado fundamental, formándose un estado *singulete excitado*, o puede desaparecer del mismo, permaneciendo paralelos entre sí y originando un estado *triplete excitado*.

#### 1.2.4. Diagrama de niveles de energía para las moléculas fotoluminiscentes.



**Figura 2. Diagrama de Jablonski para un sistema fotoluminiscente (Skoog; Holler; Nieman, 1998).**

El diagrama de Jablonski reflejado en la figura 2 es un diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente característica. La línea horizontal gruesa que se encuentra en la parte inferior de la figura representa la energía del estado fundamental de la molécula, que normalmente es un estado singulete y se designa  $S_0$ . A temperatura ambiente, este estado representa la energía de prácticamente todas las moléculas en una disolución.

Las líneas gruesas superiores son los niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de los tres estados electrónicos excitados. Las dos líneas situadas a la izquierda representan los estados electrónicos singulete primero ( $S_1$ ) y segundo ( $S_2$ ). La línea de la derecha ( $T_1$ ) representa la energía del primer estado electrónico triplete. Como ocurre normalmente, la energía del primer estado triplete excitado es menor que la energía del correspondiente estado singulete.

Como muestra la Figura 2, la excitación de esta molécula se puede producir por la absorción de dos bandas de radiación, una centrada alrededor de la longitud de onda



$\lambda_1$  ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) y la segunda alrededor de la longitud de onda más corta  $\lambda_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ). Obsérvese que el proceso de excitación da como resultado la conversión de la molécula a cualquiera de los diversos estados excitados vibracionales. Obsérvese también que no se muestra la excitación directa a un estado triplete porque esta transición no tiene lugar de manera significativa, ya que este proceso implica un cambio en multiplicidad, suceso que, tiene una baja probabilidad de suceder (una transición de este tipo, de baja probabilidad, se llama *prohibida*) (Skoog; Holler; Nieman, 1998) (Frackowiak, 1998)

#### 1.2.5. **Velocidad de absorción y de emisión.**

El proceso de absorción de un fotón de radiación es muy rápido, requiriendo del orden de  $10^{-15}$  a  $10^{-14}$  s. Por otro lado, la emisión fluorescente, tiene lugar a una velocidad significativamente más lenta. El tiempo de vida del estado excitado se relaciona inversamente con la absorptividad molar del pico de absorción correspondiente al proceso de excitación. Por tanto, para absorptividades molares comprendidas entre  $10^3$  y  $10^5$ , los tiempos de vida del estado excitado son entorno a  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  s.

La velocidad promedio de una transición triplete a singulete es menor que la correspondiente transición singulete a singulete. Por ello, la emisión fosforescente requiere tiempos comprendidos entre  $10^{-4}$  y 10 s o superiores (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### 1.2.6. **Procesos de desactivación.**

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante una combinación de varias etapas mecánicas. La fluorescencia y la fosforescencia, conllevan la emisión de un fotón de radiación. Existen otras etapas de desactivación que constituyen procesos no radiantes. El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

##### 1.2.6.1. **Relajación vibracional.**

Una molécula puede promocionarse a cualquiera de los diversos niveles vibracionales durante el proceso de excitación electrónico. Sin embargo, en disolución, el exceso de energía vibracional se pierde inmediatamente como consecuencia de las colisiones entre las moléculas de las especies excitadas y las del disolvente; el resultado es una transferencia de energía y un incremento minúsculo de la temperatura del disolvente (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.6.2. Conversión interna.**

El término conversión interna describe los procesos intermoleculares por los cuales la molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emisión de radiación. La conversión interna parece ser particularmente eficaz cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente próximos como para que haya un solapamiento de los niveles de energía vibracional. La conversión interna a través de los niveles vibracionales solapados es normalmente más probable que la pérdida de energía por fluorescencia desde un estado excitado más alto (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.6.3. Conversión externa.**

La desactivación de un estado electrónico excitado puede incluir la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el disolvente u otros solutos. La evidencia de la conversión externa incluye el marcado efecto que ejerce el disolvente sobre la intensidad de fluorescencia; además, aquellas condiciones que tienden a reducir el número de colisiones entre partículas (baja temperatura y elevada viscosidad) tienden, generalmente, a aumentar la fluorescencia (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.6.4. Cruce entre sistemas.**

El cruce entre sistemas es un proceso en el cual se invierte el espín de un electrón excitado y da como resultado un cambio en la multiplicidad de la molécula. Al igual que en la conversión interna, la probabilidad de esta transición aumenta si los niveles vibracionales de los dos estados se solapan. El cruce entre sistemas es más común en moléculas que contienen átomos pesados, como son el yodo o el bromo (efecto del átomo pesado). Los acoplamientos espín/orbital se hacen grandes en presencia de tales átomos y, de ese modo, se favorece un cambio en el espín. La presencia de especies paramagnéticas en la disolución, como el oxígeno molecular, también favorece el cruce entre sistemas y consecuentemente disminuye la fluorescencia (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.7. Fosforescencia.**

La desactivación del estado electrónico excitado también puede incluir la fosforescencia. Después del cruce entre sistemas a un estado triplete excitado, la desactivación posterior puede tener lugar por conversión interna o externa o por

fosforescencia. La emisión causada por una transición de este tipo puede persistir durante algún tiempo después que la irradiación se haya interrumpido.

Las conversiones externas e internas compiten con tanto éxito con la fosforescencia que este tipo de emisión se observa normalmente sólo a bajas temperaturas, en medios altamente viscosos o por moléculas que están adsorbidas sobre superficies sólidas (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8. Variables que afectan a la fluorescencia y la fosforescencia.**

Tanto la estructura molecular como el entorno químico van a influir en que una sustancia sea o no luminiscente. Estos factores también determinan la intensidad de emisión cuando tiene lugar la fotoluminiscencia. En este apartado se consideran brevemente los efectos de algunas de estas variables (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

##### **1.2.8.1. Rendimiento cuántico.**

El rendimiento cuántico, o la eficacia cuántica, de fluorescencia o de fosforescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten luminiscencia respecto al número total de moléculas excitadas. Para moléculas altamente fluorescentes como la fluoresceína, la eficacia cuántica, bajo determinadas condiciones, se aproxima a la unidad. Las especies químicas que no presentan una fluorescencia apreciable tienen eficacias que se aproximan a cero (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

##### **1.2.8.2. Tipos de transiciones en fluorescencia.**

Es importante resaltar que la fluorescencia rara vez es consecuencia de la absorción de radiación ultravioleta de la longitud de onda menor de 250 nm, ya que tal radiación es suficientemente energética como para inducir fenómenos fotoquímicos como la predisociación o disociación (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

##### **1.2.8.3. Fluorescencia y estructura.**

La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos con transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de baja energía. Los compuestos que contienen grupos carbonilo en estructuras alifáticas o alicíclicas o estructuras con dobles enlaces altamente conjugados también pueden presentar fluorescencia, pero el número de estos compuestos es pequeño comparado con el número de sistemas aromáticos.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica normalmente aumenta con el número de anillos y con su grado de condensación. Los heterocíclicos sencillos, como la piridina, el furano el tiofeno y el pirrol, no presentan fluorescencia; por otro lado, las estructuras condensadas con éstas normalmente sí la presentan.

En los heterocíclicos con nitrógeno, el tiempo de vida del estado excitado es más corto, así, se observa fluorescencia en compuestos como la quinolina, la isoquinolina y el indol.

La influencia de la introducción de halógenos es sorprendente; se piensa que el descenso en la fluorescencia al aumentar el número atómico del halógeno es debido, en parte, al efecto del átomo pesado, que aumenta la probabilidad para el cruce entre sistemas hacia el estado triplete. Se cree que la predisiociación juega un papel importante tanto en el yodobenceno como en los nitroderivados; estos compuestos tienen enlaces de fácil ruptura que pueden absorber la energía de excitación seguida de una conversión interna.

La adición de un ácido carboxílico o de un grupo carbonilo en un anillo aromático generalmente inhibe la fluorescencia (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8.4. Efecto de la rigidez estructural.**

Empíricamente se encuentra que la fluorescencia se ve particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas.

También se ha recurrido a la influencia de la rigidez estructural para explicar el aumento de la fluorescencia de ciertos agentes quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ión metálico.

La falta de rigidez de una molécula probablemente provoca un aumento de la velocidad de conversión interna y el correspondiente aumento en la probabilidad de desactivación no radiante. Una parte de una molécula no rígida puede sufrir vibraciones de baja frecuencia respecto a sus otras partes y tales movimientos indudablemente explican ciertas pérdidas de energía (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8.5. Efectos de la temperatura y del disolvente.**

La eficacia cuántica de fluorescencia disminuye en la mayoría de las moléculas al aumentar la temperatura, ya que al aumentar la frecuencia de las colisiones cuando la temperatura es elevada, aumenta la probabilidad de desactivación por conversión

externa. Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de la conversión externa y conduce al mismo resultado. La fluorescencia de una molécula se reduce en presencia de disolventes que contienen átomos pesados o de solutos con dichos átomos en su estructura (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8.6. Efecto del pH en la fluorescencia.**

La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son, probablemente, diferentes para las formas ionizada y no ionizada del compuesto.

La influencia del pH en la fluorescencia de ciertos compuestos se ha utilizado para la detección de puntos finales en valoraciones ácido/base. Los procedimientos analíticos basados en las medidas de fluorescencia frecuentemente requieren de un control minucioso del pH (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8.7. Efecto del oxígeno disuelto.**

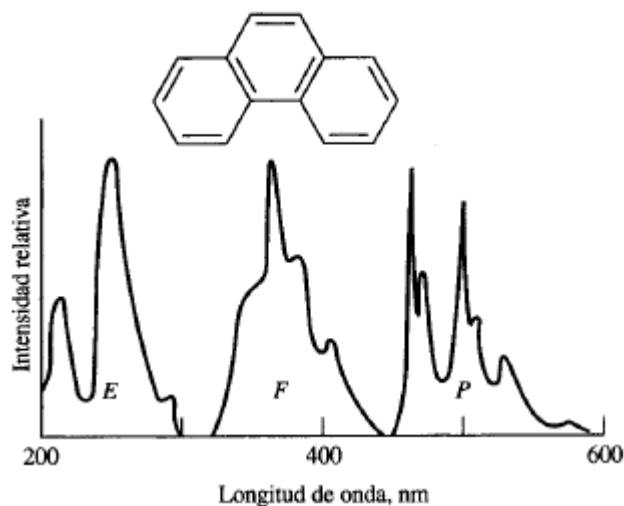
La presencia de oxígeno disuelto suele reducir la intensidad de fluorescencia de una disolución. Este efecto puede ser el resultado de una oxidación de las especies fluorescentes inducida fotoquímicamente. Sin embargo, con más frecuencia la amortiguación (quenching) tiene lugar como consecuencia de las propiedades paramagnéticas del oxígeno molecular, que favorecen el cruce entre sistemas y la conversión de las moléculas excitadas al estado triplete. Otras especies paramagnéticas también tienden a amortiguar la fluorescencia (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.8.8. Efecto de la concentración en la intensidad de fluorescencia.**

Puede demostrarse fácilmente que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración para disoluciones diluidas. Sin embargo, hay fundamentalmente dos factores responsables de las desviaciones negativas de la linealidad a elevadas concentraciones: la autoamortiguación y la autoabsorción. El primero es el resultado de colisiones entre moléculas excitadas. La transferencia de energía por vía no radiante sucede, quizás, de manera análoga a como ocurre la transferencia de energía a las moléculas del disolvente en una conversión externa. Se puede esperar que la autoamortiguación aumente con la concentración debido a la mayor probabilidad de que tengan lugar colisiones.

La autoabsorción tiene lugar cuando la longitud de emisión se solapa con un pico de absorción; la fluorescencia, entonces, disminuye porque la radiación emitida atraviesa la disolución y es reabsorbida por otras moléculas fluorescentes. Los efectos de estos fenómenos son tales que puede hacer que aparezca un máximo en la representación gráfica de la potencia fluorescente frente a la concentración (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

### 1.2.9. Espectros de emisión y de excitación.



**Figura 3. Espectros de fenantreno: E, excitación; F, emisión de fluorescencia; P, emisión de fosforescencia.**

La figura 3 muestra los tres tipos de espectros fotoluminiscentes del fenantreno. Los espectros de *excitación* (*E* en la figura) se obtienen midiendo la intensidad de emisión luminiscente a una longitud de onda fija mientras varía la longitud de onda de excitación.

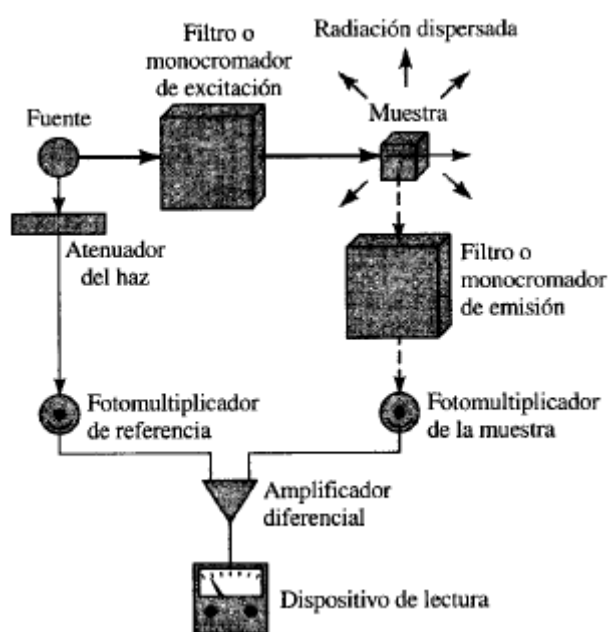
Como la primera etapa en la generación de la emisión fluorescente es la absorción de radiación, para crear los estados excitados, un espectro de excitación es prácticamente idéntico a un espectro de absorción realizado bajo las mismas condiciones. Por otro lado, los espectros de fluorescencia y de fosforescencia (*F* y *P*, respectivamente), recogen la intensidad de emisión en función de la longitud de onda empleando una longitud de onda de excitación constante.

La fotoluminiscencia normalmente tiene lugar a longitudes de onda más largas que las longitudes de onda de excitación. Además, las bandas de emisión de fosforescencia se encuentran, en general, a longitudes de onda más largas que las bandas de fluorescencia, ya que, en la mayoría de los casos, el estado triplete excitado tiene

menor energía que el correspondiente estado singulete. De hecho, la diferencia de longitudes de onda entre los dos proporciona una medida útil de la diferencia de energía entre los estados excitados singulete y triplete (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### 1.2.10. Instrumentos para la medida de la fluorescencia y de la fosforescencia.

Los distintos componentes de los instrumentos para la medida de la fotoluminiscencia son similares a los que se encuentran en los fotómetros o espectrofotómetros ultravioleta/visible.



**Figura 4. Componentes de un fluorómetro o un espectrofluorímetro.**

La Figura 4 muestra una configuración característica de estos componentes en los fluorómetros y los espectrofluorímetros. Casi todos los instrumentos de fluorescencia utilizan ópticas de doble haz tal como se muestra, para compensar las fluctuaciones en la potencia de la fuente. El haz que irradiará la muestra pasa primero a través de un filtro o un monocromador de excitación, que transmite únicamente la radiación que provocará la fluorescencia excluyendo o limitando el resto de longitudes de onda. La fluorescencia se emite desde la muestra en todas las direcciones pero lo más conveniente es observar la que forma un ángulo recto con el haz de excitación; a otros ángulos, la dispersión producida en la disolución y en las paredes de las cubetas es mayor y se pueden cometer grandes errores en la medida de la intensidad. La radiación emitida llega a un fotodetector después de haber pasado por un segundo

filtro o monocromador que aísla la longitud de onda de emisión de fluorescencia para su medida.

El haz de referencia pasa a través de un atenuador que reduce su potencia a aproximadamente la de la radiación fluorescente (normalmente la potencia se reduce en un factor de 100 o más). Las señales procedentes de fotomultiplicador de la muestra y del de referencia se dirigen a un amplificador diferencial cuya salida se visualiza en un medidor o en un registro. Los instrumentos más modernos utilizan un circuito divisor analógico o un sistema de adquisición de datos digital seguido del tratamiento de los datos para obtener la relación entre la intensidad de la emisión fluorescente y la intensidad de la fuente de radiación.

Los verdaderos espectrofluorímetros son instrumentos especializados equipados con dos monocromadores; uno de ellos permite variar la longitud de onda de excitación y el otro permite obtener un espectro de emisión. Si se efectúan las correcciones adecuadas para compensar las variaciones de la intensidad de la señal de salida de la fuente y de la respuesta del detector en función de la longitud de onda, se obtiene un espectro de excitación absoluto que es muy semejante al espectro de absorción.

La selectividad que proporcionan los espectrofluorímetros es de capital importancia en las investigaciones relacionadas con las características electrónicas y estructurales de las moléculas y es valiosa en los trabajos analíticos cualitativos y cuantitativos (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### 1.2.11. Componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros.

Los componentes de los fluorómetros y de los espectrofluorímetros difieren solo en detalles que componen los fotómetros y los espectrofotómetros, solo es necesario considerar estas diferencias.

**Fuentes:** En la mayoría de las aplicaciones se necesitan fuentes más intensas que las lámparas de wolframio o hidrogeno utilizadas en las medidas de absorción.

**Lámparas:** La lámpara más común para los fluorómetros de filtro es la lámpara de arco de mercurio a baja presión equipad con una ventana de sílice fundida. Esta fuente emite líneas útiles para producir la excitación previa a la fluorescencia a 254, 302, 313, 546, 578, 691 y 773 nm.

Para los espectrofluorímetros, en donde se requiere una fuente de radiación continua, normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón de alta presión, de 75 a 450 W.



Estas lámparas requieren una fuente de alimentación potente, capaz de producir corrientes continuas de 5 a 20 A y de 15 a 30 V. El espectro de una lámpara de arco de xenón es continuo desde aproximadamente 300 a 1300 nm.

**Láseres:** desde los comienzos de los años setenta, se utilizan diversos tipos de láseres como fuentes de excitación para medidas de fotoluminiscencia. Un particular interés tienen los láseres sintonizables de colorante que utilizan, como sistema de bombeo, un láser de nitrógeno pulsante o un láser de Nd:YAG.

Las fuentes de láser ofrecen importantes ventajas cuando las muestras son muy pequeñas y se requiere una radiación de excitación altamente monocromática para minimizar los efectos de las interferencias fluorescentes.

**Filtros y monocromadores:** Tanto los filtros de interferencia como los de absorción se han utilizado para la selección de la longitud de onda del haz de excitación y de la radiación fluorescente resultante. La mayoría de los espectrofluorímetros están equipados con al menos uno y a veces dos monocromadores de red.

**Detectores:** La señal de fluorescencia típica es de baja intensidad, por ello, para su medida se necesitan ganancias de amplificador elevadas. Los tubos fotomultiplicadores son los detectores más utilizados en instrumentos de fluorescencia sensibles. Suelen trabajar en la modalidad de recuento de fotones para mejorar la relación señal/ruido. También se utiliza, a veces, la refrigeración de los detectores para mejorar la relación señal/ruido. También se han propuesto, para los espectrofluorímetros, los detectores de diodos en serie y de transferencia de carga.

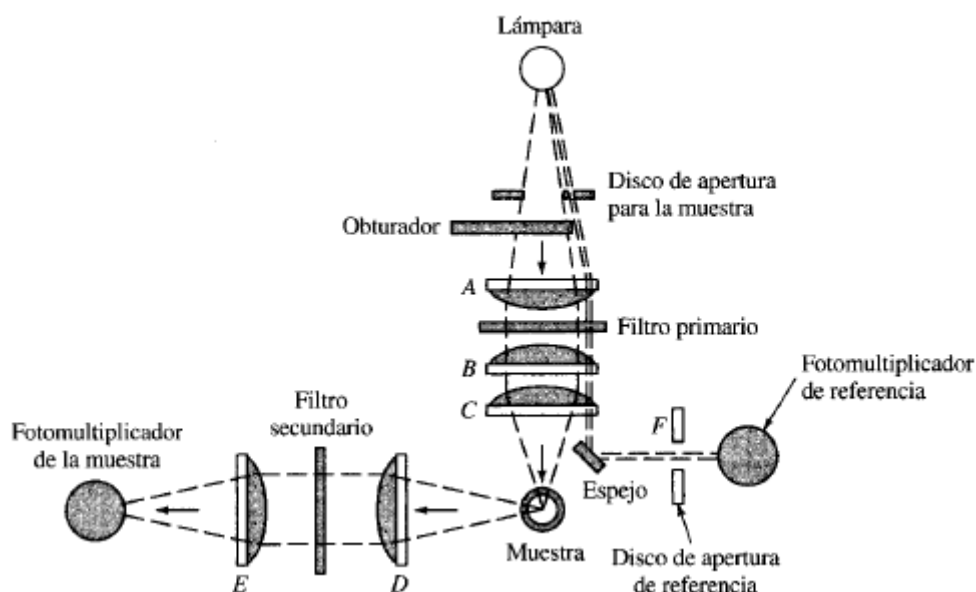
**Cubetas y compartimentos para las cubetas:** Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares, fabricadas con vidrio o con sílice. Se debe tener cuidado en el diseño del compartimento de la cubeta para reducir la cantidad de radiación dispersada que llega hasta el detector (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### 1.2.12. Diseños de instrumentos.

##### 1.2.12.1. Fluorómetros.

Los fluorómetros de filtro proporcionan una forma relativamente simple y barata de llevar a cabo análisis cuantitativos por fluorescencia. Como ya se ha señalado, para seleccionar las longitudes de onda de la radiación de excitación y emisión se utilizan

filtros de interferencia y de absorción. Generalmente, los fluorómetros son compactos, robustos y fáciles de usar.



**Figura 5. Un fluorómetro característico.**

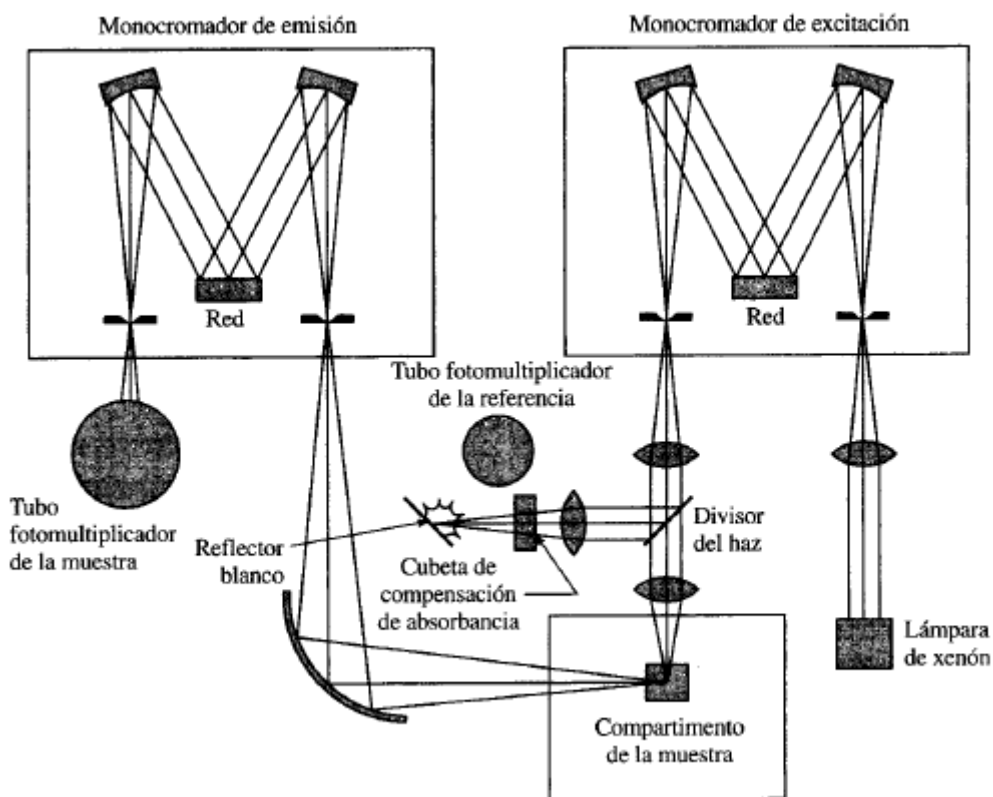
La figura 5 muestra un esquema de un fluorómetro de filtros característico que consta de una lámpara de mercurio para la excitación de la fluorescencia y un par de tubos fotomultiplicadores como detectores. El haz que sale de la fuente se divide cerca de ella en un haz de referencia y en un haz de muestra. El haz de referencia se atenúa mediante el disco de apertura hasta que su intensidad sea aproximadamente la misma que la intensidad de fluorescencia. Ambos haces pasan a través del filtro primario y a continuación el haz de referencia se refleja hacia el tubo fotomultiplicador de referencia. El haz de muestra se enfoca sobre la muestra mediante un par de lentes y provoca la emisión de fluorescencia. La radiación emitida pasa a través de un segundo filtro que posteriormente se enfoca sobre un segundo tubo fotomultiplicador.

Las señales de salida eléctricas de los dos detectores se dirigen hacia un divisor analógico, para obtener la relación entre las intensidades de la muestra y de referencia, que sirve como parámetro analítico (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

#### **1.2.12.2. Espectrofluorímetros.**

Algunos fabricantes de instrumentos ofertan espectrofluorímetros capaces de obtener los espectros de excitación y los de emisión. En la Figura 6 se muestra el diseño óptico de uno de ellos, que utiliza dos monocromadores de red. La radiación que procede del primer monocromador se divide en dos, una parte se dirige hacia el

fotomultiplicador de referencia y la otra hacia la muestra. La radiación fluorescente resultante, después de ser dispersada en el segundo monocromador, se detecta en un segundo fotomultiplicador.

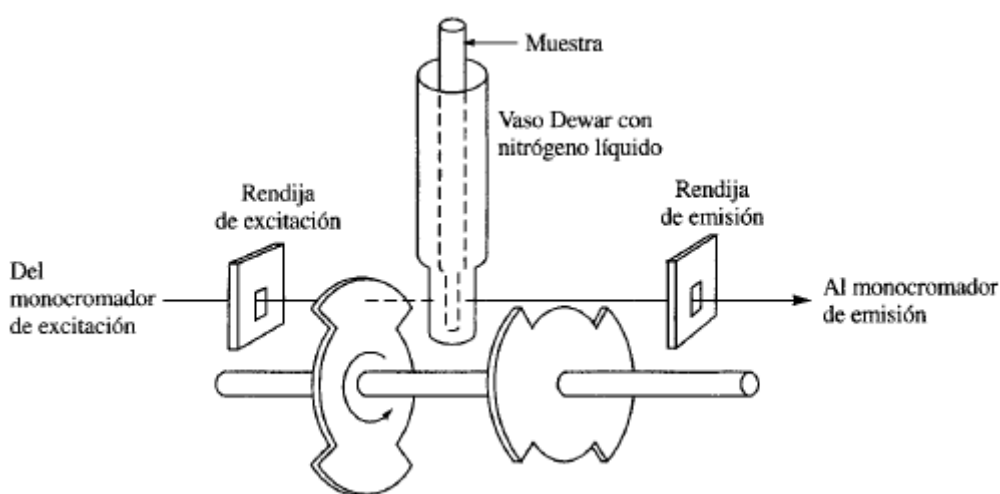


**Figura 6. Un espectrofluorímetro.**

Un instrumento como el que se muestra en la Figura 6 suministra perfectamente los espectros satisfactorios para el análisis cuantitativo. Sin embargo, los espectros de emisión obtenidos no son necesariamente comparables con los de otros instrumentos, ya que la señal de salida depende no sólo de la intensidad de fluorescencia sino también de las características de la lámpara, del detector y de los monocromadores. Todas estas características instrumentales varían con la longitud de onda y difieren de un instrumento a otro. Se han desarrollado varios métodos para obtener el espectro corregido, que es el verdadero espectro de fluorescencia, libre de efectos instrumentales; muchos de los instrumentos comerciales modernos más sofisticados están preparados para obtener directamente los espectros corregidos (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

### 1.2.12.3. Fosforímetros.

Los instrumentos que se utilizan para estudios de fosforescencia tienen diseños similares a los fluorómetros y a los espectrofluorímetros antes considerados, sólo difieren en que requieren dos componentes adicionales. El primero es un dispositivo que irradia alternativamente la muestra y, después de un retraso en el tiempo adecuado, mide la intensidad de fosforescencia. El retraso en el tiempo es necesario para diferenciar la emisión fosforescente de larga vida de la emisión fluorescente de corta vida que podrían originarse en la misma muestra. Se utilizan dispositivos mecánicos y electrónicos y muchos instrumentos de fluorescencia comerciales tienen accesorios para medidas de fosforescencia. Un ejemplo de un tipo de dispositivo mecánico se muestra en la Figura 7 (Skoog; Holler; Nieman, 1998).



**Figura 7. Esquema de un dispositivo para producir una excitación intermitente y observar la fosforescencia.**

#### 1.2.12. 4. Calibrado del instrumento.

Debido a las variaciones de la intensidad de la fuente, de la sensibilidad del detector y de otras variables instrumentales, es imposible obtener, con un fluorómetro o con un espectrofluorímetro dado, exactamente las mismas lecturas para una disolución o un conjunto de disoluciones de un día a otro. Por esta razón, es una práctica habitual calibrar el instrumento y ajustarlo a un nivel de sensibilidad reproducible. El calibrado se suele llevar a cabo con una disolución patrón de un fluoróforo estable. El reactivo más común para este cometido es una disolución patrón de sulfato de quinina de concentración aproximada de  $10^{-5}$  M. Esta disolución, generalmente, se excita con una radiación de 350 nm y emite radiación a 450 nm.

Perkin-Elmer Corporation ofrece un conjunto de seis patrones de fluorescencia disueltos en una matriz de plástico, que forman unos bloques sólidos estables, que se pueden utilizar indefinidamente sin una conservación especial. Con estos patrones, el instrumento se calibra fácilmente en la región de longitudes de onda que se va a utilizar en el análisis (Skoog; Holler; Nieman, 1998) (Santamaría-Solves, 2010).

#### 1.2.12.5. **Aplicaciones y métodos fotoluminiscentes.**

Es inherente a los métodos fluorescentes y fosforescentes el ser aplicables a intervalos de concentración más bajos que las medidas espectrofotométricas de absorción y se encuentran entre las técnicas analíticas más sensibles de las que puedan disponer los científicos. Los métodos fluorimétricos tienen, generalmente, sensibilidades que son de uno a tres órdenes de magnitud superiores a los correspondientes de absorción. Por otro lado, la precisión y la exactitud de los métodos fotoluminiscentes son habitualmente más pobres que las de los procedimientos espectrofotométricos en un factor entre, quizás, dos y cinco. Generalmente, los métodos fosforescentes son menos precisos que sus correspondientes métodos fluorescentes (Skoog; Holler; Nieman, 1998).

## 2. **Objetivos.**

El objetivo principal del trabajo es el desarrollo de una metodología analítica basada en técnicas ópticas para la determinación de levotiroxina T4. Este objetivo principal se puede subdividir en tres objetivos secundarios:

- a) Evaluación de una metodología por espectroscopía de absorción molecular
- b) Evaluación de una metodología por fluorescencia molecular
- c) Desarrollo de una metodología basada en fosforescencia a temperatura ambiente.

## 3. **Material y métodos.**

### 3.1. **Reactivos**

En el presente trabajo vamos a determinar hormona presente en el cuerpo humano llamada tiroxina, por lo que está, será el reactivo principal. También debemos utilizar

otra serie de reactivos para conseguir disolverla, regular su pH o medirla por las diferentes técnicas que en este trabajo se describen.

A continuación haremos un listado de los principales reactivos que se han utilizado en el experimento.

### 3.1.1. **Levo-tiroxina o L-tiroxina, Prolabo (Normapur).**

La levotiroxina, una hormona del tiroides, se utiliza para tratar el hipotiroidismo, una condición en la cual la glándula tiroides no produce suficiente hormona tiroidea. La levotiroxina también se usa para tratar hipotiroidismo congénito (cretinismo) y bocio (glándula tiroidea agrandada). La levotiroxina también se utiliza con la cirugía y la terapia con yodo radiactivo para tratar el cáncer de tiroides. La levotiroxina pertenece a una clase de medicamentos llamados hormonas. Funciona reemplazando la hormona tiroidea que normalmente produce el cuerpo.

La tiroxina al ser un compuesto yodado es de gran estabilidad térmica. Es un compuesto higroscópico y fotosensible.

Preparamos una disolución  $5 \times 10^{-4}$  M de tiroxina en NaOH 0,01 M. Para ello pesamos 0,019422 g de tiroxina en polvo y los disolvemos en NaOH y enrasamos en un matraz de 50 mL. Para enrasar utilizamos el NaOH. El matraz debe de ser opaco ya que la tiroxina es fotosensible y la luz podría afectar a nuestras medidas.

### 3.1.2. **Fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Panreac y fosfato ácido de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) Merck (pro analysis).**

El pH de las disoluciones se controla mediante una reguladora de fosfato ácido / fosfato diácido de potasio. Para ello, se preparan 50 mL de una disolución 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con ayuda de la báscula pesamos 0,68045 g y enrasamos posteriormente con agua destilada.

También preparamos una disolución 0,1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pesando con ayuda de la báscula 1,14115 g y enrasamos posteriormente. Estas dos disoluciones se mantienen en refrigeración a 4°C durante las tres semanas de trabajo.

Para ajustar el pH de la disolución deseada a 7,83 (cercana al pH sanguíneo humano) se añaden 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , en un matraz de 10 mL lo que diluye la reguladora dejándola en 0,01 M.

### 3.1.3. **Hidróxido sódico (NaOH) o sosa caustica, Prolabo (Normapur).**

Utilizamos el hidróxido sódico para disolver la tiroxina (información del Kit comercial *Acofarma*).

En su forma pura y a temperatura ambiente, el hidróxido de sodio es un sólido de color blanco y sin olor. Es muy higroscópico por lo que absorbe fácilmente la humedad del aire y por ello ha de almacenarse con la menor cantidad de aire y en lugares secos. Es una sustancia muy alcalina con alta solubilidad en agua.

Se debe tener cierta precaución a la hora de manejar el hidróxido de sodio ya que el contacto directo puede ser muy peligroso y puede producir quemaduras químicas graves.

Prepararemos una disolución 0,01 M de NaOH en un matraz de 250 mL. Para ello pesamos 0,1 gramos de sosa y la disolvemos enrasando con agua destilada. Esta disolución es la que se empleará para disolver el patrón de tiroxina.

#### 3.1.4. **Ioduro potásico o KI, Sigma-Aldrich.**

El yoduro de potasio se utilizará en los experimentos de fosforescencia a temperatura ambiente como reactivo de control para comprobar el efecto del átomo pesado sobre la RTP (Fernández-González et al., 2003).

El yoduro de potasio (KI) es una sal de yodo estable (no radiactivo) que puede ayudar a impedir que la tiroides absorba el yodo radiactivo, por lo tanto, protege a la tiroides del daño que provocaría la radiación.

Preparamos una disolución 1 M de KI en un matraz de 125 ml. Para ello pesamos con ayuda de la báscula 20,75125g de KI y lo llevamos a 125 ml con agua destilada.

#### 3.1.5. **Eosina Y, Carlo-Erba.**

Este compuesto pertenece al grupo de los colorantes. Dadas sus características fotoluminiscentes, se empleará como sonda fosforescente previa inmovilización en papel (Ramos-Martos, 1999).

El pigmento biológico eosina Y en polvo está pensado para preparar tinciones auxiliares con eosina y para el uso en tinciones compuestas. Es insoluble en agua, benceno o cloroformo y soluble en alcohol y soluciones alcalinas. La eosina se puede preparar fácilmente sin material especial. Las preparaciones son muy estables y duran mucho tiempo si son almacenadas convenientemente.

Prepararemos una disolución  $5 \times 10^{-4}$  M del colorante. Para ello pesamos 0,0104 g del mismo y lo introducimos en un matraz de 250 ml. Para enrasar y disolver la Eosina utilizamos etanol.

### 3.1.6. **Rodamina, Carlo-Erba.**

Al igual que la Eosina, este compuesto también pertenece a la familia de los colorantes. Se utilizará también como sonda fosforescente, dadas las características fotoluminiscentes de este pigmento (Misra et al., 2000).

La Rodamina es un compuesto orgánico heterocíclico fluorescente que se usa frecuentemente como colorante. La Rodamina se utiliza en a menudo en espectroscopía de fluorescencia, la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. La rodamina es soluble en agua, metanol y etanol y en general presenta cierta toxicidad.

Preparamos una disolución  $5 \times 10^{-4}$  M de Eosina. Para ello pesamos 0,0081 g de la misma y la añadimos a un matraz de 125 ml disolviéndola y enrasando con etanol con ayuda de un baño ultrasónico.

### 3.2. **Material.**

En el laboratorio se utilizó diferente tipo de material para preparar las muestras. Este será enumerado a continuación:

- Material de vidrio
  - Varillas de vidrio
  - Frascos para almacenamiento
  - Desecador
  - Vidrio de reloj
- Material de plástico
  - Placas Petri
  - Tubos de ensayo
  - Eppendorf



- Puntas de micropipeta
- Cuentagotas
- Frascos lavadores
- Tapones
- Material volumétrico
  - Micropipetas
  - Matraces aforados
  - Vasos de precipitados
- Material de metal
  - Pinzas
  - Cucharilla-espátula
  - Imán para agitador
- Material de papel
  - Papel de filtro
- Otros materiales
  - Cubetas para espectroscopía de tipo QS
  - Tijeras
  - Celo

### 3.3. Instrumentación.

Los principales instrumentos analíticos utilizados en este trabajo han sido:

- Agitador magnético Heidolph MR-Hei-Mix S
- Espectrofotómetro UV-VIS lambda 900 (software: UV Winlab)

- Espectrofluorímetro Cary Eclipse (software: Cary eclipse)
- pH-metro Crison micropH 2002
- Lámpara de infrarrojos.
- Balanza analítica Mettler AE 163
- Equipo de ultrasonidos Selecta ultrasons H-D

#### 4. Experimentación.

##### 4.1. **Caracterización por espectrofotometría visible-ultravioleta de la T4 y estudio de la influencia del pH. Obtención de las figuras de mérito para el análisis espectrofotométrico de T4 a los dos pH seleccionados.**

Para caracterizar espectrofotométricamente la tiroxina se prepara una recta de calibrado que permita determinar las figuras de mérito del método. Para ello, se preparan disoluciones entre  $0,2 \times 10^{-5}$  M y  $6 \times 10^{-5}$  M.

La influencia del pH sobre la absorbancia de la tiroxina se evalúa a dos pH, a 7,8 próximo al fisiológico y a 5,9. No se ensayaron pH más ácidos debido a problemas de solubilidad de la tiroxina, ni tampoco a pH más básico por pérdida de la capacidad reguladora del fosfato.

Preparamos dos pH diferentes para ver la influencia del mismo sobre la absorción de la tiroxina.

Las disoluciones madre a partir de las cuales vamos a preparar las alícuotas son:

- Disolución  $5 \times 10^{-4}$  M de tiroxina
- Disolución 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Disolución 0,1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

A partir de estas, preparamos 12 disoluciones para realizar la recta de calibrado por espectrofotometría, 6 disoluciones para uno de los pH y otras 6 disoluciones para el otro pH.

## Disoluciones a para obtener el pH 5,90.

### Blanco

Consta de una disolución de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y agua destilada para enrasar a un volumen de 10 mL.

### Disolución 1

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	200 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 2

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	400 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$2 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 3

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	600 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$3 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 4

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
-----------	----------	---------------

Tiroxina	800 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 $\mu$ L	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 $\mu$ L	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$4 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 5

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	1000 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 $\mu$ L	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 $\mu$ L	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$5 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 6

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	2 x 600 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 $\mu$ L	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 $\mu$ L	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$6 \times 10^{-5}$ M

### Disoluciones a para obtener el pH 7,83.

#### Blanco

Consta de una disolución de 900  $\mu$ L de K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub>, 100  $\mu$ L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y agua destilada para enrasar a un volumen de 10 mL.

#### Disolución 7

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	200 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	900 $\mu$ L	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	100 $\mu$ L	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 8

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	400 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$2 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 9

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	600 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$3 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 10

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	800 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$4 \times 10^{-5}$ M

### Disolución 11

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	1000 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$5 \times 10^{-5}$ M

## Disolución 12

A un matraz de 10 mL añadimos:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	2 x 600 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$6 \times 10^{-5}$ M

Muestras a pH 5,9

Una vez preparadas las doce disoluciones las caracterizamos por espectrofotometría obteniendo el espectro de absorción entre 200 y 700 nm empleando agua destilada como referencia.

### Figura 8. Espectros de absorción a pH 5,9 de la tiroxina por espectrofotometría.

En las figuras 8 y 9 se recogen los espectros de absorción de la tiroxina a distintas concentraciones a pH 5,9 y 7,83 respectivamente. Como se puede observar, en ambos casos existe un máximo de absorción a 323 nm.

Esa longitud de onda se utiliza para establecer una recta de calibrado a pH 7,83 de la que extraer las figuras de mérito. Se decide utilizar únicamente este pH ya que éste es el más próximo al pH fisiológico.

### Figura 9. Gráfico de las absorbancias a pH 7,83 de la tiroxina por espectrofotometría.

Las figuras de mérito para la determinación espectrofotométrica de la tiroxina a pH 7,8 son:

Sensibilidad:  $0,0057 \pm 0,0003 \mu M^{-1}$

$R^2$ : 0,9991

Límite de detección: 2  $\mu$ M

### Figura 10. Recta de calibrado por absorción UV-Vis para tiroxina a pH 7,8

4.2. **Caracterización espectrofluorimétrica de la hormona T4 y estudio de la influencia del pH. Obtención de las figuras de mérito para el análisis espectrofluorimétrico de T4 al pH seleccionado.**

Dado que la protonación o desprotonación de una especie modifica la distribución electrónica de la misma, los cambios en el pH pueden conducir a alteraciones en las propiedades fotoluminiscentes de la molécula. Por esa razón, antes de caracterizar la fluorescencia de la T4, se hizo un estudio de la influencia de la acidez en las propiedades fotoluminiscentes de la misma. Para ello, se prepararon dos concentraciones distintas a tres pH de trabajo diferentes.

Las tres primeras disoluciones que vamos a medir son:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	20 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-6}$ M
pH		7,83

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	20 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	100 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	900 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-6}$ M
pH		5,9

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	20 $\mu$ L	$5 \times 10^{-4}$ M
$K_2HPO_4$	500 $\mu$ L	0,1 M
$KH_2PO_4$	500 $\mu$ L	0,1 M
$H_2O$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-6}$ M
pH		6,9

Para localizar los máximos de excitación y emisión, se empleó fluorescencia sincrónica con un  $\Delta\lambda=50$  nm y unas rendijas en el monocromador de excitación y emisión de 10 nm y 20 nm respectivamente. Los máximos se localizaron a  $\lambda_{Ex}=200$  nm y  $\lambda_{Em}=280$  nm.

**Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia para tiroxina. [Tiroxina]= $10^{-6}$  M;  $\lambda_{\text{ex}}$ =200 nm; Rendijas de los monocromadores 10 nm (excitación) y 20 nm (emisión).**

Tal y como se puede apreciar en la Figura 11, no existe un desplazamiento del máximo de emisión al modificar el pH, aunque sí se aprecia un ligero incremento de la intensidad de emisión al descender el pH.

Dada la baja intensidad obtenida se preparan las disoluciones nuevamente empleando una mayor concentración de tiroxina.

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	100 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$5 \times 10^{-6}$ M
pH		7,83

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	100 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$5 \times 10^{-6}$ M
pH		5,9

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	100 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	500 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	500 $\mu\text{L}$	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$5 \times 10^{-6}$ M
pH		6,9

Medimos las 3 disoluciones en el espectrofluorímetro en las mismas condiciones espectroscópicas del caso anterior.



**Figura 12. Espectros de emisión de fluorescencia para tiroxina. [Tiroxina]= $5 \times 10^{-6}$  M;  $\lambda_{\text{Ex}}$ = 200 nm; Rendijas de los monocromadores 10 nm (excitación) y 20 nm (emisión).**

Tal y como se aprecia en la Figura 12, no se observan desplazamientos de la longitud de onda de emisión por efecto de la acidez, aunque se hace más evidente el incremento de la señal de emisión a pHs más ácidos.

Aunque la tendencia inicial es trabajar en las condiciones más próximas a las fisiológicas como ocurría en el caso de la determinación espectrofotométrica, puesto que en el caso de la espectrometría de fluorescencia molecular se observa un cambio de sensibilidad significativo modificando el pH, se caracteriza el método a pH de 5,9 ya que proporciona mejores figuras de mérito.

Preparamos 6 disoluciones para el calibrado:

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	20 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$1 \times 10^{-6}$ M

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	40 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$2 \times 10^{-6}$ M

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	60 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	100 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	900 $\mu\text{L}$	0,1 M
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	$3 \times 10^{-6}$ M

Compuesto	Cantidad	Concentración
Tiroxina	80 $\mu\text{L}$	$5 \times 10^{-4}$ M

<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 µL	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 µL	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	4 x 10 <sup>-6</sup> M

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
Tiroxina	100 µL	5 x 10 <sup>-4</sup> M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 µL	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 µL	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	5 x 10 <sup>-6</sup> M

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
Tiroxina	120 µL	5 x 10 <sup>-4</sup> M
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	100 µL	0,1 M
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	900 µL	0,1 M
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	Enrasamos hasta 10 mL	
Disolución final tiroxina	10 mL	6 x 10 <sup>-6</sup> M

Medimos las muestras y analizamos sus espectros.

**Figura 13. Espectros de fluorescencia de T4.  $\lambda_{Ex}=200$  nm; Rendijas de los monocromadores 10 nm (excitación) y 20 nm (emisión).**

Medimos la longitud de onda del máximo y hacemos la curva de calibrado.

**Figura 14. Recta de calibrado para fluorescencia.  $\lambda_{Ex}=200$  nm; Rendijas de los monocromadores 10 nm (excitación) y 20 nm (emisión).**

Los parámetros de la recta son:

Sensibilidad:  $98,83 \pm 35,41 \mu\text{M}^{-1}$

$R^2$ : 0,974364

Límite de detección: 1  $\mu\text{M}$

4.3. **Caracterización por fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) de la T4 en soporte sólido. Utilización de T4 como fuente de átomo pesado y estudio de la dependencia de la RTP con la concentración de T4.**

#### 4.3.1. RTP de tiroxina en disolución.

Dada la presencia de anillos aromáticos y yodo en la molécula de tiroxina, su estructura sugiere la posibilidad de presentar RTP propia. Para evaluar esta posibilidad, se hizo un estudio de la emisión de RTP por la T4 en disolución. Para ello, se prepararon disoluciones de T4 de la misma concentración que las utilizadas en fluorescencia, añadiendo al medio sulfito sódico (concentración final 0,01 M) para desoxigenar el medio y glicerol (50% v/v) para aumentar la viscosidad de la disolución y favorecer la inmovilización de la T4 potenciando así su fosforescencia. Los resultados del ensayo fueron negativos (Diaz Garcia y Sanz-Medel, 1986), (Basdediós Prieto, 2015).

#### 4.3.2. RTP de T4 en soporte sólido.

La fosforescencia a temperatura ambiente requiere habitualmente de la inmovilización de la especie emisora para potenciar la fotoluminiscencia. Aunque existen varias metodologías para conseguir esta inmovilización, una de las más clásicas consiste en impregnar el papel absorbente no luminiscente con una molécula de interés (Zhao et al., 2016)

##### 4.3.2.1. Caracterización del papel.

Puesto que la tiroxina T4 no parece presentar fosforescencia por sí sola, se pretende evaluar la posibilidad de una determinación indirecta de T4 mediante la inducción de fosforescencia en una sonda fosforescente por medio de los átomos de yodo presentes en su estructura molecular (efecto del átomo pesado).

Para ello, vamos a emplear un colorante fosforescente (Eosina Y o Rodamina B) inmovilizado sobre papel. Con objeto de conocer el fondo de fosforescencia que pueda producir el papel por sí mismo se van a realizar dos experimentos.

En primer lugar se determinará el espectro de emisión de fosforescencia del papel en ausencia de reactivos. Para ello recortamos un papel de filtro y lo colocamos en una cubeta especial con ayuda de un poco de cinta adhesiva, determinando su espectro de fosforescencia. Las rendijas de los monocromadores se mantienen abiertas al máximo (15 nm en el de excitación y 20 nm en el de emisión) y las longitudes de onda de emisión y excitación se optimizan mediante espectrometría de fosforescencia

sincrónica. Se empleó un tiempo de demora de 0,01 ms y un tiempo de integración de 0,1 s.

**Figura 15. Espectro de emisión de fosforescencia en papel.  $\lambda_{Ex}=275$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu$ s.**

Los resultados obtenidos no indican emisión de fosforescencia en ninguna longitud de onda.

#### **4.3.2.2. Caracterización de la tiroxina en papel.**

La metodología anterior constata claramente que el papel no es capaz de producir RTP por sí mismo, pero no queda claro si la presencia de átomos pesados puede inducir algún tipo de señal. Tampoco se ha determinado si la inmovilización de la T4 sobre un soporte sólido puede potenciar su señal de fosforescencia, inexistente hasta el momento con los experimentos realizados.

Para responder a las preguntas anteriores, preparamos una disolución de tiroxina  $5 \times 10^{-5}$  M y depositamos 100  $\mu$ L de la misma sobre el papel, esperando posteriormente 30 minutos hasta que se seque y caracterizándolo por RTP posteriormente.

**Figura 16. Espectro de fosforescencia de la tiroxina en papel.  $\lambda_{Ex}=275$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Rendija de emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu$ s.**

A partir de los espectros mostrados, se puede concluir que ni el papel ni la T4 aportan un fondo de fosforescencia significativo.

#### **4.3.3. Determinación de T4 por RTP empleando sondas fosforescentes.**

##### **4.3.3.1. Caracterización de la rodamina y la eosina en papel.**

Una vez establecido que la T4 no tiene propiedades fosforescentes intrínsecas y que el papel empleado como soporte sólido no aporta señal de emisión apreciable, el siguiente paso es caracterizar la fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido (SS-RTP) de los colorantes que se pretenden emplear como sondas fosforescentes.

Caracterizaremos la Rodamina en papel. Para ello utilizamos 100  $\mu\text{L}$  una disolución con una concentración de  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  y lo dejamos secar durante unos 30 minutos. Obtendremos el espectro de emisión de fosforescencia barriendo desde los 525 hasta los 700 nm en disolución.

También vamos a caracterizar la Eosina Y. Para ello añadimos 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de Eosina Y  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  y lo dejamos secar durante unos 30 minutos. Obtendremos el espectro de emisión barriendo desde los 410 hasta los 550 nm.

**Figura 17. Espectros de emisión de fosforescencia de Rodamina y EosinY en papel.  $\lambda_{\text{Ex}}=540 \text{ nm}$ ; Rendijas de excitación y emisión 20 nm;; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

#### **4.3.3.2. Influencia de la T4 en la RTP de las sondas fosforescentes.**

Como primer paso, se estudió la influencia que la T4 tiene sobre la emisión de RTP de las distintas sondas propuestas en este trabajo.

Para ello recortamos 12 papeles. A 6 de ellos añadiremos 100  $\mu\text{L}$  de Rodamina y a otros 6 100  $\mu\text{L}$  de Eosina Y. Utilizamos la misma concentración que en los casos anteriores.

También prepararemos 5 disoluciones en 5 eppendorf de tiroxina para ver cómo se comporta. Dado que la disolución patrón de T4 está preparada en NaOH 0,01 M, las disoluciones se preparan empleando la misma disolución de sosa para que todas tengan una concentración final idéntica de NaOH.

- Un blanco consistente en NaOH 0,01 M.
- Disolución 1: 100  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 900  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,01 M
- Disolución 2: 200  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 800  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,01 M
- Disolución 3: 300  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 700  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,01 M
- Disolución 4: 400  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 600  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,01 M
- Disolución 5: 500  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,01 M

Lo que se correspondería, considerando también un blanco de tiroxina, con:

- Un blanco con 100  $\mu\text{L}$  consistente en NaOH 0,01 M
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 1
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 2
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 3
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 4
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 5

Hacemos un barrido desde los 625 nm hasta los 800 nm.

**Figura 18. Espectros de emisión de fosforescencia de Eosina + T4.  $\lambda_{\text{Ex}}=540$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

**Figura 19. Espectros de emisión de fosforescencia de la Rodamina + T4.  $\lambda_{\text{Ex}}=540$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

Debido a que tanto la intensidad como la relación de concentraciones son mucho mejores en el caso de la rodamina que en el caso de la Eosina Y, escogeremos el primer colorante para realizar los posteriores ensayos.

Procedemos entonces a hacer un calibrado, empleando concentraciones más bajas de T4 para no perder la linealidad de la respuesta.

Preparamos 5 disoluciones:

- Disolución 1: 100  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 900  $\mu\text{L}$  de NaOH
- Disolución 2: 150  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 850  $\mu\text{L}$  de NaOH
- Disolución 3: 200  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 800  $\mu\text{L}$  de NaOH
- Disolución 4: 250  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 750  $\mu\text{L}$  de NaOH
- Disolución 5: 300  $\mu\text{L}$  de tiroxina + 700  $\mu\text{L}$  de NaOH

Las 5 muestras en papel corresponderán a:

- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 1
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 2
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 3
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 4
- 100  $\mu\text{L}$  Colorante + 100  $\mu\text{L}$  de la disolución 5

Hacemos un barrido desde 625 hasta 800.

**Figura 20. Espectros de fosforescencia de rodamina + T4 (1).  $\lambda_{\text{Ex}}=540$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

Como se puede observar en las figuras 18 y 20 no existe una relación entre la intensidad obtenida y la concentración de tiroxina. Esto puede deberse a que la tiroxina no se distribuye de manera uniforme sobre el papel.

Para tratar de solucionar este problema y obtener distribuciones sobre el papel más uniformes y medidas más reproducibles, se modifica el sistema de secado de las muestras.

Hasta ahora las muestras se secaban mediante aire comprimido, lo que puede originar problemas ya que parte de la cantidad adicionada puede ser arrastrada por la corriente de aire.

Para solucionar este problema, se repite el experimento dejando secar la disolución de rodamina durante 1 hora a temperatura ambiente, adicionando posteriormente la tiroxina y dejándola secar durante otra hora.

Las condiciones espectroscópicas de medida son las mismas que en el caso anterior.

**Figura 21. Espectros de fosforescencia de rodamina + T4 (2).  $\lambda_{\text{Ex}}=540$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Rendija de emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

Con el nuevo procedimiento de preparación y secado de las muestras se observa una mejoría apreciable en la respuesta del sistema, si bien algunas muestras (ej. 200 de T4) se salen del comportamiento esperado. Habiendo comprobado la importancia del secado para obtener papeles con la sonda fosforescente de forma reproducible, se intentaron mejorar los resultados obtenidos modificando el procedimiento de secado. Para ello, se repitió la misma operación que en el caso anterior, pero dejando secar los papeles impregnados con la disolución de rodamina a temperatura ambiente durante 24 horas y en ausencia de luz.

**Figura 22. Espectros de fosforescencia de rodamina + T4 (3). ).  $\lambda_{EX}=540$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu$ s.**

Hacemos la recta de calibrado correspondiente a la figura 20.

**Figura 23. Recta de calibrado para fosforescencia**

Sensibilidad:  $130,39 \pm 332,93 \mu\text{M}^{-1}$

$R^2$ : 0,975

Límite de detección:  $1,7 \mu\text{M}$

La recta de calibrado tiene un coeficiente de regresión muy bajo, probablemente debido al hecho de que al agregar la disolución de tiroxina sobre el papel con el colorante impregnado, se solubiliza parcialmente la sonda produciendo una pérdida en la homogeneidad del recubrimiento del papel que es observable a simple vista.

Como alternativa se estudió la viabilidad de otras dos sondas con propiedades de fosforescencia a temperatura ambiente conocidas: la albúmina de suero bovino (BSA) (Macchia y Sánchez-Flórez, 2007) y el antibiótico  $\beta$ -lactámiconafcilina (Fernández-González et al., 2003).

Se preparan, por tanto, dos disoluciones patrón, una de nafcilina de  $1 \times 10^{-4}$  M y otra de BSA  $1 \times 10^{-5}$ M.

Se repiten los experimentos empleando las mismas condiciones experimentales que hasta ahora, pero cambiando los 100  $\mu$ L de colorante por 100  $\mu$ L de antibiótico o de



BSA. Se preparan, pues, 5 disoluciones y 5 papeles al igual que en los casos anteriores.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión, así como los tiempos de demora y de integración adecuados para el análisis por RTP de estas sondas se obtuvieron de trabajos previos reportados en la literatura (Fernández-González et al., 2003)

**Figura 24. Espectros de emisión de fosforescencia de BSA con tiroxina.  $\lambda_{Ex}=283$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 200 ms; Tiempo de demora 20  $\mu$ s.**

**Figura 25. Espectro de fosforescencia de nafcilina + T4.  $\lambda_{Ex}=283$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 200 ms; Tiempo de demora 20  $\mu$ s.**

Como puede apreciarse en los espectros mostrados en las figuras 24 y 25, la relación entre la señal de RTP de la sonda y la concentración de T4 es aleatoria.

#### **4.3.3.3. Efectos del yoduro potásico.**

Preparamos una disolución de KI.

Dado que la metodología propuesta para el análisis de T4 se basa en la capacidad de ésta para inducir RTP en otras moléculas que actúan como sondas gracias a la presencia de 4 átomos de yodo en su estructura moléculas, se decidió evaluar la influencia que el yodo por sí tiene en la fosforescencia de las sondas empleadas.

Para ello se toman 50  $\mu$ L de la disolución de KI 1M que habíamos preparado y los añadimos junto con agua a un matraz de 50 mL obteniendo una disolución de KI 0,01 M.

Preparamos 5 papeles a los que añadimos 100  $\mu$ L de Rodamina y 20, 30, 40, 50 y 60  $\mu$ L de KI con NaOH hasta hacer 1 ml, cogiendo de cada eppendorf 100  $\mu$ L, de modo que la cantidad de yodo en cada papel sea cuatro veces la de su equivalente en T4. Elegimos estas concentraciones para evitar la saturación de la señal en el detector.

**Figura 26. Espectros de fosforescencia de Rodamina + KI.  $\lambda_{\text{Ex}}=275$  nm; Rendijas de excitación y emisión 20 nm; Tiempo de decaimiento 20 ms; Tiempo de demora 100  $\mu\text{s}$ .**

Como se puede apreciar en la figura 23, la dependencia de la RTP de la rodamina con la concentración de yoduro es clara, aunque aparentemente aleatoria. Este fenómeno se debe, como ya se mencionó en los apartados anteriores, a la dificultad de obtener la sonda inmovilizada de forma reproducible sobre el papel y la solubilización parcial de la misma al agregar la disolución de yoduro que contribuye aún más a la inhomogeneidad de la sonda inmovilizada.

## 5. Conclusiones.

Las principales conclusiones de este trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Se ha caracterizado espectrofotométricamente la tiroxina T4, estableciendo la sensibilidad y el límite de detección para la determinación directa de dicha hormona por espectrofotometría de absorción molecular.
- Se ha caracterizado la fotoluminiscencia de la tiroxina T4, estableciendo que tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo, incrementándose a pH ácido.
- Se ha caracterizado la fosforescencia a temperatura ambiente de una disolución de tiroxina de alta viscosidad, así como de la tiroxina T4 inmovilizada sobre papel, sin detectar una señal luminiscente apreciable.
- Basándose en la presencia de yodo en la tiroxina, se utilizó esta molécula para inducir RTP en sondas fosforescentes previamente descritas para conseguir así la determinación indirecta de la hormona por RTP.
- Se establecieron las características analíticas para la determinación indirecta de T4 por RTP basándose en la inducción de fosforescencia de rodamina inmovilizada en papel, sentando las bases para una nueva metodología.

## 6. Perspectivas futuras.

La principal carencia de la metodología propuesta en este trabajo es la irreproducibilidad. Requiere mucha práctica y habilidad preparar los papeles con la

sonda inmovilizada de forma reproducible. Además, la solubilización parcial de la sonda inmovilizada que se produce al agregar el analito contribuye aún más a la pérdida de homogeneidad y, por ende, a la irreproducibilidad. Por eso, como perspectivas futuras se plantean:

- Inmovilización simultánea de la sonda y la muestra sobre el papel, impidiendo así la resolubilización de la sonda.
- Utilización de otros soportes sólidos, como xero-geles o resinas de intercambio donde la lixiviación de la sonda pueda controlarse.
- Adaptar la metodología a RTP en disolución empleando micelas o ciclodextrinas (Micelle-Stabilized Room Temperature Phosphorescence MS-RTP).

## 7. Bibliografía.

Ardila, E. (1981). La calcitonina. *Acta Med Colomb*, 6, 33.

Basdediós Prieto, N. (2015). Síntesis, caracterización y empleo de nanopartículas de carbono dopadas con nitrógeno como fases sensoras para metales.

Brandan, Nora C.; Llanos, Isabel Cristina; Horak, Francisco A.; Tannuri, Hugo O.; Rodríguez, Andrea N. *Hormonas tiroideas* (2014). Universidad nacional del nordeste. Facultad de medicina. Cátedra de bioquímica.

Carrasco, J. R. B. (2010). Las hormonas tiroideas en el desarrollo del cerebro. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

Chemburkar, S. R., Deming, K. C., & Reddy, R. E. (2010). Chemistry of thyroxine: an historical perspective and recent progress on its synthesis. *Tetrahedron*, 66(11), 1955-1962.

Díaz García, M. E., & Sanz-Medel, A. (1986). Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room temperature phosphorescence. *Analytical Chemistry*, 58(7), 1436-1440.

Domínguez, I., Reviriego, S., Rojo-Martínez, G., Valdés, M. J., Carrasco, R., Coronas, & Romero, S. G. (2004). Déficit de yodo y función tiroidea en una población de mujeres embarazadas sanas. *Medicina clínica*, 122(12), 449-453.

Fernández-González, A., Badía, R., & Díaz-García M.E. (2003). Sensitive flow-injection system for nafcillin determination based on non-protected room temperature phosphorescence. *Analytica chimica acta*, 498(1), 69-77.

FERRANDO, G., & BOZA, J. (1990). Participación hormonal en el metabolismo energético.

Frackowiak, D. (1988). The Jablonski diagram. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2(3), 399.

Galofre, J. C., Santos, S., & Salvador, J. (2006). Marcadores de función tiroidea (II). Evaluación de la acción tisular.

Kit comercial Acofarma. Tiroxina-L sal sódica. Ficha de información técnica.

M. M. Santamaría-Solves "Calibración de un espectrofluorímetro multi-funcional para la medida de la evaluación (visual) de colores fluorescentes" Trabajo Fin de Máster en Optometría Avanzada y Ciencias de la Visión, 2010.

Macchia, C. L., & Sánchez-Flórez, J. A. (2007). HIPOTIROIDISMO EN EL EMBARAZO Hypothyroidism in pregnancy. *Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*, 58(4), 316-321.

Marín, M. (2010). Principio básicos de la función tiroidea. Informativo. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, Endocrinología.

Misra, V., Mishra, H., Joshi, H. C., & Pant, T. C. (2000). Excitation energy transfer between acriflavine and rhodamine 6G as a pH sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 63(1), 18-23.

Montero-Pedrazuela, A. (2006). Modulación de la neuritogénesis y de la conducta por hormonas tiroideas en ratas adultas.

Morales, C. A., & Rodríguez, N. (2005). Hormonas tiroideas en la reproducción y en la producción láctea del ganado lechero: revisión de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 136-148.

Morreale de Escobar, G., & Escobar del Rey, F. (2008). Metabolismo de las hormonas tiroideas y el yodo en el embarazo. Razones experimentales para mantener una ingesta de yodo adecuada en la gestación.

Navarro Despaigne, D. A. (2005). Interrelación entre hormonas tiroideas y crecimiento: importancia clínica. *Revista Cubana de Endocrinología*, 16(3), 0-0.

Obregón, M. J. (2007). Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas.

Quiroga-Sánchez, V. G. (2013). Origen del nombre de la glándula tiroides o tiroidea. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 21(4), 154-158.

Ramos-Martos, N. (1999). Determinación de principios activos en fármacos mediante el uso de técnicas fluorimétricas.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (1998). *Principios de análisis instrumental*. Ed. McGraw Hill, 5ta Edición, 2001, ISBN, 217660172.

Vélez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J, Orrego A. *Endocrinología*. 6ª Edición. Editorial Quebecor Word Bogotá SA, Medellín, Colombia, 2007.

Zaninovich, A. A. (2001). Hormonas tiroideas, obesidad y termogénesis en grasa parda. *Medicina*, 61, 597-602.

Zhao, H., Zang, L., Qin, F., Wang, P., Zhao, H., Zhang, Z., & Cao, W. (2016). Nonlinear phosphorescence quenching mechanism of gadolinium labeled porphyrin by oxygen on filter paper. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 316, 7-11.