

**Universidad del País Vasco / Euskal
Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)**

**Facultad de Ciencias Químicas / Kimika
Zientzien Fakultatea**

Kimikako Gradua

GRADU AMAIERAKO LANA

**Printzipio aktiboen koordinazio konplexu
berrien propietate fisiko-kimikoak
neurtzeko eta aztertzeko erabilitako
protokoloen optimizazioa**

Egilea: Intza Ruiz Orotegui

**Zuzendariak: Dra. Rosa Garcia Arrona eta Dra. Eider
San Sebastian Larzabal**

AURKIBIDEA

1. LABURPENA	1
2. SARRERA	4
2.1 FARMAKOEN EZAUGARRI FISIKOKIMIKOAK.....	4
EZAUGARRI FISIKOKIMIKOAK HOBETZEN.....	6
KOORDINAZIO KIMIKA.....	7
2.2. UV-VIS ESPEKTROSKOPIA.....	10
2.3 DATUEN ANALISIRAKO METODOAK.....	12
2.3.1 ERREGRESIO LINEALA.....	12
2.3.2 SLR (Simple Linear Regression).....	12
2.3.3 MLR (Multiple Linear Regression).....	13
2.4 HELBURUAK.....	13
3. PROZEDURA ESPERIMENTALA	15
3.1 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN SINTESIA.....	15
3.2 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN KARAKTERIZAZIOA.....	15
3.2.1 INFRAGORRI ESPEKTROSKOPIA.....	15
3.2.2 KONDUKTIBITATEA.....	15
3.3 KONPLEXUAREN EGONKORTASUNAREN ANALISIA.....	15
3.4 KALIBRATU ZUZENAREN LORPENA.....	16
3.5 S ETA S_{eff} PARAMETROEN NEURKETA.....	16
3.6 Log $P_{o/w}$ PARAMETROAREN NEURKETA.....	17
4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	19
4.1 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN SINTESIA ETA KARAKTERIZAZIOA.....	19
4.2 EGONKORTASUNAREN ANALISIA.....	21
4.3 KALIBRATU ZUZENAK.....	22
4.3.1 DIKLOFENAKO pH 7.....	23
4.3.2 DIKLOFENAKO pH 1.....	26

4.3.3 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 7.....	32
4.3.4 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 1.....	38
4.4 DISOLBAGARRITASUNA (S) ETA DISOLBAGARRITASUN EFEKTIBOAREN (S _{eff}) LORPENA.....	48
4.4.1 DIKLOFENAKO pH 7	48
4.4.2 DIKLOFENAKO pH 1	51
4.4.3 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 7.....	54
4.4.4 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 1.....	56
4.5 LOG P _{O/W} -ren LORPENA.....	60
4.5.1 pH 7 INGURUNEA.....	61
4.5.2 pH 1 INGURUNEA.....	64
4.6 LORTUTAKO DATUEN LABURPENA.....	67
5. ONDORIOAK	69
6. ERANSKINAK	73
LOG P _{O/W} LORPENEAN LORTUTAKO ESPEKTROAK.....	73
pH 7.....	73
pH 1.....	74
7. BIBLIOGRAFIA.....	76

1. LABURPENA

Ikerketa-lan honen helburua, garatzen ari diren farmako gehienen biodistribuzio baxuarekin lotutako arazoak murrizteko, farmakodun koordinazio konposatuak sortzean datzan estrategia bat baliozkotzea da, horretarako, eta lehen aldiz, Kimika Analitikoak eta Kimika Ezorganikoak duten indarrak uztartuz. Zentzu horretan, Kimika Ezorganikoko laborategian farmakodun koordinazio konposatuak sintetizatu eta karakterizatu dira, eta Kimika Analitikoko laborategian, biodistribuzioarekin lotuta dauden ezaugarri fisikokimiko garrantzitsuenak ikertu eta kuantifikatu, teknika analitiko eta estatistiko egokiak erabiliz.

Laburki, administratutako farmakoaren ahalik eta frakzio handiena xede-organora iritsi dadin, printzipio aktiboak ingurune akuosoetan disolbagarritasun handia izateaz gain, mintz biologikoen bitartezko iragazkortasunak ona izan behar du. Beraz, printzipio aktibo baten eta metal baten arteko koordinazio konposatuaren sorrerari esker, ematen du, solubilitate eta permeabilitatearen balioak hobetu egiten direla edo kasurik okerreanean, bietako bat soilik hobetzen dela.

Beraz, estrategia hau balioztatzeke, ikerlan honetan, printzipio aktiboen koordinazio konposatu bat sintetizatu eta karakterizatu da (Eu_diklofenako (1)), printzipio aktiboa diklofenakoa eta metala europioa izanik. Bioerabilgarritasunaren hobekuntza balioztatzeke, Eu_diklofenako (1) konplexuaren disolbagarritasuna eta oktanol/ur banaketa koefizientea neurtu da, fisiologikoki garrantzitsuak diren ingurunetan. Bi parametro hauek, datuen analisirako bi metodo desberdin erabiliz neurtu dira (SLR eta MLR); hauek, beraien artean alderatuko dira, emaitza hobekak lortzeko datuen analisirako metodo egokiena zein den definitzeko. Lortutako emaitzen arabera, ikusi da, diklofenakoa europio metalera koordinatzea estrategia baliagarria dela diklofenakoaren bioerabilgarritasuna hobetzeko eta SLR metodoaren bitartez emaitza hobekak lortu direla. Gainera, determinatu da, denbora eta tenperaturaren kontrola ezinbesteko dela emaitza onak lortzeko, hauek, absorbantzia duten eraginaren ondorioz.

Beraz, lan honek datuen analisisetan erabiltzen diren herramienten garrantzia plazaratzen du, hala nola farmakoen biodistribuzioaren hobekuntzaren

estrategia on bat, koordinazio konposatuak sortzean datzala.

ABSTRACT

The aim of this research is to validate a strategy consisting in the creation of drug coordination compounds to reduce the problems associated with the low biodistribution of most of the drugs in development, combining for the first time the strengths of Analytical Chemistry and Inorganic Chemistry. In this sense, the Inorganic Chemistry Laboratory has synthesised and characterised drug coordination compounds and the Analytical Chemistry Laboratory has investigated and quantified the most important physicochemical characteristics related to biodistribution, using appropriate analytical and statistical techniques.

In summary, for the highest possible fraction of the administered drug to reach the target organ, in addition to the high solubility of the active substance in aqueous media, the permeability across biological membranes must be good. Therefore, the creation of a coordination compound between an active substance and a metal improves the solubility and permeability values or, in the worst case, improves only one of them.

Therefore, in order to evaluate this strategy, in this study a coordination compound of active substance (Eu_diclofenac (1)) has been synthesised and characterised, the active substance being diclofenac and the metal Europium. To assess the improvement of bioavailability, the solubility of the Eu_diclofenac (1) complex and the octanol-water distribution coefficient in physiologically relevant media have been measured. These two parameters have been measured using two different data analysis methods (SLR and MLR), which will be compared to define the most appropriate data analysis method for best results. Based on the results obtained, it has been shown that coordination of diclofenac with europium metal is a valid strategy to improve the bioavailability of diclofenac and that better results have been obtained with the SLR method. Moreover, it has been determined that time and temperature control is indispensable to obtain good results due to its effect on absorbance.

Therefore, this study reveals the importance of the tools used in data analysis, as a good strategy to improve drug biodistribution, which consists in the creation of coordination compounds.

2. SARRERA

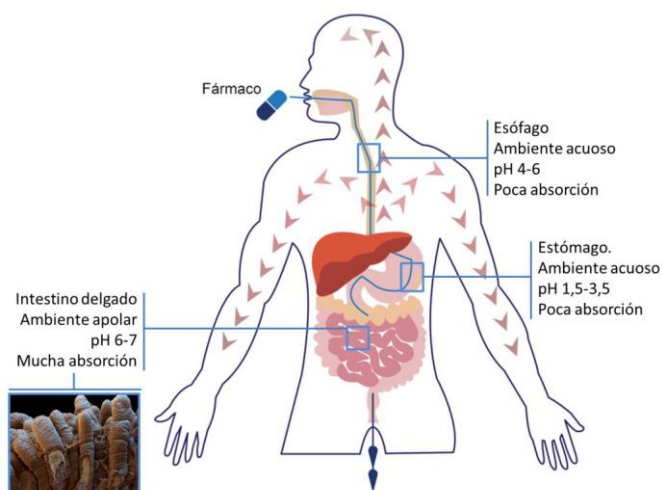
2.1 FARMAKOEN EZAUGARRI FISIKOKIMIKOAK

Gaur egun, garapenean dauden farmakoen %90-a ez da merkaturatzea lortzen, are gehiago, ez dute saiakuntza klinikoko lehenengo fasea gainditzen. Saiakuntza klinikoetako datuak ikusita, 2010-2017 urte bitartean garapenean zeuden farmakoen porrotak 4 erantzule nagusi izan ditu: eraginkortasun kliniko eza (%40-%50), toxizitatea (%30), farmakoen biodistribuzio eskasa (%10-%15) eta baliabide komertzial eza eta plan estrategiko oso xumeak (%10).¹

Eraginkortasun klinikoak farmakozinetikarekin lotura zuzena du. Farmako baten biodistribuzioa altua bada, honek eraginkortasun handia izango du, eta alderantziz. Farmakozinetikak, farmakoaren mugimendua aztertzen du organismoan zehar, hau sartzen den momentutik irteten den arte.² Farmakozinetikaren helburuak dira, organismoan zehar substantzia kimikoa zein proportziotan absorbatu eta banatu den jakitea eta farmakoaren metabolismoaren abiadura eta bideak eta baita honen iraupena eta denboran zeharreko farmakoaren kontzentrazio plasmatikoa aztertzea. Prozesu farmakozinetikoa,³ ADME akronimoaren bitartez ezagutzen da, izan ere, honek absortzio, distribuzio, metabolismo eta eskrezio/iraizketa prozesuak barne biltzen baititu. Prozesu hauetariko bakoitzak, bi osagai ditu, bata zinetikoa eta bestea hedapenezkoa. Lehenak, prozesuaren abiadura zehazten du ea bigarrenak aldiz, farmakoaren kopuruaren inguruko informazioa ematen digu.²

Arestian aipatu den moduan, ADME, farmakozinetikaren lau urratsak dira, farmakoaren absortzioa, distribuzioa, metabolismoa eta eskrezioa barne biltzen dituenak. Absortzioak, farmakoa administratzen den gunetik odolera transferitzeko duen mugimenduari egiten dio erreferentzia. Kasu honetan, ahoz irensten den farmakoak, administratzen denetik bere xede-organora iristen den arte oso ingurune desberdinak igaro behar ditu, bai pH-ari dagokionez, bai horien ur-edukiari dagokionez (1. irudia). Lehenik eta behin pH azidoa duten bi ur inguruetan (hidrofiliko) disolbatu behar dira (esofagoa eta urdaila), bertan farmakoarean adsortzio gutxi eman ohi delarik. Ondoren, hesteetako ingurune apolar eta neutrora (pH 7) iritsi eta adsortzio gehiena eman ohi da, hainbat mintz zelular zeharkatuz (hesteak, odol basoak...),

ingurune hidrofobikoa beraz, odol-fluxura iritsi baino lehen. Beraz, farmakoak iragazkorra izan beharko du.



1. irudia: gorpuztean zeharreko farmakoaren banaketa

Farmakoa adsorbatzen den gunetik (hesteak gehien bat), organismoan zehar hedatzen da odol fluxuaren bitartez interesatzen den organora iritsi arte. Behin farmakoa interesatzen den organora iristen denean, bertan eragin biologikoa suertatu eta ondoren, honek biotransformazio bat jasaten du gorpuztetik kanporatu ahal izateko eta hain zuzen ere, prozesu hau metabolismo bezala ezagutzen da. Farmakoa metabolizatu denean, eskrezi prozesua hasten da, farmakoa gorpuztetik kanporatu ahal izateko. Errazena farmakoa gorozkia edo gerneraren bitartez kanporatzea da, baina zenbait kasutan hau izerdiaren bitartez azaletik ere kanporatu daiteke.³ Farmako baten arrakasta beraz, farmakozinetikarekin erlazionatzen da, biodistribuzioa izanik parametro farmakozinetiko esanguratsuenak. Bioerabilgarritasuna, absorzio prozesuan farmako edo metabolito batek zirkulazioan sartzeko eta horrela bere ekintza-tokira iristeko duen gradua eta abiadura bezala definitzen da.⁴ Farmako baten bioerabilgarritasuna ona izango da, ingurune hidrofobikoetan edo polarretan disolbagarria denean eta ingurune hidrofobikoak zeharkatzeko gai denean. Bioerabilgarritasunaren arabera, farmakoak lau talde desberdinetan banatzen dira (1.taula):⁵

1. taula: farmakoen sailkapenerako disolbagarritasun eta permeabilitate balioak

Mota	Disolbagarritasuna (S)	Iragazkortasuna (P)
I	Altua	Altua
II	Baxua	Altua
III	Altua	Baxua
IV	Baxua	Baxua

Ingurune hidrofílico zein hidrofóbikoetatik zirkulazioan sartzeko, printzipio aktiboak, *a priori*, propietate kimiko kontrajarriak izan behar ditu, polartasuna eta apolartasuna. Horren ondorioz, farmako baten diseinuak disolbagarritasun eta iragazkortasun optimoa batera lortzea du helburu. Azken hau lortzea ez da batere erraza. Beraz, farmako batek bioerabilgarritasun baxua izatearen arrazoiak disolbagarritasun baxua edo/eta bio-mintzak zeharkatzeko irazkortasun baxua izatea da.

Baina zer dira disolbagarritasuna eta iragazkortasuna? Disolbagarritasuna, S, substantzia batek disolbatzaile batean disolbatzeko duen gaitasuna adierazten duen parametroa da. Iragazkortasuna aldiz, fluido batek material bat zeharkatzeko duen gaitasuna da, bere barne egitura aldatu gabe. Bi parametro hauek farmakologiaren adarrera ekarriz, disolbagarritasuna, farmako batek disolbatzaile batean disolbatzeko duen gaitasuna adierazten du eta, iragazkortasunak aldiz, farmakoak organismoan dauden mintz lipidikoak zeharkatzeko duen gaitasuna.

EZAUGARRI FISIKOKIMIKOAK HOBETZEN

Azken urteetan, ikerkuntza handia egin da farmako ezberdinen disolbagarritasuna hobetze aldera, izan ere, ahoz hartzen diren farmakoen bioerabilgarritasun baxuaren kausa nagusia disolbagarritasun baxua baita. Farmako bat ahoz irensten denean, hau ez da guztiz disolbatzen, eta honen ondorioz, farmakoaren kantitate txiki bat soilik absorbatzen da. Horrela, industria farmazeutikoa bultzatuta dago farmakoa dosi handiagoan merkaturatzera disolbatuko den farmakoaren frakzioa organismoan eraginkorra izateko. Beraz, farmakoen disolbagarritasuna hobetzeko, hainbat estrategia fisiko zein kimiko garatu dira azken urteetan. Horien artean daude,

partikularen tamaina txikitzea, kristal-egiturak modifikatzea, kapsulatzea, agente konplexatzaileen erabilera, agente surfaktanteen erabilera, solidoen dispertsioa edo printzipio aktiboen (PA) formulazioa gatz organiko edo/eta inorganiko moduan.⁶ Azken teknika hau, hau da, PA-k gatz moduan formulatzea, erabilgarria da disolbagarritasuna hobetzeko. Hala ere, iragazkortasunari dagokionez, honek eragin negatiboa du iragazkortasunean, azken hau jaitsiz.

KOORDINAZIO KIMIKA

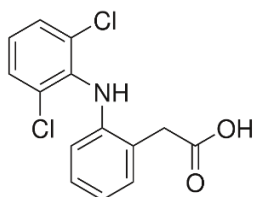
Aurretik aipatutako estrategiez gain, egun ikertzen ari den estrategia bat PA bat metal batera koordinatzea da, merkatuan eskuragarri dagoen farmako bat metal batekin koordinatzean farmakoaren administrazio mekanismoa kontrolatu baitaiteke, bere ekintza edo eragin terapeutikoa aldatu gabe eta, kasu askotan, efektibotasuna indartuz. Honela, farmakoaren disolbagarritasuna eta/edo iragazkortasuna hobetzea lortzen da. Disolbagarritasunaren hobetzea metalaren berezko izaera hidrofiliokoari egotz dakioken bitartean, iragazkortasunaren hobetzea kelato efektuagatik gertatzen da, metala farmako edo PA-ra koordinatzen denean, elektroiki dentsitatearen deslokalizazio bat ematen delako. Gainera, metalen koordinazioak kontrol handiago eskaintzen du, izan ere, farmakoan dauden atomo emaileen eskuragarritasunaren eta ligandoaren arabera, zentro metaliko bat aukera daiteke, eta esfera metalikoaren inguruko koordinazio-esferak farmakoen eta beste estekatzaile batzuen kokapen espaziala definitzen du geometria jakin batean. Metalaren koordinazioaren ondorioak era uniformeetan banatzen dira koordinazio esfera osoan zehar, horrela, ligando konplexuaren propietateak metalera egokitzeke aukera emanez.⁷

Hau horrela izanik, azken urteetan koordinazio konposatu ezberdinak garatu eta merkaturatu dira gaixotasun ezberdinen diagnostikorako zein tratamendurako, hala nola; Gd(III), Mn(II) eta Fe(III) konplexuak EMN-rako agente kontrastatzaile moduan, ^{99m}Tc, ²⁰¹Tl, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁵¹Co, ⁵¹Cr edo ¹⁶⁹Yb-n oinarritutako erradiofarmakoak, agente antimikrobiano moduan Ag(I) eta Sb(V) konplexuak, dismutasa superoxidoa mimetizatzeko Mn(II, III) eta Fe(II)-an oinarritutako koordinazio konplexuak, gorputzeko odol presioa jaisteko Fe(II) konplexuak, insulinararen efektua mimetizatzeko V(IV,V) konplexuak,

kantzerrari aurre egiteko Pt(II) konplexuak etb.⁸

Koordinazio-kimikaren abantaila handienetako bat da nahiko sinplea dela konposatu berrien sintesiari dagokionez. Baldintza bakarra litzateke PAREN egitura kimikoan metal batekin koordinatzeko gai diren talde funtzional bat edo gehiago egotea. Farmakoetan sarrien erabiltzen diren talde funtzionalen azterketa sinple baten arabera, printzipio aktibo gehienek (%80) heteroatomoak dituzte, eta modu egokian antolatuta daude metalarekin koordinatzeko eta printzipio aktiboen koordinazio konposatu bat eratzeko.⁹

Beraz, hau horrela izanik, azterlan honetarako printzipio aktibo gisa, diklofenakoa (-(2,6-dikloranilino)fenilazetikoa)¹⁰ aukeratu da (2. Irudia). Diklofenakoa (Voltaren edo beste izen komertzial batzuekin merkaturatua) antiinflamatorio ez-esteroide bat da. Hantura murrizteko eta artritis edo lesio bizien minak murrizteko analgesiko bezala erabiltzen da. Baita ere, zenbait kasutan, dismorrea eta hilerokoaren mina murrizteko ere erabil daiteke.



2. irudia: diklofenakoaren egitura

Azido diklofenakoa, sistema monoklinikoan, bi forma polimorfikoetan kristalizatzen da.⁽¹¹⁾ Bi forma hauetan, molekulak berain artean talde karboxilikoaren bitartez lotzen dira, horrela, dimero zentroisomeroak sortuz. Beraz, diklofenakoak, gaitasuna izango du zenbait metalekin koordinazio konposatuak sortzeko. Horretako, karboxilo taldea baliatzen du. Hau, desprotonatuta egongo da, hau da karboxilato eran (COO⁻). Beraz, karboxilato taldeko oxigenoa metalarekin lotuko da. Ondorioz, diklofenakoa karboxilato taldearen bitartez koordinatzen denez, honek ligando bidentatu moduan jokatzen du.⁽¹²⁾

Industria farmazeutikoan egin ohi den moduan, lan honetan ere, metalofarmako berriak giza gorputzean izango dituen ezaugarri

farmakozinetikoak aurrezaten saiatu gara. Ezaugarri hauen artean, konplexu berriak izango duen biodistribuzioa auresan da, horretarako, bai ur ingurune eta fisiologikoki esanguratsuak diren pH-etan duen disolbagarritasuna (S) eta disolbagarritasun efektiboa (S_{eff}) aztertuz (ikus metodoak atala), hala nola mintzak zeharkatzeko izan dezakeen gaitasuna, horretarako, ingurune polar batetik ingurune apolar batetara pasatzeko duen gaitasuna ikertuz. Azken hau, industria farmazeutikoan, $\text{Log } P_{o/w}$ parametroaren bitartez aztertzen da, hau da, substantzia baten oktanol-ura banaketa koefizientea (KOW), partizio koefizientea (POW) ere deitua, orekan dauden bi disolbatzaile nahastezinek osatutako nahaste bifasikoko substantzia horren kontzentrazioen arteko zatidura edo erlazioa da: n-oktanola eta Ura. Koefiziente honek, beraz, solutu baten disolbagarritasun diferentziala neurtzen du bi disolbatzaile hauetan. n-oktanola biotaren material lipidoa edo partikula organikoetan eta sedimentuetan oso ondo imitatzen duen konposatu organiko bat delako aukeratu da. Koefiziente honek substantzia baten hidrofobikotasuna edo uretan disolbatutako substantzia baten afinitate lipidikoa simulatzen du. Merkatura iritsi ohi diren farmakoen $\text{Log } P_{o/w}$ parametroa, orokorrean, -2 eta 2 baloreen artean aurkitu ohi da.

Beraz, lan honetan, diklofenako askearen eta diklofenakoarekin sorturiko koordinazio konposatu baten S, S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ balioak alderatuz, urdaileko pH azidoa eta heste meharreko pH neutroa mimetizatuz pH=1 eta pH=7-ko tanpoi disoluzioak erabiliz. Gainera, gorputzaren barruan dagoen tenperatura giro tenperaturaren desberdina denez, neurketak 37 °C-tan egin dira, eta neurketetan T^a -ren eragina ikertu. Erabilitako kuantifikazio teknika nagusia, Umore-ikuskor espektroskopia izan da. Teknika hau oso ezaguna den arren, bertatik lortzen diren datuen tratamendua ez da orokorrean behar bezala egiten. Orokorrean, beranduago azalduko den moduan, kuantifikazio teknika hau analitoaren Umore-ikuskor espektroak erakusten dituen banden absortzio maximoen balioetan oinarritzen da, bertatik analitoaren kontzentrazioa ondorioztatuz. Baina hau ez da beti modu egokiena eta hortaz, lan honetan, Kimika Ezorganikoa eta Kimika Analitikoaren alorrek bat egin dute, eta kimika medikuaren ikuspuntutik garrantzitsuak diren koordinazio konposatuen ezaugarri fisikokimikoen balioak lortu dira, Umore-ikuskor espektroskopiaren bitartez eta analitikoki zehatzak diren datuen tratamendu egokienak aztertu eta hoberena aukeratu ondoren.

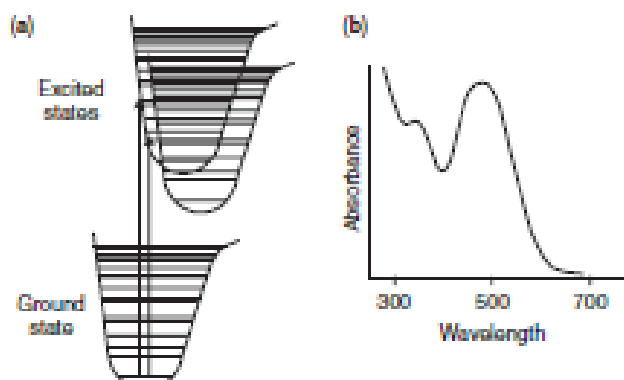
2.2. UV-VIS ESPEKTROSKOPIA

Lan honetan, analitoen kontzentrazioa zenbatetsi da hainbat ur disoluzioetan teknika espektroskopiko honen bitartez, honekin, bai S bai eta $\text{Log } P_{o/w}$ balioak lortuz (ikus Prozedura Esperimentalak).

UV-Vis absortzio espektroskopia, substantzia xurgatzaile batek erradiazio elektromagnetikoaren indargabetzea neurtzea da. Neurketa horiek uhin-luzera bakarrean edo espektro-gama zabal batean egin daitezke. UV/Vis espektroskopiaren tarte espektrala 190-900nm-koa da gutxi gora behera. Uhin luzeraren tarte txikia, 180 nm azpitik gas atmosferikoek ultramore argia absorbatzearen ondorio da.

UV/Vis espektroskopia, analisirako eta karakterizaziorako teknika oso erabilia da zientzian. Honen erabilera bi zatitan bana daiteke: (1) fase gaseoso, likido edo solido batean dagoen analito baten neurketa kuantitaboa eta (2) material baten propietate optiko eta elektronikoen karakterizazioa. Neurketa kuantitatiboak egiteko teknika honen erabilera, absorbatzailearen kontzentrazioaren eta absorbantziaren arteko erlazio linealean oinarritzen da.

UV/Vis fotoien energia nahikoa da elektroiak energia altuagoko egoeretara eszitzeko eta horrela, teknika hau material askoren propietate elektroniko eta optikoak determinatzeko erabiliz. Lehen aipatu den moduan, absorbantzia kontzentrazioarekiko proportzionala denez, trantsizio hauen energia (3. irudia) jakinda, konposatu absorbatzailearen kontzentrazioa jakina izango da.



3. irudia: a) molekula baten absortzio prozesurako energia-mailen diagrama b) Absortzio molekularren espektro adierazgarria

Analisi kuantitatiborako, muga batzuen barruan, lagin batetik hartutako argiaren absorbantzia, A , argiak laginean zehar egiten duen distantziarekiko eta espezie xurgatzailearen kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionala da. Erlazio lineal hauek, Lambert-Beer legea bezala ezagutzen dira:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3. \text{ ekuazioa})$$

Non, $A(\lambda)$ λ uhin luzeran neurtutako absorbantzia, ε uhin luzerarekiko independentea den absortzio molarra, b bidearen luzera eta c absorbatzailearen kontzentrazioa diren.

Lambert-Beer legearen erlazio lineala zenbait baldintzaren arabera da:

1. Erradiazio erasotzailea monokromatikoa eta lagin baten bidez kolimatua izan behar du.
2. Laginek, kalibraketa-patroik barne, homogenoak eta dispertsioaren galera errepikaezinik gabeak izan behar dute.
3. Disoluzio edo beira bateko matrizean dauden analitoen kasuan, xurgatzailearen kontzentrazioak nahiko txikia izan behar du espezie absorbatzailek elkar eragin ez dezaten.
4. Lambert-Beer legearen linearitatea espektrofotometroaren ezaugarrien arabera ere izango da.¹³

Teknika hau erabiliz, kontzentrazio ezezaguna duten analitoen disoluzioek aurkezten duten espektrotik lorturiko absorbantzia baloreetatik abiatuz, disoluzioaren kontzentrazioa lortu daiteke, analito horien kontzentrazio ezezaguna duten espektro desberdinen absorbantzia baloreak kontuan izanda. Orokorrean, absortzio maximoaren baliotik abiatuz kalibrazio zuzenak lortu, eta disoluzio ezezagunaren kontzentrazioa eratorri daiteke. Modu hau, ordea, ez da beti datuen analisirako metodo hoberena, eta, hurrengo parrafoetan, datuen analisi egokirako erabili daitezkeen metodoak laburbilduko dira.

2.3 DATUEN ANALISIRAKO METODOAK

2.3.1 ERREGRESIO LINEALA

Erregresio lineala, funtzio lineal baten bitartez bi aldagai edo gehiago erlazionatzeko erabiltzen den funtzio matematiko da. Gizartean aurkitzen diren fenomeno askok erlazio lineal bat dutenez, teknika hau oso ospetsua da eta asko erabiltzen da. Gainera, teknika hau garrantzitsuak diren aldagaien arteko erlazioa matematikoki zein bisualki erakusteko gai da. Erlazio matematikoari dagokionez, bi edo aldagai gehiago erlazionatzean lortzen den ekuazioa oso sinplea izateaz gain, soluzio bakarrekoa da, eta horrek gauzak asko errazten ditu.¹⁴

2.3.2 SLR (Simple Linear Regression)

Erregresio lineal sinplea, bi aldagaien arteko erlazioa modelatzeko zuzen baten ekuazioa erabiltzen du. Emaitza-aldagaia y izanik, eta aurreikuspen-aldagaia x , ekuazioa horrela izango da:

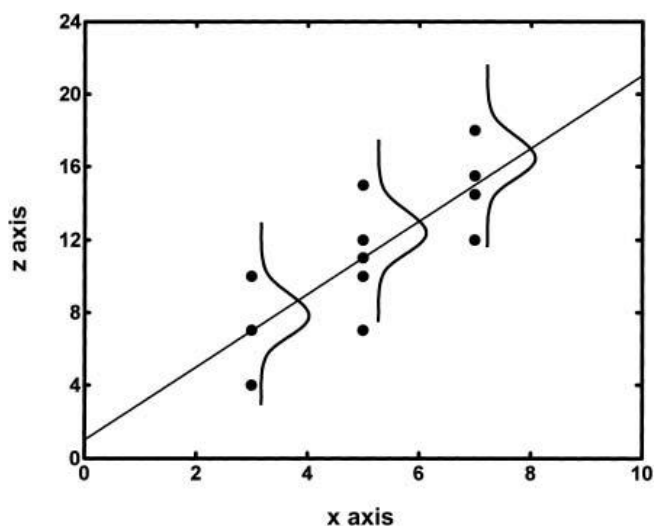
$$y = mx + c \quad (1. \text{ ekuazioa})$$

Non, m , y eta x aldagaien erlazio linealaren malda den eta c konstante bat den.

Erregresio lineal sinple bat aurrera eraman ahal izateko, hurrengo hipotesi aztertu behar dira:

1. Emaitza-aldagai eta aurreikuspen-aldagaiaren artean erlazio bat egon behar du. Balioak x ardatzean zehar handitzen doazen heinean, y aldatzeko balioak ere handitzen joango dira eta puntu-lainoak zuzen baten itxura hartuko du.
2. Erregresio zuzenaren inguruan dagoen bariazioa konstantea izango da.
3. Erregresio zuzenaren inguruan dauden datuen bariazioak, distribuzio normal bat edukiko du, aurreikuspen-aldagaiaren balore guztietan. Hau da, x aldatzeko edozein balio aztertzen bada, hauek kanpai itxura edo itxura normala izango dute erregresio zuzeneko puntu horretako balioarekiko. Puntu gehienak erregresio zuzenetik gertu egongo dira, eta puntu gutxiago honetatik aldentuta.
4. Datuen puntu bakoitzak erregresio zuzenarekiko duten desbiderazioa besteekiko independentea izango da. Puntu horren balioak erregresio zuzenarekin duen erlazioak ez du inongo erlazorik izango beste datu-multzoen puntuekin.

Beraz, lau hipotesi hauek betetzen badira (4. Irudia), eredu hau, baliozko eta optimo bezala kontsideratuko da.¹⁴



4. irudia: SLR-en lau hipotesiak

2.3.3 MLR (Multiple Linear Regression)

Erregresio lineal multipleak, SLR zabaltzen du aldagai esplikatzaile bat baino gehiago sartuz. Hala ere, kasu honetan baita, "lineal" terminoa erabiltzen jarraitzen da, suposatzen delako, erantzun-aldagaia, aldagai esplikatzaileen konbinazio linealarekin zuzenki erlazionatuta dagoela.

MLR-ren ekuazioa, SLR-ren ekuazioaren forma berdina du baino kasu honetan, termino gehiago ditu.¹⁵

$$y = mx + cy = m_1x_1 + m_2x_2 + m_3x_3 + \dots + m_nx_n + c \quad (2. \text{ekuazioa})$$

2.4 HELBURUAK

Ikerlan honetan, Europio (III) metala eta diklofenako farmakoaren artean sorturiko koordinazio konposatuaren (Eu_diklofenako (1)) sintesia, karakterizazioa eta S, S_{eff} eta Log P_{o/w} baloreen determinazioa egin da Umore-Ikuskor espektroskopiaren bitartez, fisiologikoki garrantzitsuak diren inguruetan eta 37 °C-ko tenperaturan.

Emaitzak datuen analisirako bi metodo desberdinen bitartez aztertuko dira. Lortutako emaitzak, beraien artean alderatuko dira, emaitzak hobeak lortzeko zein metodo den egokiena jakiteko.

Honekin guziarekin, lortu nahi dena da, printzipio aktiboen koordinazio konposatuen sorrera, bioerabilgarritasuna hobetzeko estrategia bezala balioztatzea eta S , S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ balioak determinatzeko metodo zehatzagoak bilatzea.

3.PROZEDURA ESPERIMENTALA

3.1 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN SINTESIA

Diklofenakoa ligando moduan duen europio konplexu bat sintetizatu zen. Horretarako, 1 mmol $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 5.0 mL MeOH-an disolbatu ziren eta ondo disolbatzeko plaka batean irabiatzen jarri zen. Beste alde batetik, ligandoarekin beste disoluzio bat prestatu zen 1,75 mmol diklofenako disolbatuz 20.0 mL MeOH-an. Azken disoluzio hau irabiatzen zegoelarik, metalaren disoluzioa gehitu zen bortizki ligando disoluzioaren gainera eta irabiatzen mantendu zen. 30 minutu irabiatzen eduki ondoren, solido txuri bat prezipitatu zen eta beraz, hau lortzeko, disoluzioa filtratu zen iragaz-papera erabiliz eta MeOH-arekin garbitu eta lehortzen utzi zen.

3.2 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN KARAKTERIZAZIOA

3.2.1 INFRAGORRI ESPEKTROSKOPIA

Sintesian lortutako solidoa infragorri espektroskopia bidez karakterizatu zen. Horretarako, 4000-400 cm^{-1} -eko tartean eta potasio bromurozko (KBr) pastila baten gainean espektro bat erregistratu zen Nicolet FT-IR6700 espektrometroa erabiliz. Lortutako espektroa, aurretik egina zegoen solido berdinarekin beste espektro batekin alderatu zen.

3.2.2 KONDUKTIBITATEA

Konduktibitatearen neurketa egiteko, 10^{-3} M-eko konposatuaren disoluzioa prestatu zen disolbatzaile bezala DMF erabiliz. Neurketak giro tenperaturan egin ziren Metrohm-Herisau 712 konduktimetroa erabiliz.

3.3 KONPLEXUAREN EGONKORTASUNAREN ANALISIA

Eu_diklofenako (1) konplexua ur disoluzioan eta pH =1,00 eta pH=7,02-ko inguruetan egonkorra zen edo ez jakiteko, konduktibitate froga batzuk egin ziren. Horretarako, 10^{-3} M-eko disoluzioak prestatu ziren, bat pH=1,00-an eta beste pH=7-an. Hauek, hiru une desberdinetan neurtu ziren. Lehenik, konplexua sintetizatu ondoren, bigarrenik sintetizatu eta aste batera eta azkenik, sintetizatu eta hiru astera.

3.4 KALIBRATU ZUZENAREN LORPENA

Absorbantzia eta kontzentrazioa erlazionatzen dituen kalibratu zuzenaren ekuazio lortzeko Eu_diklofenako (1) konplexuaren eta diklofenakoaren stock disoluzioak prestatu ziren pH=7,02 eta pH=1,00-ean eta ondoren UV-Vis espektroskopiaren bitartez neurtu ziren Agilent 8453 espektrofotometroa erabiliz, hau $37 \pm 2^\circ\text{C}$ -tan zegoelarik.

Disoluzio hauek prestatzeko, koordinazio konposatuaren edo ligandoaren kontzentrazio ezaguna disolbatu zen, baina saturazio puntu azpitik. Stock disoluziotik, datua adierazgarriak izateko behar beste diluzio egin ziren, espektrofotometroaren detektagailuaren tartea kontuan hartuz. Absorbantziaren sentsibilitate altuaren ondorioz, kubeten garbiketa garrantzi handikoa izan zen, eta hauek kontua handiz garbitu ziren ura eta azetona erabiliz. Baita ere, airea erabiliz kubetak ondo lehortu ziren aurreko disoluzioaren arrastorik ez izateko. Egindako diluzio bakoitzarekin UV-Vis espektro bana lortu zen eta datuen analisirako metodo ezberdinak erabiliz kalibratu zuzenaren ekuazioak lortu ziren. Datuen analisirako hurrengo metodoak erabili ziren; SLR (Simple Linear Regression) eta MLR (Multiple Linear Regression).

Neurketak egiterako garaian tenperatura konstante mantentzea ezinbestekoa izan zen. Horretako, stock disoluzioa 37 ± 2 C-tan mantendu zen ur bainu batean, eta espektrofotometroa ere tenperatura berean egoteko programatu zen.

3.5 S ETA S_{eff} PARAMETROEN NEURKETA

Diklofenako askearen eta Eu_diklofenako (1) konplexuaren disolbagarritasuna UV-Vis espektroskopiaren bitartez determinatu zen, pH = 7,02 eta pH = 1,00-ean eta $37 \pm 2^\circ\text{C}$ -tan.

Honetarako, saturazio puntuaren gainetik zeuden analito disoluzioak prestatu ziren, non, ligando edo konposatuaren kontzentrazio ezagunak disolbatu ziren. Disoluzio hauek, 2 minutuz irabiatzen jarri ziren plaka batean eta ondoren ultrasoinu bainu batean sartu ziren, horrela, ahalik eta analito gehien disolbatzeko. Suspentsioan zeuden partikulak eliminatzeko xiringa ($\theta = 0,45 \mu\text{m}$) bidezko filtrazioa erabili zen. Komenigarriak ziren diluzioak egin ziren

espektrofotometroaren detektagailuaren tartean sartzen diren espektroak lortzeko. Lortutako datuak, datuen analisirako metodo bakoitzetik lortutako ekuazioetan sartuz eta beharrezko kalkuluak eginez analitoaren disolbagarritasuna (S) determinatu zen.

Diklofenako askearen eta Eu_diklofenako (1) konposatuan diklofenakoak duen disolbagarritasuna konparatu hala izateko, disolbagarritasun efektiboa (S_{eff}) definitu zen.

$$S_{eff} = S \cdot PP_{dikl} \quad (4. \text{ Ekuazioa})$$

Non, S, Eu_diklofenako (1) aren disolbagarritasuna eta PP_{dikl} diklofenakoak konplexuan duen pisu ehunekoak diren.

3.6 Log $P_{o/w}$ PARAMETROAREN NEURKETA

Diklofenako askearen eta Eu_diklofenako (1) konplexuaren Log $P_{o/w}$ -ren lorpenerako, ura eta oktanol bolumen berdinak hartu ziren eta 24 h-z eta giro tenperaturan irabiatzen eduki ondoren, ura oktanolean saturatua (ura(o)) eta oktanela uretan saturatuta (oktanol(u)) lortu ziren.

Ondoren, ligando eta konplexuaren kontzentrazio jakina duen disoluzioak prestatu ziren ura(o) disolbatzaile moduan erabiliz. Disoluzioa hauek pH 7 eta pH11-ean prestatu ziren, bakoitzetik ligando eta konplexuaren bi kontzentrazio ezberdin prestatuz.

Prestatutako disoluzio hauek UM espektroskopiaren bidez neurtu ziren, horrela hasierako denboran disoluzioek zuten absorbantzia neurtzeko. Neurketak egin ostean, disoluzio horien 5 mL, beste 5 mL oktanol(u)-rekin nahastu ziren bial batean eta nahasketa hauek noria baten jarri ziren biraka 24 h-z. Kontzentrazio bakoitzeko disoluziotik bi erreplika prestatu ziren.

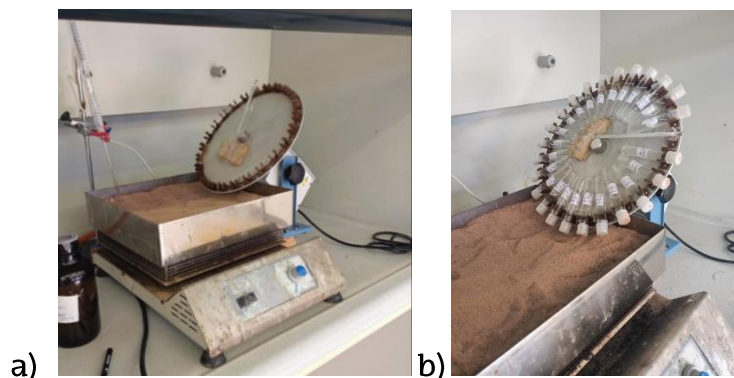
Behin 24 h-ak pasata, bialak noriatik atera ziren eta hauen neurketa egin zen UV espektrometria erabiliz. Neurketak egiteko, fase organikoa, hau da, oktanol (o), eta interfasea, baztertu eta fase akuosoa analizatu zen. Baita ere, hasierako disoluzioen neurketa errepikatu zen, absorbantzia aldaketaren bat zegoen ikusteko. Bial bakoitzaren neurketa hiru aldiz errepikatu zen.

Log $P_{o/w}$ -ren balioak ondorengo ekuazioaren bitartez lortu ziren:

$$\log P_{o/w} = \log \left[\frac{[X]_{okt}}{[X]_w} \right] = \log \left[\frac{[X]_{w,0} - [X]_{w,t}}{[X]_{w,t}} \right] \quad (5. \text{ Ekuazioa})$$

Non, $[X]_{\text{okt}}$ eta $[X]_{\text{w}}$, oktanol(u)-n eta ura(o)-n dagoen analito (X) kontzentrazioa den.

5 irudian ikus daiteke muntaia eta bertan noria. Lehen aipatu den moduan, neurketak 37 °C-tan egin ziren.



5. irudia: a) Log $P_{o/w}$ -parametroa neurtzeko erabilitako agitazio (noria) ekipoa b) laginak agitazio ekipoa kokatuta

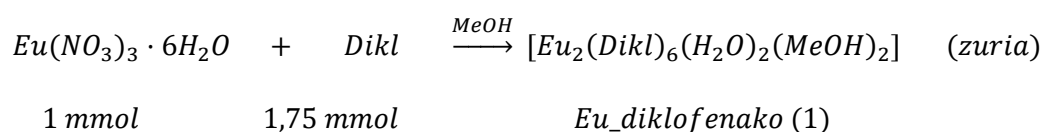
Disoluzioak norian zeuden bitartean tenperatura hor mantentzeko, noria hondar plaka baten ondoan jarri zen gas kanpai baten barruan. Hondar plaka hori 120 °C-ko tenperaturan egoteko programatu zen, izan ere, gas kanpaiko airearen ondorioz, bertako beroa galdu egiten baitzen. Noriako tenperatura kontrolatzeko, norian termometro bat gehitu zen.

4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

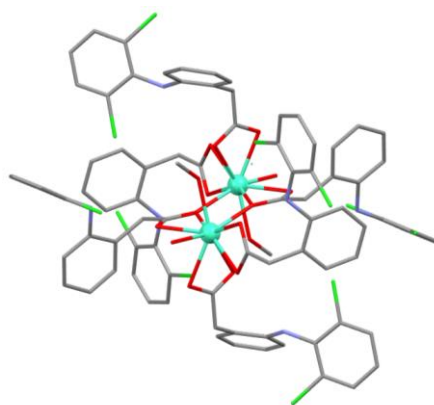
4.1 EU_DIKLOFENAKO (1) KONPOSATUAREN SINTESIA ETA KARAKTERIZAZIOA

Sintesia

Metal zentral gisa europio metala erabiliz eta ligando moduan diklofenakoa, Eu_diklofenako (1) konplexua sintetizatzea lortu zen. Kimika Ezorganikoa laborategiko Estitxu Etxenike doktoregaiak egindako sintesia jarraitu zen, eta sintesiaren eskema hurrengoa da:



Eu_diklofenako (1) konposatu monokristal zuria modura lortu zen. Etxenike doktoregaiak lorturiko emaitza kristalografikoen arabera, Eu_diklofenako (1) konposatua dimero zentrosimetrikoez osatuta dago (6. irudia), non metal-zentro bakoitza hiru ligando-molekularekin koordinatuta dagoen, baita ur-molekula batekin eta disolbatzaile-molekula batekin ere. Zentro metaliko bakoitzak LnO₉ koordinazio bat erakusten du. Molekularen karga LnIII ioi bakoitzaren hiru ligando desprotonatuekiko koordinazioaren bidez orekatzen da. Horietako bi karboxilato taldeko oxigeno atomoen bidez koordinatuta bidentatuak dira. Gainerako ligandoaren karboxilato taldea zubi kelatzaile moduan aritzen da, dimeroa sortuz. Dimeroak hidrogeno loturen bidez lotzen dira ondoko entitateetako ur molekulen eta oxigeno karboxilato atomoen bidez, eta a ardatz kristalografikoan hazten diren dimentsio bakarreko kate supramolekularrak eratzen dira.



6. irudia: Eu_diklofenako (1)-aren egitura

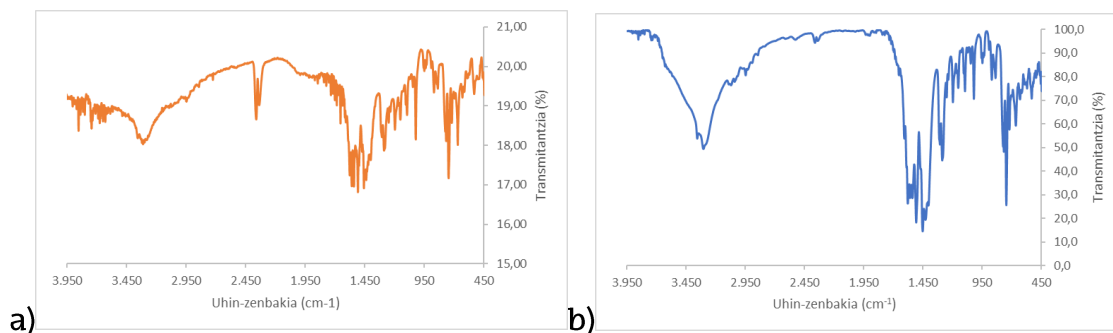
Lan honetan jarraituriko sintesia burutu ondoren irudiko konposatua lortu zela baieztatzeko, Eu_diklofenako (1) konposatua teknika desberdinen bitartez karakterizatu zen eta Etxenike doktoregaiak lorturiko emaitzekin alderatu zen.

Karakterizazioa

FTIR: Alde batetik, lortutako solidoa espektroskopia infragorri bidez karakterizatu zen. Horretarako, Etxeniko doktoregaiak lortutako Eu_diklofenako (1) konplexuaren espektroa, sintesian lortutako solidoaren espektroarekin alderatu zen. 7. irudian ikus daitekeen moduan, nahiz eta sintetizatutako solidoaren espektroa diluitugo dagoen, seinaleak uhin zenbaki antzekoan agertzen dira. Beraz, sintetizatutako produktua Eu_diklofenako (1) konposatua dela esan daiteke. Seinale esanguratsuenak honako hauek dira:

FTI-R espektro aztertuz, 3653 cm^{-1} inguruan, amina taldearen N-H loturaren bibrazioari egotzen zaio; hau, 3404 cm^{-1} inguruko banda zabal zabalaren azpitik doa, O-H loturaren bibrazioari dagokiona. Maiztasun baxuagoan, eraztun aromatikoaren C-H loturen bibrazioarekin bat datozen intentsitate ertaineko seinale zorrotzen multzoa nabarmentzen da, 3373 cm^{-1} eta 3289 cm^{-1} artean.

Hurrengo bibrazio indartsuenak, $1589\text{--}1442\text{ cm}^{-1}$ tartean kokatuak daudenak, talde karboxilikoaren bibrazio asimetrikoei, hala nola eraztun aromatikoan dauden C-C loturen bibrazioei egotzen zaizkie. $1373\text{--}1268\text{ cm}^{-1}$ uhin zenbaki tartean, karboxilato taldearen bibrazio simetrikoen seinaleak agertzen dira. Maiztasun baxuagoan aurkitzen diren gainerako seinaleek eraztun aromatikoetan eta diklofenakoaren talde karboxilikoetan sortzen diren distortsioei egotzi ahal zaizkie.



7. irudia: a) Sintetizatutako Eu_diclofenako (1)-aren IR espektroa b) Etxeniko doktoregaiak lortutako Eu_diclofenako (1) konplexuaren espektroa

Eroankortasuna: Baita ere, lortutako solidoa karakterizatzeko konduktibitatea erabili da. Eu_diclofenako (1) konplexua neutroa da, izan ere, bere formula molekularri erreparatuz, $[Eu_2(Dikl)_6(H_2O)_2(MeOH)_2]$ ondorioztatu daiteke by Dy^{3+} katioien 6 karga positiboak, sei diklofenako desprotonatuen bitartez neutralizatzen dela; beraz, bere konduktibitatearen balioak $0-65 \mu S \cdot cm^{-1}$ ⁽¹⁶⁾ tartean egon behar dute. Konduktibitatearen neurkeren bitartez ondorengo emaitza lortu da:

$$\Lambda = 9,825 \mu S \cdot cm^{-1}$$

Balioa erreparatuz, ikusten da, konposatu neutro baten konduktibitatearen balioen tartean sartzen dela, eta beraz, sintetizatutako konposatua neutroa dela.

Beraz, infragorri espektroskopia erabiliz eta konduktibitatearen balio aintzat hartuz, sintetizatutako produktua Eu_diclofenako (1) konplexua dela ondorioztatu da.

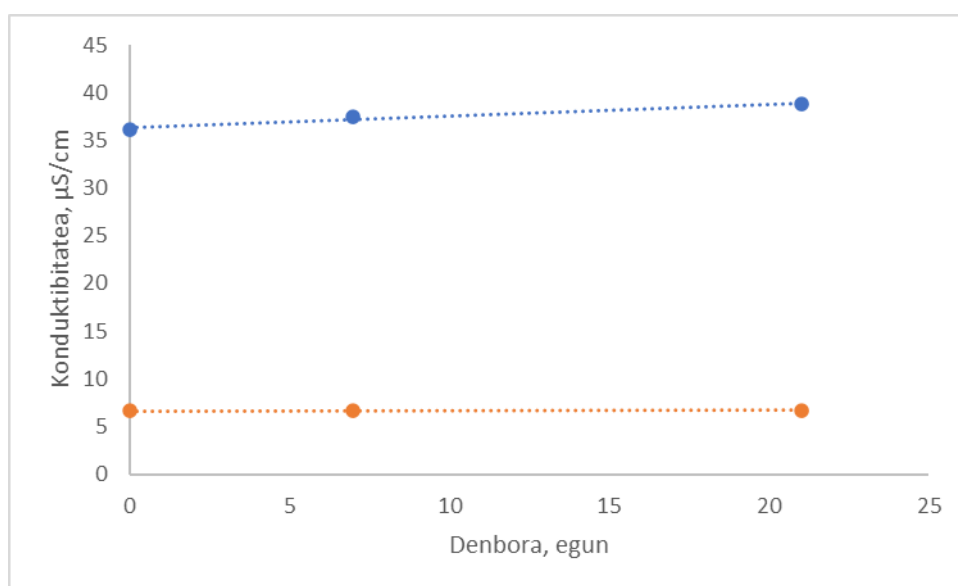
4.2 EGONKORTASUNAREN ANALISIA

Ur disoluzioan konplexuaren egonkortasuna zenbatekoa den jakitea garrantzitsua da, ezaugarri fisikokimikoak estimatzeko garaian, konposatua ur ingurunean egon beharko bait da hainbat orduz, eta estimatutako ezaugarriaren balorea denboran zehar egonkor mantendu beharko litzateke. Hau aztertzeko, eta konplexua egonkorra dela baieztatzeko, honen konduktibitatearen balioak ez du aldatu behar denborarekin. Konposatua osagaietan banatuko balitz, konduktibitate balioen aldaketa gauzatuko luke. Balioa aldatzeak esan nahiko du, beraz, konduktibitatea ez dela konposatu neutro baten balio tartean sartuko, baizik eta hau elektrolito baten balioetan sartuko da. Honek adierazten du konplexua ingurune akuosoan jartzean

disoziatu egin dela eta beraz ligando batzuk konplexutik atera eta disoluzioan aske egongo direla. 2. taulan eta 8. irudian aurkitzen dira, egindako neurketetatik lortutako emaitzak:

2. taula: konduktibitatearen balioak denboran zehar

Denbora (egun)	KONDUKTIBITATEA ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	
	pH 1	pH 7
0	36,18	6,68
7	37,41	6,70
21	38,75	6,74



8. irudia: konduktibitatearen aldaketa denboran zehar.

Urdina-pH 1-eko disoluzioa; Laranja-pH 7-ko disoluzioa

Bertan ikus daitekeen moduan, 21 egun pasa ondoren, konduktibitate balioek ez dute aldaketa nabarmenik izan. Horren ondorioz, ondorioztatzen da, konplexua neutroa eta egonkorra dela ingurune akuosoan eta pH 1 eta pH 7-ko inguruetan, eta giro tenperaturan, gutxienez 21 egunetan zehar.

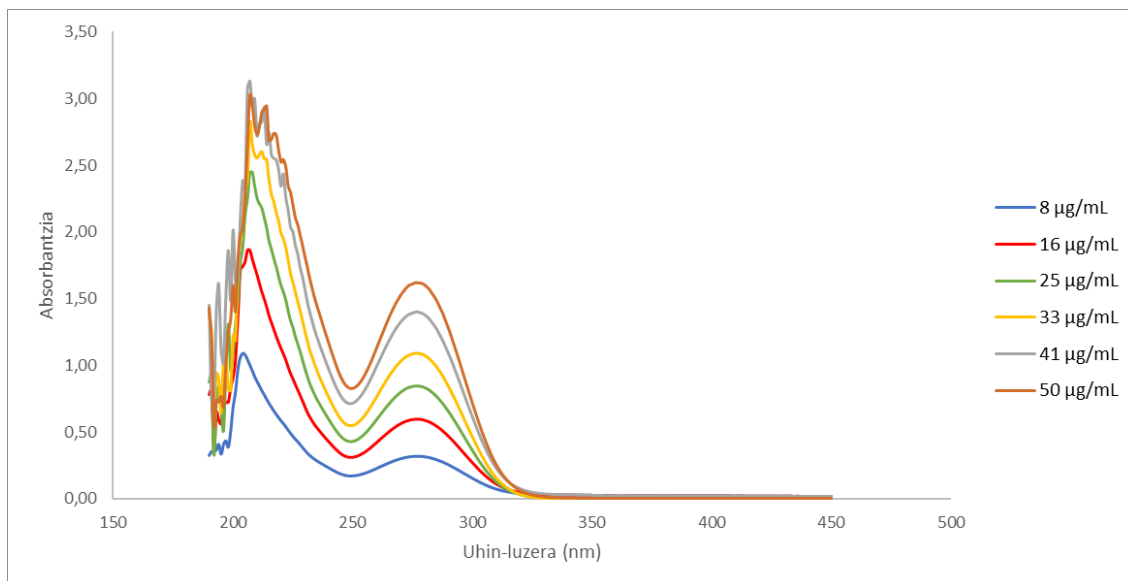
4.3 KALIBRATU ZUZENAK

Bi analito desberdin, Diklofenako askea eta Eu_diklofenako (1) konposatua, pH 1 eta pH 7 ur disoluzioetan disobatu ziren kontzentrazio ezagun desberdinetan kalibrazio zuzena egiteko. Disoluzioa bakoitzaren Umore-ikuskor espektroak 190-450 nm-ko tartean egin ziren, uhin luzera handiagoetan sistemek ez bait

zuten absorbatzen. Kasuan kasu, neurketetarako kontzentrazio tartea ezberdina erabili zen, izan ere, disoluzio bakoitzaren saturazio puntua ez baitzen berdina.

4.3.1 DIKLOFENAKO pH 7

Diklofenako askearen pH 7 zuten sei disoluzio desberdin prestatu ziren (kontzentrazio tartea: 54,50-9,08 $\mu\text{g/mL}$), eta neurketak burutu ostean, ondorengo espektroak lortu ziren:

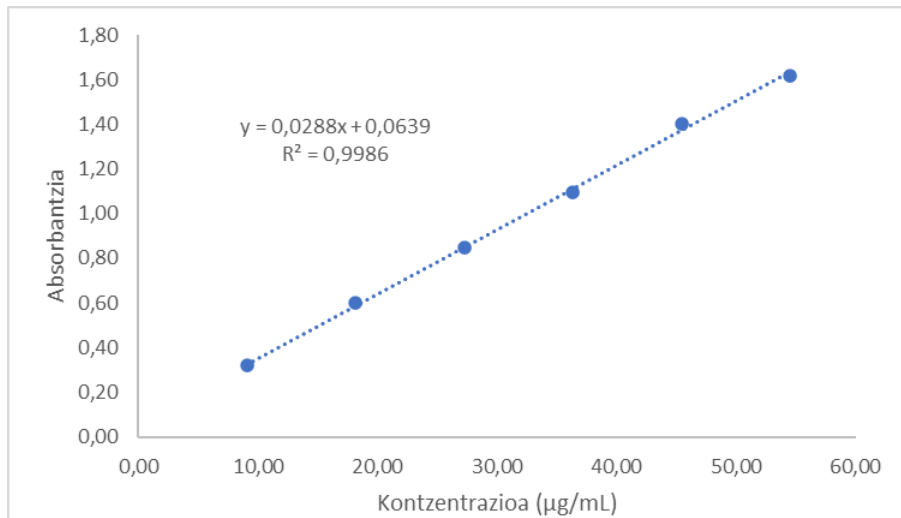


9. irudia: Kontzentrazio desberdinetako Diklofenako askearen absortzio espektroak pH 7-ko ur ingurunean.

9. irudiko espektroko datuak erabiliz, kalibratu ekuazioak lortu dira, absorbantzia kontzentrazioaren aurrean irudikatuz. Horretarako, analisisirako metodo desberdinak erabili dira: SLR eta MLR. Kasu bakoitzean, ekuazio desberdin bat lortu da.

4.3.1.1 Simple Lineal Regression-SLR

9. irudian ikus daitekeen moduan, UMore-ikuskor espektroak absorbantzia maximo bat adierazten du, 277 nm-an hain zuzen ere. Absorbantzia maximo hauek kontzentrazioaren aurrean irudikatuz, 10. irudiko kalibratu zuzena lortu da.



10. irudia: SLR metodoaren bitartez diklofenako pH 7 disoluzioaren kalibratu zuzena

Kalibratu zuzenaren erregresio koefiziente ona da, beraz, lortutako emaitzak fidagarriak direla suposatuko da.

Bi analisirako metodoak konparatu ahal izateko, absorbantzien maximoak ekuazioan sartuz, kalibratu zuzenaren arabeko kontzentrazioak kalkulatu dira. Izan ere, kalibratu zuzenak ondorengo ekuazioaren itxura hartzen baitu:

$$y = 0,0288 x + 0,0639 \quad \rightarrow \quad A = 0,0288 C + 0,0639 \quad R^2 = 0,9989 \quad (6. \text{ ekuazioa})$$

Non, A, absorbantzia c, kontzentrazioa R^2 erregresio koefizientea diren.

Kasu honetan, erregresio koefizientea 0,9989 denez, oso balio ona dela esan daiteke. Beraz, honek esan nahi du, neurketetan lortutako datuak zuzenera oso ongi doitzen direla, hau da, datuen arteko linealtasuna ona izango dela. Honen ondorioz, 6. ekuaziotik lortuko diren kontzentrazio esperimentalak teorikoaren antzekoak izango direla suposatzen da.

Beraz, 6. ekuazio horren bitartez, kontzentrazio esperimentalak kalkulatu da eta lortutako balioak kontzentrazio teorikoarekin alderatu dira. Emaitzak hurrengo taulan ikus daitezke.

3. taula: diklofenako pH 7-rako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, SLR metodoaren balidazioa burutzeko

$C_{\text{teorikoa}}, \mu\text{g/mL}$	$C_{\text{esperimentalak}}, \mu\text{g/mL}$	Errore erlatiboa, %
54,50	53,96	0,99
45,42	46,49	-2,36
36,33	35,76	1,58
27,25	27,17	0,29
18,17	18,56	-2,18
9,08	8,84	2,67

3. taulako emaitzetan ikus daitekeen moduan, lortutako kontzentrazio esperimentalak teorikoaren oso antzekoak dira. Ondorioz, lortutako kalibratu zuzena baliagarria dela ondoriozta daiteke.

4.3.1.2 MLR

MLR-ren bitartezko datuen analisia egiteko, 16 uhin luzera desberdin erabiliko dira eta hauek kontzentrazioaren aurrean irudikatuko dira. Uhin luzera horiek, 240-335 nm-ko tartean daudenak izango dira, hain zuzen ere; 240, 246, 253, 260, 267, 274, 281, 289, 303, 310, 317, 325, 332 eta 335 nm.

Beraz, metodo honen bitartez, aukeratutako uhin luzera bakoitzean, aldagai ezezagun bat, x , egongo da. Ondorengoa da metodo honen bitartez, lortutako kalibratu zuzenaren ekuazioa:

$$A = 121,96 C_{240} - 346,23 C_{246} + 45,61 C_{274} + 169,00 C_{296} - 24,72 C_{332} - 0,27$$

(7. ekuazioa)

Erregresio koefizientea balio ideala da, hau da, 1. Honek esan nahi du, datuak zuzenera idealki doitzen direla, hau da datuen arteko linealtasuna paregabea dela. Ondorioz, 7. ekuazioaren bitartez lortuko diren kontzentrazio esperimentalak oso zehatzak izango dira. Hau datu gutxi daudelako izan daiteke, baina hala ere, metodoa balidatzeko, kontzentrazio esperimentala eta teorikoa alderatuko dira.

Datu hauek erabiliz, eta beharrezkoak diren kalkuluak eginez, kontzentrazio esperimentala kalkulatu da, ondoren kontzentrazio teorikoarekin alderatzeko.

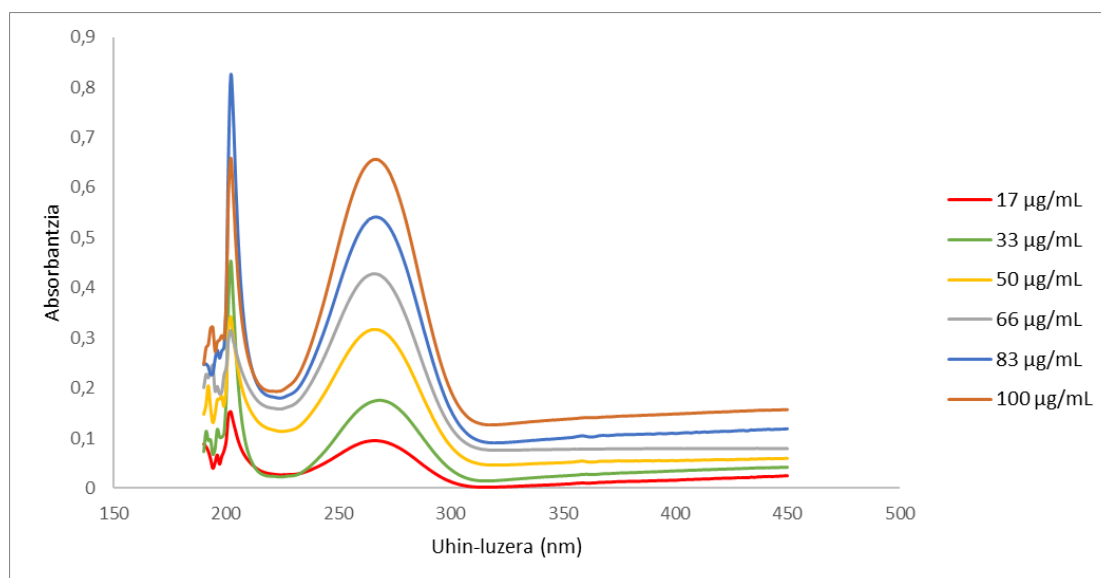
4. taula: diklofenako pH 7-rako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, MLR metodoaren balidazioa burutzeko.

$C_{\text{teorikoa}}, \mu\text{g/mL}$	$C_{\text{esperimentalak}}, \mu\text{g/mL}$	Errore erlatiboa, %
54,50	54,50	0
45,42	45,42	0
36,33	36,33	0
27,25	27,25	0
18,17	18,17	0
9,08	9,08	0

Erregresio koefizientea 1 izatearen ondorioz, kontzentrazio esperimentalak eta teorikoa berdinak dira. Honen ondorioz, 4. taulan ikus daitezkeen moduan, errore erlatiboa 0 da. Beraz, MLR metodoaren bitartez lortutako emaitzak oso onak direla esan daiteke. Hala ere, metodoaren balidazioa, kalibratu zuzena egiteko erabili diren datu berdinekin egin denez, hau da, datu gutxiegi izatearen ondorioz, ez dela metodoaren balidazio egoki bat esan daiteke.

4.3.2 DIKLOFENAKO pH 1

Diklofenako askea zuten sei disoluzio desberdin prestatu ziren pH 1-eko ingurunean (kontzentrazio tartea: 8,42 -101,00 $\mu\text{g/mL}$), eta neurketetatik lortutako espektroak ondorengoak da:



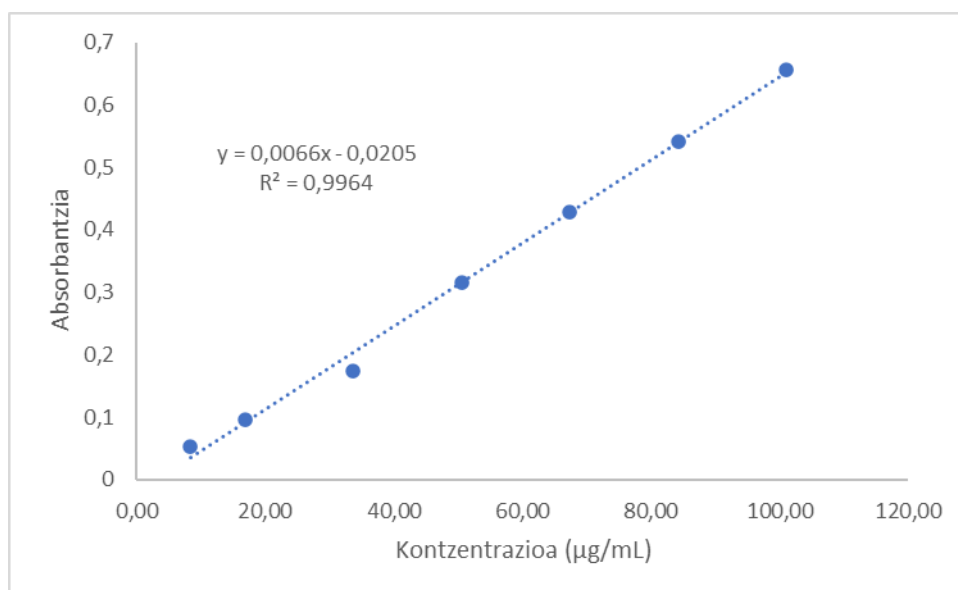
11. irudia: pH 1-ko ingurunean diklofenakoaren absorbtzio espektroa

11. irudian kontzentrazio desberdina duten disoluzioek absorbantziaren maximo bat konpartitzen dutela ikus daiteke, hain zuzen ere, 266 nm-tan. Hala

ere, nahiz eta absorbantzia maximoa uhin luzera berdinean egon, absorbantziaren balioa ez da berdina izango kasu guztietan, kontzentrazioa handiagoa den heinean, absorbantzia ere handiagoa izango baita. Baita ere, erreparatu daiteke, disoluzioen amaierako absorbantzia desberdina dela kasu bakoitzean, eta hauek ez direla 0-ra gerturatzen. Honen arrazoa, baseline desegoki batean aurkitu daitekeen arren, hori ekiditeko harturiko neurriak egokiak izan zirenez eta, era berean, lorturiko kalibrazio zuzenaren kalitatea hain ona izanik (ikus geroago), ez zaio azalpenik aurkitu. Honek, etorkizunean, ikerketa sakonago bat eskatuko luke.

4.3.2.1 SLR

Diklofenako askearen pH 1 disoluzioen kasuan ere, Umore-ikuskor espektroan absorbantzia maximo bat dagoela ikusten da. Kasu honetan, absorbantziaren maximo hori 266 nm-tan egongo da. Beraz, absorbantziaren maximo hori kontzentrazioaren aurrean irudikatuz, kalibratu zuzenak ondorengo itxura izango du:



12. irudia: SLR metodoaren bitartez diklofenako pH 1 disoluzioaren kalibratu zuzena

Beraz, 12. irudian ikus daitekeen moduan, diklofenako pH 1 kasurako kalibratu zuzena ondorengoa da:

$$A = 0,0066 C - 0,0205 \quad R^2 = 0,9989 \quad (8. \text{ Ekuazioa})$$

12. irudian ikus daitekeenez, erregresio koefizientearen balioa, nahiko ona dela esan daiteke, hain zuzen ere, 0,9964. Bi inguruetako erregresio koefizienteak,

pH 7 eta pH 1-ekoak, alderatzen badira, nahiz eta pH 1-eko ingurunean balioa jaitsi, biak antzekoak direla ikusten da. Beraz, kasu honetan ere, esan daiteke, datuak nahiko ongi doitzen direla zuzenera, eta beraz, lortuko diren kontzentrazio esperimentalak nahiko zehatzak izango direla. Hala ere, metodoa balidatzeko kontzentrazio esperimentalak kalkulatu da.

5. taula: diklofenako pH 1-erako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, SLR metodoaren balidazioa burutzeko

$C_{\text{teorikoa}}, \mu\text{g/mL}$	$C_{\text{esperimentalak}}, \mu\text{g/mL}$	Errore erlatiboa, %
101,00	102,52	-1,50
84,17	85,09	-1,10
67,33	67,92	-0,87
50,50	50,98	-0,95
33,67	29,55	12,22
16,83	17,51	-4,04
8,42	11,01	-30,79

5. taulako emaitzak ikusiz, errore erlatiboa 12,22 eta -30,79 den kasuan, errorea oso handia da, eta beraz, kasu horietan ez dira emaitza onak lortu. Beraz, esan daiteke, kasu batzuetan erregresio zuzenaren ekuazioak ez dituela kontzentrazio zehatzak emango. Honek, aurrerago egingo diren kalkuluetan arazoak sor ditzake.

4.3.2.2 MLR

MLR metodoaren bidez lortutako zuzenaren ekuazioa ondorengoa izango da.

$$A = -530,18 C_{240} + 474,25 C_{253} - 104,53 C_{267} + 296,85 C_{289} + 1685,75 C_{317} - 1839,30 C_{335} + 6,89$$

(9. ekuazioa)

Kasu honetan ere, erregresio koefiziente balio ideala ($R^2=1$) da, hau da, datuen arteko linealtasuna erabatekoa da. Honen ondorioz, lortuko diren kontzentrazio esperimentalak oso zehatzak izango dira. Hau, aurreko kasuaren moduan, datu gutxiegiz izatearen ondorio da. Lortutako kontzentrazio esperimentalak jarraian adierazitakoak dira:

6. taula: diklofenako pH 1-erako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, MLR metodoaren balidazioa burutzeko

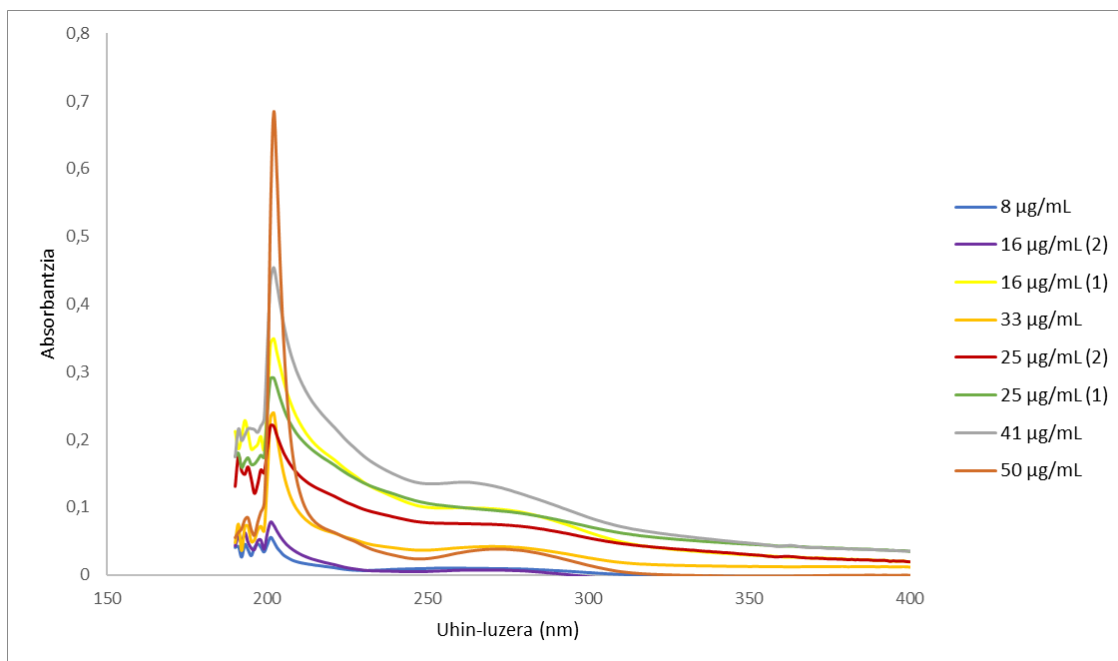
$C_{\text{teorikoa}}, \mu\text{g/mL}$	$C_{\text{esperimentalak}}, \mu\text{g/mL}$	Errore erlatiboa, %
101,00	101,00	0
84,17	84,17	0
67,33	67,33	0
50,50	50,50	0
33,67	33,67	0
16,83	16,83	0
8,42	8,42	0

6. taulan ikus daitekeen moduan, MLR-ren bitartez lortutako kontzentrazio esperimental eta teorikoaren balioak berdina dira, eta beraz errorea 0 da. Nahiz eta hori egoera ideala izan, esan daiteke, hori gertatzearen arrazoia datu gutxi izatea dela, eta balidazioa egiteko kalibratu zuzena egiteko erabilitako berberak erabiltzea dela.

4.3.2.3 Tenperaturaren eragina

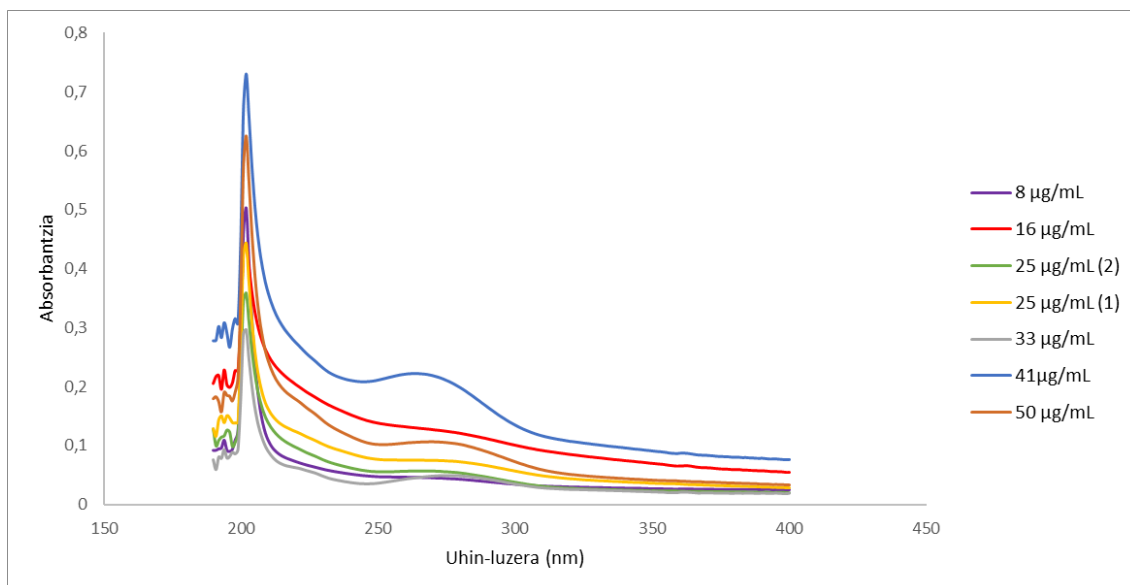
Diklofenako pH 1 disoluzioaren neurketak egitean, tenperaturak absorbantzia baloreetan eragin handia zuela ohartu zen.

Hasierako neurketak, tenperatura kontrolatu gabe egin ziren. Espektrofotometroa 37 °C-ra programatu zen, baina disoluzioak honetatik kanpo zeudenean, tenperatura ez zen 37 °C, baizik eta hauek giro tenperaturan zeuden. Neurketak egin zirenean, ondorengo espektroa lortu zen:



13. irudia: giro temperaturan lortzen den diklofenako pH 1 disoluzioaren absortzio espektroa. (1) eta (2)-k erreplika desberdinei egiten die erreferentzia

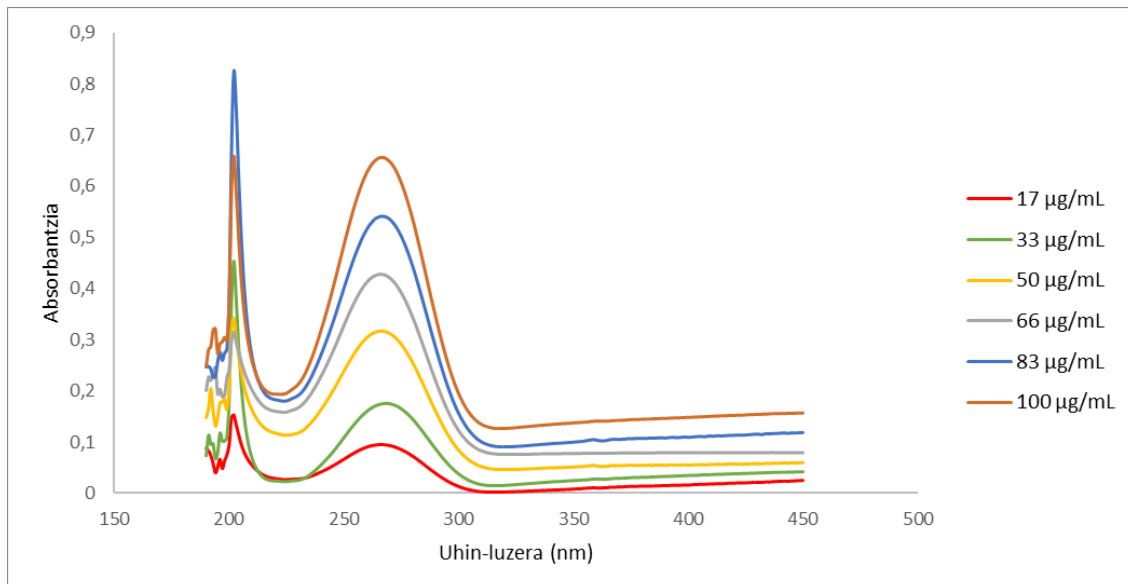
13. irudia erreparatuz, ikusi zen, maximoak ez zirela batere nabarmenak, eta beraz, tenperatura kontrolatzeko hautua hartu zen. Horretarako, 37 °C-tan zegoen ur bainu batean sartu ziren disoluzioak. Hala ere, ur bainu honen tenperatura ez zen konstante mantentzen denboran zehar. Neurketak egin ziren, emaitzak hauek izanik(14. Irudia):



14. irudia: 37 °C-tan baino konstante mantendu gabe lortzen den diklofenako pH 1 disoluzioaren absortzio espektroa

Kasu honetan, absorbantziaren maximoak nabarmenago ageri ziren, baina, hala ere, ez zen nahikoa bertatik balio batzuk ateratzeko. Beraz, tenperatura 37

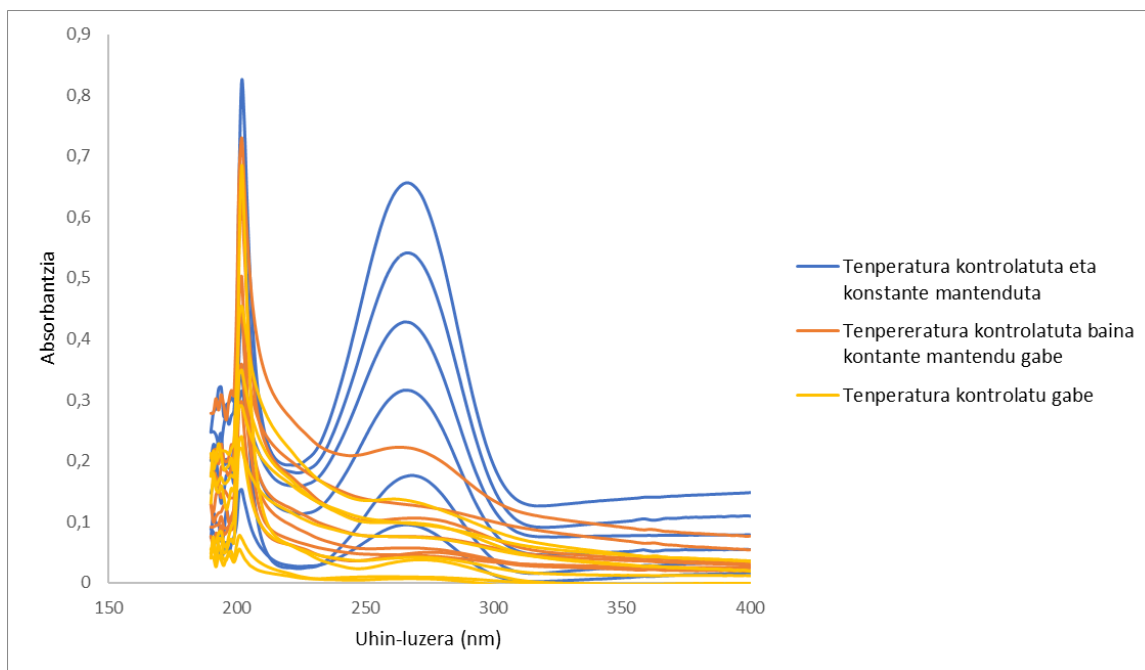
°C-tan konstante mantentzeko, ur bainu bat jarri zen plaka berogailu baten gainean, eta disoluzioak ur bainu horretan sartu ziren. Modu honetan temperatura konstante mantentzen zen 37 °C-tan eta lortutako espektroetan honen eragina garbi ikus daiteke 15. irudian:



15. irudia: 37 °C-tan lortzen den diklofenako pH 1 disoluzioaren absortzio espektroa

Temperatura kontrolatzeko modu hau erabiliz, absorbantziaren maximoak garbi ikustea lortu zen. Ondorioz, bertatik datu zehatzagoak ateratzea lortu zen.

Laburbilduz, temperaturaren eragina 16. irudiaren bitartez azaldu daiteke:

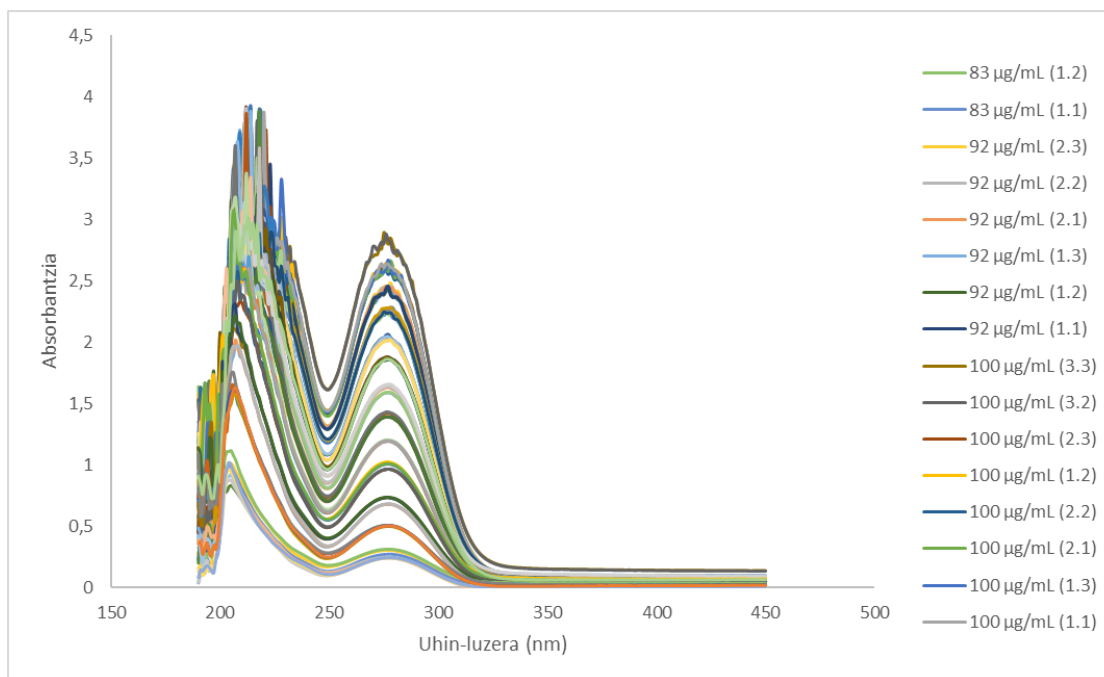


16. irudia: tenperaturaren kontrol ezberdinak eginda lortzen diren diklofenako pH 1 disoluzioaren absortzio espektroa. Horia-tenperatura kontrolatu gabeko neurketak; Laranja-tenperatura kontrolatuta baina konstante mantendu gabe egindako neurketak; Urdina-tenperatura kontrolatuta eta konstante mantenduta egindako neurketak.

Non, lerro horiak tenperatura kontrolatu gabeko neurketak adierazten dituzten, laranja-tenperatura kontrolatuta baina konstante mantendu gabe eta azkenik, urdinek, tenperatura kontrolatuta eta konstante mantenduta.

4.3.3 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 7

Eu_diklofenako (1) konposatuaren pH 7 zuten sei disoluzio desberdin prestatu ziren (kontzentrazio tartea: 9,15-109,80 $\mu\text{g/mL}$), lortutako espektroak hurrengoak izanik (17. irudia):



17. irudia: pH 7-ko ingurunean Eu_diklofenako (1) konposatuaren absortzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

Kasu honetan, datua asko daudenez, hauetako batzuk ez dira erabili kalibratu zuzenaren ekuazioa lortzeko. Beraz, kalibratu zuzena egiteko erabili ez diren datuak metodoa balidatzeko erabili dira. Banatu diren datu hauekin, kontzentrazio esperimentala kalkulatu da, kalibratu ekuazioa erabiliz, eta hauek kontzentrazio teorikoarekin alderatu dira, bien arteko errore erlatiboa zein den jakiteko eta horrela, metodoa egokia den edo ez zehazteko.

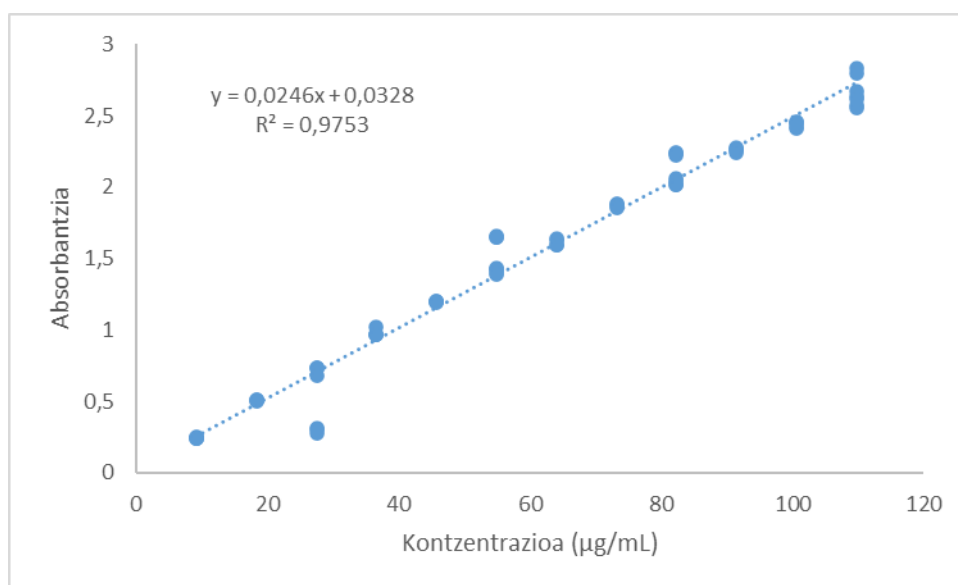
4.3.3.1 SLR

Europio-diklofenako (1) pH 7-aren disoluzioaren diluzio ezberdinak UV espektroskopiaren bidez neurtu ziren. 17. irudian ikus daiteke, kontzentrazio desberdin guztiek uhin luzera berdinean (277 nm) absorbantziaren maximoa erakusten dutela. Beraz, SLR metodoaren bidez kalibratu zuzena lortzeko, kontzentrazio bakoitzak uhin luzera horretan duen absorbantzia, kontzentrazioaren aurrean irudikatuko da.

Kasu honetan, diklofenako askearen kasuan ez bezala, erreplika eta neurketa gehiago egin ziren. Diluzio bakoitza bi edo hiru aldiz prestatu zen eta hauetariko erreplika bakoitza 3 aldiz neurtu zen. Horrela, MLR analisi metodorako datu gehiago eduki ziren, aurreko kasuetan erregresioa 1 izatearen arrazoia datu gutxi izatea zelako, eta beraz, metodo horren bitartez, disoluzioaren kontzentrazioa eta absorbantziaren erlazio erreal bat izateko,

datu gehiago edukitzea komeni baitzen. Bestetik, baita ere, erreplika eta neurketa gehiago egin ziren, arestian aipatu den moduan, datu batzuk banatu eta kalibratu zuzena egiteko erabili beharrean, metodoaren balidazioan erabiltzeko.

Hori dela eta, horregatik ikusten dira 18. irudian, kontzentrazio berdinean hainbat puntu ezberdin. Kontzentrazio berdinean agertzen diren puntu multzo bakoitza erreplika bat izango da, eta puntu multzo horretan dauden puntu bakoitza, aldiz, momentuan egindako neurketa ezberdinak.



18. irudia: SLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) konposatuaren pH 7 disoluzioaren kalibratu zuzena

$$A = 0,0246 C + 0,0328 \quad R^2 = 0,9753 \quad (10. \text{ Ekuazioa})$$

Erregresio koefizientea, egindako neurketa eta erreplika kopuru altua kontuan hartuta ona da, beraz, zuzenaren ekuazio honen bitartez, nahiko datu zehatzak lortuko dira. Bestalde, 18. irudian ikus daitekeen moduan, 27,45, 54,90, 82,35 eta 109,80 µg/mL-ko kontzentrazioetako diluzioekin egindako erreplika batek, gainontzeko erreplikien absorbantzia maximoaren balio desberdina eman dute. Beraz, kalibratu zuzenaren bitartez lortuko diren kontzentrazio esperimentalaren zehaztasuna jakiteko eta metodoa egokia den edo ez jakiteko, banatutako datuekin metodoaren balidazioa burutuko da, kontzentrazio teorikoa eta esperimentala alderatuz eta errore erlatiboa kalkulatu.

7. taula: Eu_diklofenako (1) pH 7-rako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, SLR metodoaren balidazioa burutzeko

C _{teorikoa} , µg/mL	C _{esperimental} , µg/mL	Errore Erlatiboa, %
109,80	106,04	3,81
100,65	98,65	2,17
100,65	98,65	2,38
91,50	91,06	0,88
91,50	90,57	1,41
82,35	80,47	2,28
82,35	81,80	0,67
73,30	74,65	-1,44
73,30	75,14	-2,24
64,05	63,55	1,17
64,05	65,25	-1,52
54,90	55,40	-0,52
45,75	47,46	-3,32
45,75	47,79	-4,06
36,60	39,78	-8,27
36,60	39,94	-8,69
27,45	9,81	64,39
27,45	26,47	3,95
18,30	19,31	-5,15
18,30	19,24	-4,75
9,15	8,20	6,49

7. taula erreparatuz, SLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) pH 7 kasurako lortuko diren emaitzak oso onak direla ikus daiteke, errore erlatibo gehienak %7 baino baxuagoak baitira. Hala ere, bada errore erlatibo oso handi bat %64,39-koa hain zuzen ere. Hau, gainontzeko errore erlatiboak ikusiz, esan daiteke, errore puntual bat dela. Honen arrazoia, erregresio koefiziente onean dago, izan ere, aurretik aipatu den moduan, nahiz eta balioa hobetu daitekeen, kontuan hartuta egin diren erreplika eta neurketa kopuru handia, balio ona dela kontsidera daiteke. Gainera, errore handiaren, 64,39, kontzentrazioa aztertzen bada, ikus daiteke, zehazki goian aipatutako errepliken absorbantzia kaxkarraren kontzentrazio horietako baten datuak direla, hau da, beste errepliken absorbantziarekiko desbideratze handi bat erakusten zuten kontzentrazioko emaitzarena hain zuzen ere.

4.3.3.2 MLR

MLR metodoaren bitartez kalibratu zuzena lortzeko, 16 uhin luzera desberdinetan lortutako absorbantzia kontzentrazioaren aurrean irudikatu da. Kasu honetan ere, diluzio bakoitzetik erreplika desberdinak egin direnez, eta erreplika bakoitza hiru aldiz neurtu denez, datu asko lortu dira. Beraz, datu hauek bi multzotan banatu dira, bata kalibratu zuzena egiteko erabiliz eta bestea metodoaren balidazioa egiteko.

MLR metodoaren bitartez lorturako zuzenaren ekuazioa ondorengoa da:

$$\begin{aligned} A = & 243,03 C_{240} - 359,89 C_{246} - 906,13 C_{253} + 590,70 C_{260} + 9,01 C_{267} + 84,09 C_{274} \\ & - 87,98 C_{281} + 56,26 C_{285} - 140,30 C_{289} - 775,76 C_{296} + 3798,27 C_{303} \\ & - 5598,12 C_{310} - 2417,78 C_{317} + 6280,94 C_{325} - 2237,63 C_{332} \\ & - 3390,04 C_{335} + 3,24 \end{aligned}$$

(11. ekuazioa)

MLR metodoarekin ($R^2=0,9867$) eta SLR metodoarekin ($R^2=0,9753$) lortutako erregresio koefizienteak konparatzen badira, ikus daiteke, MLR metodoaren bitartez, erregresio koefizientea hobetzea lortu dela. Honen ondorioz, SLR metodoarekin lortutako erregresio koefizientea ontzat hartu bada, hau oraindik eta hobea izango da, eta beraz, kalibratu zuzen honen bitartez, emaitza onak lortzeko aukera egongo da.

Lehen aipatu den moduan, datu batzuk banatu egin dira metodoaren balidazioa egin ahal izateko. Hori dela eta, datu hauek erabiliz, kontzentrazio esperimentala zein den kalkulatu da kalibratu ekuazioa erabiliz, eta ondoren hauek kontzentrazio teorikoarekin alderatuz, errore erlatiboa kalkulatu da metodoa erabilgarria den edo ez jakiteko.

8. taula: Eu_diklofenako (1) pH 7-rako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, MLR metodoaren balidazioa burutzeko

C _{teorikoa} , µg/mL	C _{esperimental} , µg/mL	Errore Erlatiboa (%)
109,80	111,87	2,07
100,65	100,01	-0,64
100,65	100,67	0,02
91,50	95,17	3,67
91,50	93,34	1,84
82,35	81,15	-1,20
82,35	71,33	-5,03
73,30	71,33	-1,87
73,30	73,01	-0,19
64,05	63,15	-0,90
64,05	63,71	-0,34
54,90	56,21	1,31
45,75	47,39	1,34
45,75	46,26	0,51
36,60	37,89	1,29
36,60	38,26	1,66
27,45	13,68	-13,77
27,45	27,47	0,02
18,30	20,80	2,50
18,30	20,92	2,62
9,15	13,66	4,51

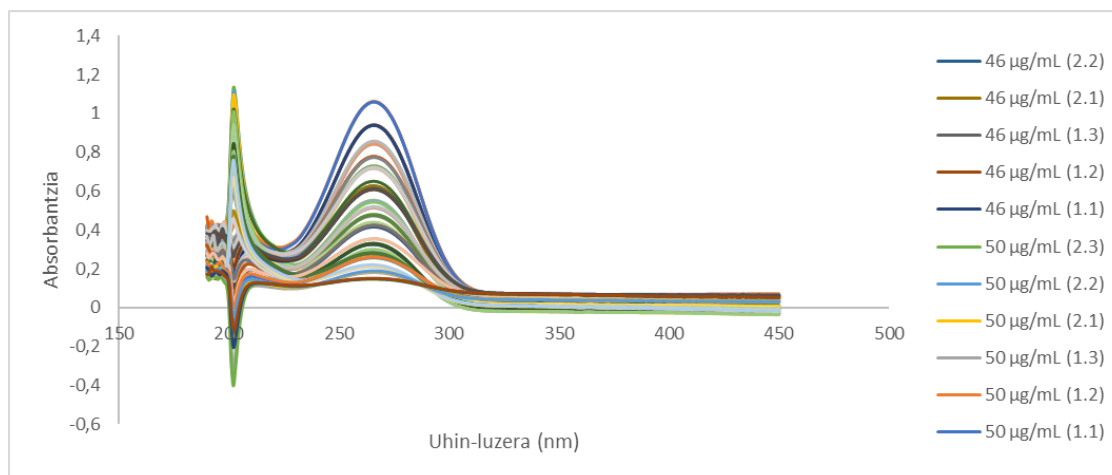
Erregresio koefizientea handiagotu egin denez, honek eragina izango du errore erlatiboetan. 8. taulan ikus daitekeen moduan, errore erlatiboak oso onak dira, izan ere, ia denak %5 baina baxuagoak baitira. Hala ere, bada errore erlatibo bat nahiko handia dena, -13,77-koa hain zuzen ere. Hau, errore puntual bat izan daiteke, izan ere, beste errore erlatiboak askoz baxuagoak baitira. Beraz, %13,77-ko errorea izateak ez du garrantzi handirik izango.

SLR metodoarekin lortutako errore erlatiboak erreparatuz (7. taula), MLR metodoarekin orokorrean errore txikiagoak lortu direla esan daiteke, Adibide moduan, metodo bakoitzeko errore handienak konparatuz, SLR-ren kasuan 64,39 dela ikusi da eta MLR-ren kasuan aldiz, -13,77. Beraz, metodo honen bitartez, kalibratu zuzenarekin lortuko diren emaitzak zehatzagoak direla esan

daiteke. Hala ere, orokorrean, Eu_diklofenako (1) pH 7 kasurako oso datu onak lortu dira.

4.3.4 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 1

pH 1-eko ingurunean Eu_diklofenako (1) konposatuaren hainbat diluzio desberdin prestatu ziren (4,32-51,80 µg/mL-ko kontzentrazio tartean) lortutako espektroak ondorengoak izanik (19. irudia):

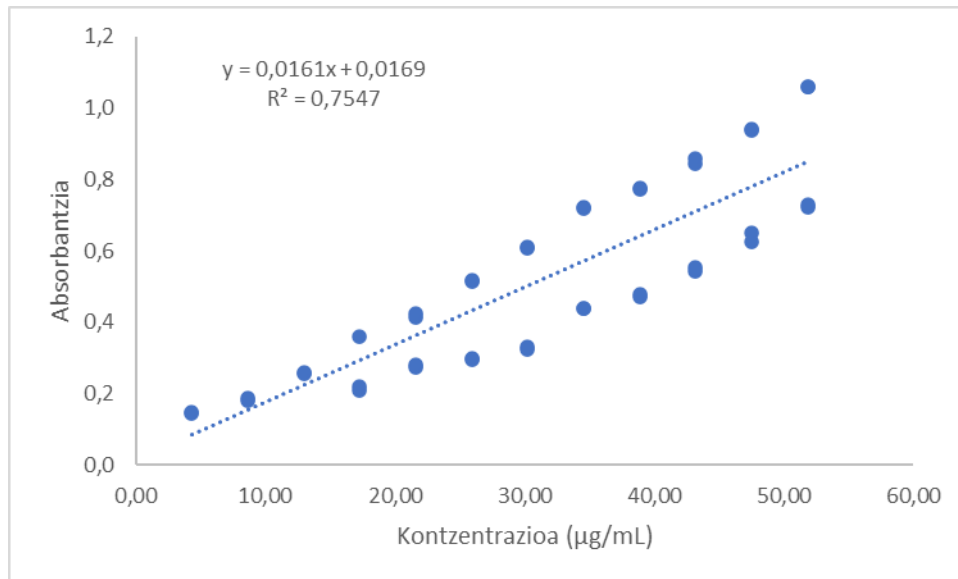


19. irudia: pH 1-eko ingurunean Eu_diklofenako (1) konposatuaren absortzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

Eu_diklofenako (1) pH 7 kasuaren moduan, hemen ere datu batzuk banatu egin dira metodoaren balidazioa egin ahal izateko. Kasu honetan ere, diluzio bakoitzerako bat edo bi erreplika egin dira, eta erreplika bakoitza hiru aldiz neurtu da. Beraz, metodoaren balidazio egiteko, erreplika bakoitzaren neurketa bat erabili da eta gainerakoak kalibratu zuzena egiteko erabili dira.

4.3.4.1 SLR

Eu_diklofenako pH 1 disoluzioaren diluzio desberdinak neurtu ziren UV espektroskopia erabiliz, eta bertatik lortutako absorbantziak kontzentrazioaren aurrean irudikatuz, 20. irudiko kalibratu zuzena lortu da.



20. irudia: SLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) konposatuaren pH 1 disoluzioaren kalibratu zuzena

$$A = 0,0161 C + 0,0169 \quad R^2 = 0,7547 \quad (12. \text{ Ekuazioa})$$

Lortutako kalibratu zuzenaren erregresio koefizientea, $R^2=0,7547$, ez da batere ona. Hau lortzeko erabilitako puntu bat bera ere ez dago zuzenaren gainean, eta kontzentrazio bereko erreplikaren absorbantziak, beraien artean oso desberdinak dira. Erregresio koefizientearen balioa hain baxua izanda, lortutako emaitzak ez dira zehaztasun handikoak izango. Hori frogatzeko, kalibratu zuzena egiteko erabili ez diren puntuak erabiliz, metodoaren balidazioa egingo da.

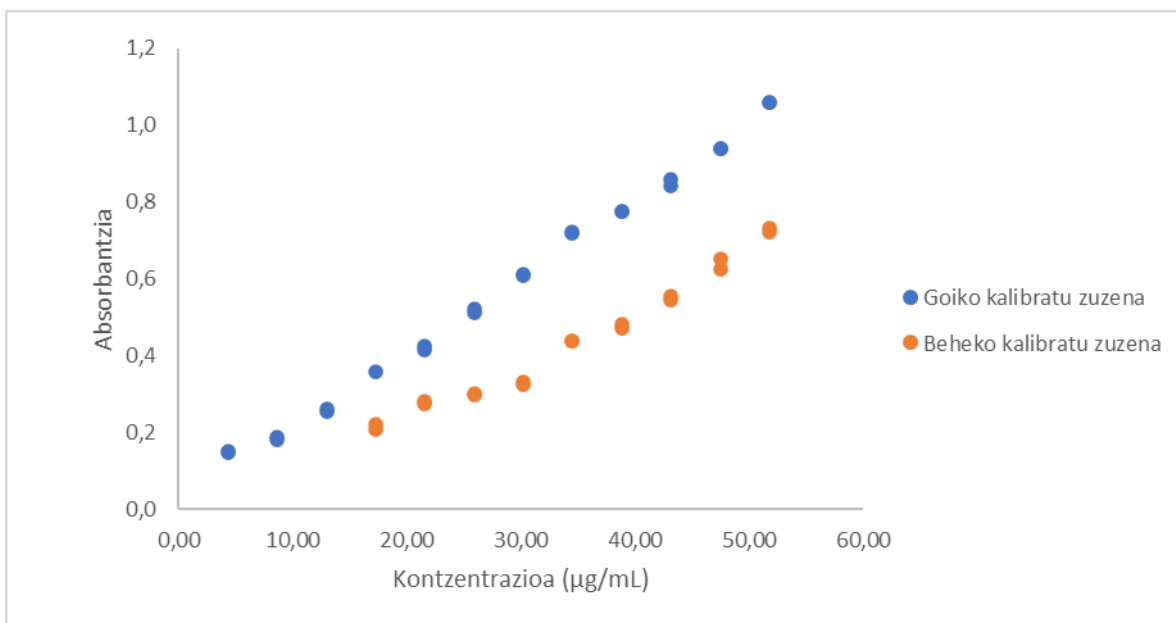
9. taula: Eu_diklofenako (1) pH 1-erako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, SLR metodoaren balidazioa burutzeko

C _{teorikoa} , µg/mL	C _{esperimental} , µg/mL	Errore Erlatiboa, %
51,80	55,49	-7,12
51,80	34,56	33,28
47,48	47,97	-1,02
47,48	28,42	40,15
43,17	41,93	2,86
43,17	23,76	44,97
38,85	37,89	2,46
38,85	19,07	50,92
34,54	34,05	1,41
34,53	16,64	51,82
30,22	27,36	9,44
30,22	9,77	67,68
25,90	21,51	16,95
25,90	7,89	69,55
21,58	15,84	26,59
21,58	6,92	67,95
17,27	11,50	33,39
17,27	2,88	83,35
12,95	5,51	57,45
8,63	1,09	87,43
4,32	-1,27	129,39

9. taulan kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko errore erlatiboa kasu ia guztietan oso altua dela ikusten da. Ia errore gehienak %10 baino altuagoak dira, altuena %129,39 ko errorea izanik. Honekin, ondorioztatzen da, erregresio koefizientea ikustean suposatu den moduan, kalibratu zuzen honekin lortuko diren emaitzak ez dira batere onak izango, eta beraz, honen eragina aurrerago egingo diren kalkuluetan nabaritu da.

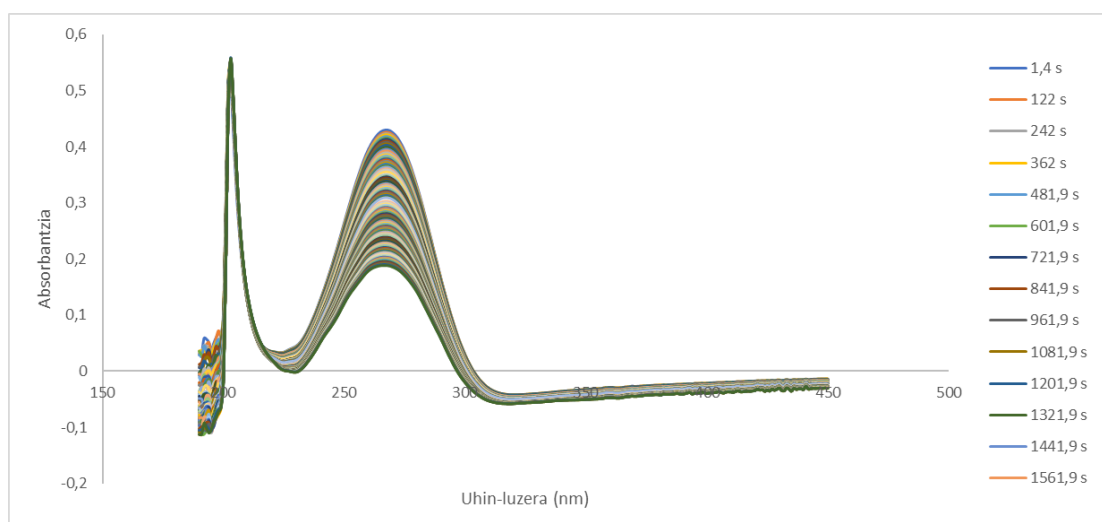
4.3.4.1.1 Denboraren eragina

Kalibratu zuzenean (21. irudia) bi zuzen ezberdindu daitezke; bat goikoa eta bestea, behekoa.



21. irudia: diklofenako pH 1 kasurako lortutako kalibratu zuzena bi zuzen ezberdinetan banatuta

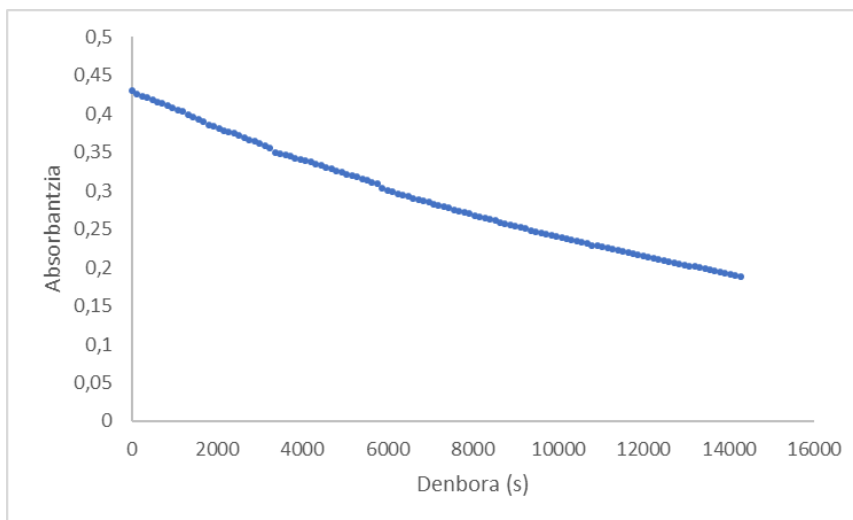
Arestian aipatu den moduan, kontzentrazio bereko patroien artean desberdintasun nabaria dago. Ahala ere, ikusten da desberdintasun hori antzekoa dela kasu guztietan eta hori da bi zuzen ikustearen arrazoia. Beheko zuzeneko datuak goikoak baino beranduago neurtuak izan zirenez, suposatu zen denborak eragina izango zuela pH1-ko disoluzioetan. Hori frogatzeko 4 h-ko zinetika bat egin zen 58, µg/mL den Eu_diklofenako (1) pH 1 disoluzio batekin, absorbantzia denboraren aurrean nola aldatzen zen ikusteko.



22. irudia: Eu_diklofenako (1) konposatuaren pH 1-eko disoluzioaren zinetika

22. irudian ikusten den moduan, argi dago absorbantziak denboran zehar jaitziera nabarmen bat duela, horren erakusle izanik irudian agertzen diren

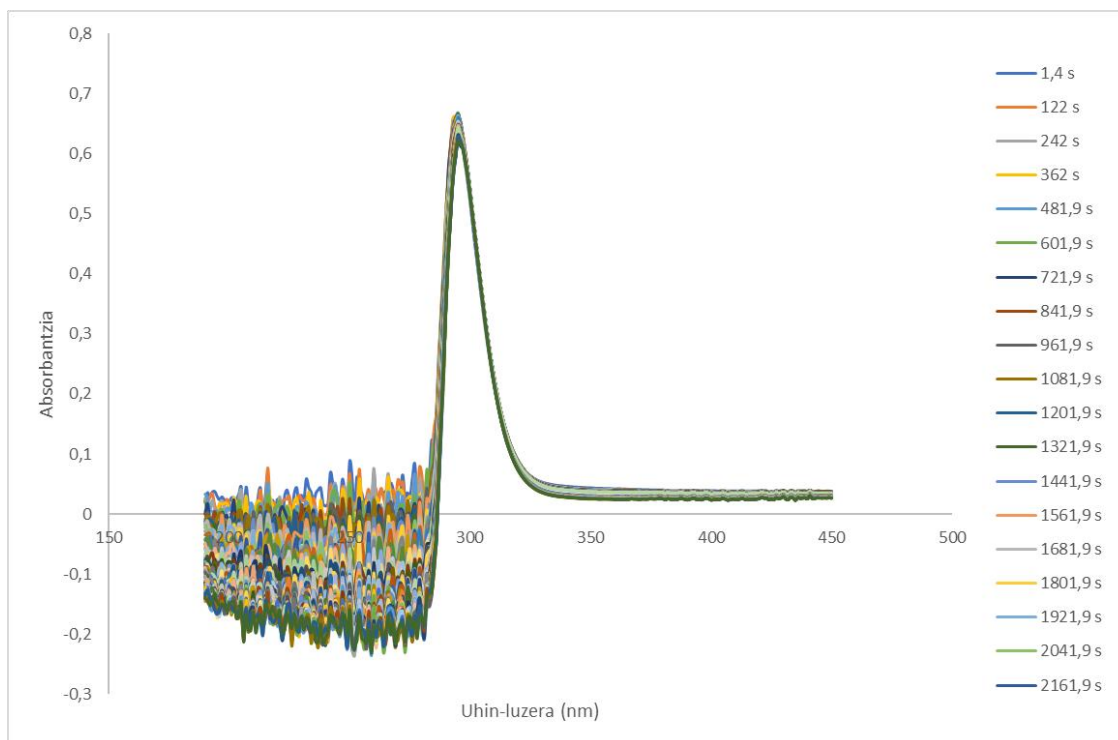
lerroak (espektoak) geroz eta absorbantzia baxuagoan agertzea. Beraz, argi dago, absorbantziaren maximoa denboraren aurrean murriztu egiten dela, baina jaitsiera hau hobeto ikusteko, absorbantziaren maximoa denboraren aurrean irudikatuko da.



23. irudia: Eu_diklofenako (1) pH 1 disoluzioaren absorbantziaren aldaketa denboran zehar

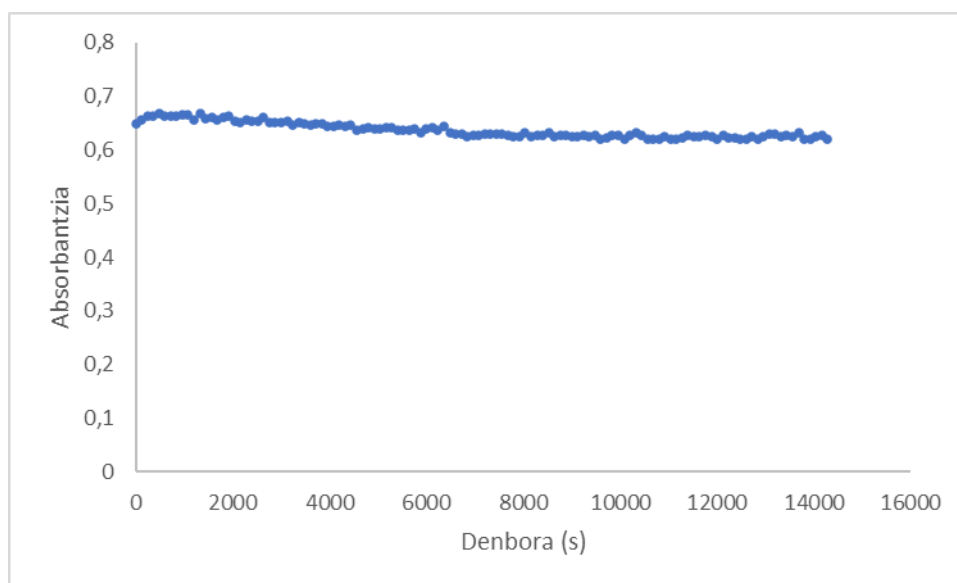
22. eta 23. irudiek erakusten duten moduan, argi dago denborak eragina duela pH 1-eko ingurunean dagoen Eu_diklofenako (1) konplexuaren disoluzioaren absorbantzian. Izan ere, ikus daitekeen moduan, hasieran, disoluzioaren absorbantzia 0,42 ingurukoa da eta 4 h igaro ondoren, absorbantzia hori 0,20 arte jaisten baita, hau da, absorbantziaren jaitsiera %50 izan da 4 ordutan. Ondorioz, honek kalibratu zuzenean eragin handia izango du, ikusi dugun moduan, denborarekin absorbantzia jaistearen ondorioz, kontzentrazio bereko patroien absorbantzia oso desberdina izango baita, horrek eragin zuena edukiz zuzenaren ekuazioan eta erregresio koefizientean.

Hala ere, denboraren eragina soilik pH1-aren kasuan gertatzen zen edo ez jakiteko, 63,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ den pH 7-ko Eu_diklofenako (1) disoluzioari ere 4 h-ko zinetika bat egin zitzaien, lortutako emaitzak ondorengoak izanik:



24. irudia: Eu_diklofenako (1) pH 7-ko disoluzioaren zinetika

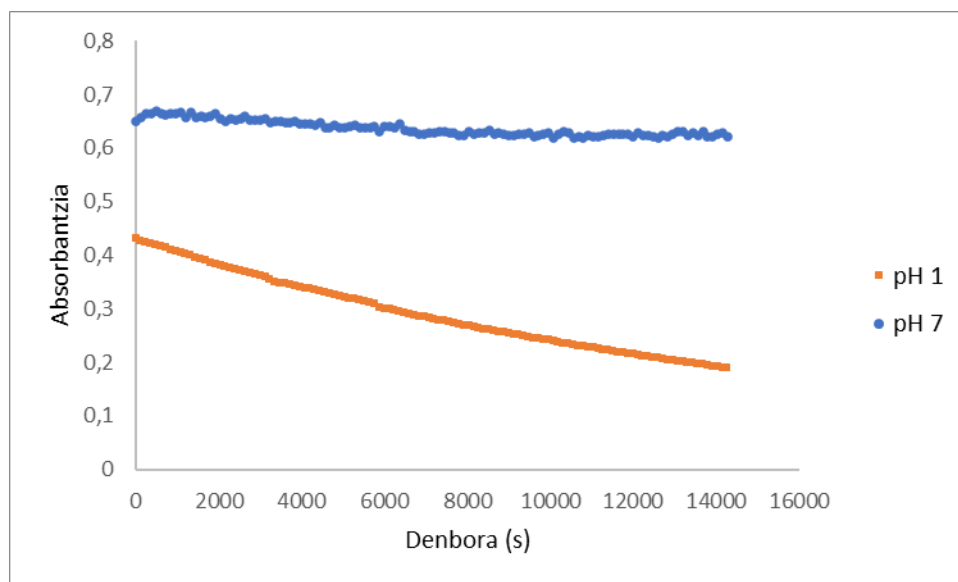
Kasu honetan, Eu_diklofenako (1) pH 1 kasuan ez bezala, 4 ordutan zehar egindako neurketa guztiek ia balio bera ematen dutela ikusten da (24. Irudia), lerroak ia guztiz gainezarriak egoteak adierazten duen moduan. Hala ere, lehen egin den bezala, absorbantziaren maximoa denboraren aurrean irudikatuko da denborak absorbantzia duen eragina hobeto ikusteko.



25. irudia: Eu_diklofenako (1) pH 7 disoluzioaren absorbantziaren aldaketa denboran zehar

25. irudian ikusten den moduan, absorbantzia ia lerro horizontal bat osatzen dute, denborak absorbantzia ia eraginik ez duenaren seinale izanik.

Laburbilduz, pH 1 eta pH 7-ko disoluzioen arteko konparaketa egingo da. Hurrengo irudian (26. irudia) ikus daiteke, bi inguruetan absorbantziak eduki duen aldaketa denborarekin.

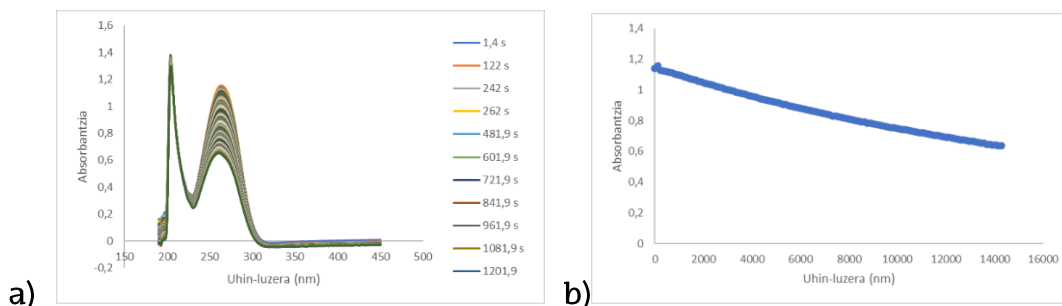


26. irudia: pH 1 eta pH 7-ko Eu_diklofenako (1) disoluzioen absorbantziak denboran zehar duten aldaketa

26. irudia erreparatuz, argi ikusten da denborak ez duela eraginik pH 7-ko Eu_diklofenako (1) disoluzioan, izan ere, denborarekin absorbantziak ez baitu aldaketa nabarmenik jasaten. Honen ondorio da, pH 7-ko patroiak osatutako kalibratu zuzenaren erregresioa hobea izatea pH 1-eko baino.

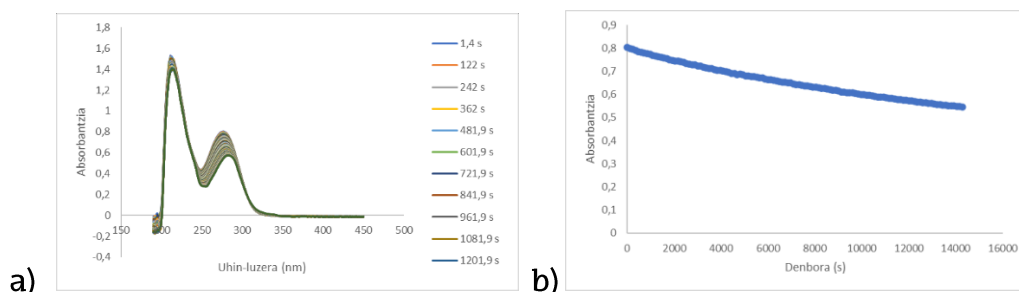
Azkenik, diklofenako soilik duen disoluzioei ere, pH 1-eko eta pH 7-ko ingurunean, zinetika bat egin zitzaien, ikusteko denboraren eragina soilik konplexua sortzean ematen zen edo ingurunearen arazoa zen.

pH 1-eko ingurunean dagoen 48 µg/mL-ko diklofenako disoluziorako ondorengoak dira lortu ziren emaitzak 4 orduko zinetika bat egin ostean (27. irudia):



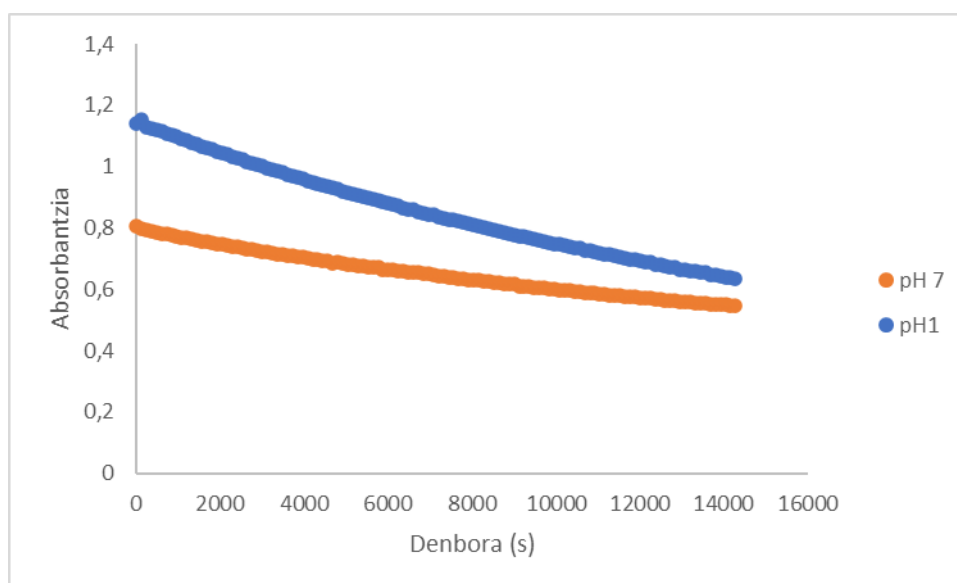
27. irudia: a) diklofenako pH 1-eko disoluzioaren zinetika b) diklofenako pH 1 disoluzioaren absorbantziaren aldaketa denboran zehar

Aldiz, 56 $\mu\text{g/mL}$ den pH 7-ko diklofenako disoluzioaren kasurako 4 orduko zinetika bat egin ostean, 28. irudian ikus daiteke absorbantziak duen aldaketa, eta honen maximoak denboraren aurrean duen aldaketa:



28. irudia: diklofenako pH 7-eko disoluzioaren zinetika. b) diklofenako pH 7 disoluzioaren absorbantziaren aldaketa denboran zehar

Beraz, bi inguruneen arteko konparaketa egiteko 29. irudia erabiliko da, honek absorbantziaren balioak adierazten dituelarik denboraren aurrean:



29. irudia: pH 1 eta pH 7-ko diklofenako disoluzioen absorbantziak denboran zehar duten aldaketa

29. irudia aztertuz, ikus daiteke, diklofenako disoluzioen kasuan, nahiz eta pH 1-ean absorbantziaren jaitsiera handiagoa izan pH 7-an ere, jaitsiera txiki bat ere ematen dela. pH 1-aren kasuan, ikus daiteke hasierako absorbantzia 1,15 ingurukoa dela, eta 4 ordu igaro ondoren, hau 0,60-ra murriztu dela. Jaitsiera hau oso nabarmena da, izan ere, absorbantzia ia %50-ra murriztu baita 4 ordutan. Aldiz, pH 7-ko ingurunearen kasuan, absorbantzia maximoa 0,80-ko zen hasieran, ta lau ordu igaro ondoren, absorbantzia maximoa 0,60-ra murriztu da, hau da, %25-eko jaitsiera izan du absorbantziak. Honen ondorioz, ondoriozta daiteke, inguruneak garrantzia duela denboraren eraginean, izan ere, bi kasuetan, diklofenako askean eta Eu_diklofenako (1)an, absorbantziaren jaitsiera denboraren aurrean oso nabarmena izan baita pH 1-ean. Hala ere, pH 7-ko ingurunearen kasuan, ikusi da, konplexuaren sorrerak, denborak absorbantzian duen eragina murriztu duela.

4.3.4.2 MLR

MLR metodoaren bitartez, lehenago aipatu den moduan, 16 uhin-luzera desberdinetako absorbantzia erlazionatzen da kontzentrazioarekin. Beraz, lortutako datuetatik 16 uhin luzera aukeratu dira eta hauek diluzioen kontzentrazioekin alderatuz, kalibratu zuzen bat lortu da. Aurreko kasuan bezala, erreplika zein neurketa ezberdinak egin direnez, metodoaren balidaziorako datu batzuk banatu dira. Banatutako datu hauek beraz, ez dira erabili kalibratu zuzena egiteko, eta diluzio bakoitzeko erreplika bakoitzetik egin diren hiru neurketetatik bat erabili da balidaziorako. Hain zuzen ere, MLR metodoaren bitartez lortutako emaitzak 13. ekuazioan adierazten dira:

$$\begin{aligned}
 A = & 68,31 C_{240} - 35,82 C_{246} + 2353,44 C_{253} - 4498,47 C_{260} + 1805,61 C_{267} \\
 & + 1726,04 C_{274} + 1223,99 C_{281} - 428,79 C_{285} + 417,26 C_{289} \\
 & + 1904,75 C_{296} + 2004,11 C_{303} - 3444,21 C_{310} - 3150,66 C_{317} \\
 & + 3723,01 C_{325} - 4116,88 C_{332} + 4324,70 C_{335} - 2,31
 \end{aligned}$$

(13. ekuazioa)

Metodo honen bitartez, erregresio koefizientea asko hobetzea lortu da, lortutako balioa 0,9968 izanik. SLR metodoan lortutako koefizientearekin ($R^2=0,7547$) alderatuz, ikus daiteke hau asko igo dela, eta ondorioz, MLR metodoarekin lortuko diren emaitzak nahiko zehatzak eta baliagarriak izango direla. SLR-ren kasuan, R^2 hain txikia da absorbantziaren maximoa soilik

hartzen delako kalibratu zuzena egiteko, eta beraz, aurreko atalean ikusi dugun moduan, denborak absorbantzia eragina duenez, honek eragin handia izan duelako neurketetan. Aldiz, MLR-rekin 16 uhin luzera desberdin hartzen direnez, denboraren eragina ez da hain handia SLR kasuan bezala, eta horregatik handitzen da hainbeste erregresio koefizientea. Hala ere, metodo honen bitartez datu hobeak lortuko direla frogatzeko, hasieran banatutako datuak erabiliz kontzentrazio esperimentalak kalkulatu da kalibratu ekuazioaren bitartez, eta azkenik, kontzentrazio teorikoarekin alderatzeko errore erlatiboa kalkulatu da.

10. taula: *Eu_diklofenako (1) pH 1-erako kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko desberdintasuna, MLR metodoaren balidazioa burutzeko*

$C_{\text{teorikoa}}, \mu\text{g/mL}$	$C_{\text{esperimentalak}}, \mu\text{g/mL}$	Errore erlatiboa, %
51,80	50,06	3,36
51,80	52,16	-0,69
47,48	47,18	0,63
47,48	46,05	3,02
43,17	44,04	-2,02
43,17	45,43	-5,25
38,85	37,72	2,92
38,85	38,60	0,65
34,54	35,58	-3,04
34,53	33,85	1,97
30,22	29,63	1,93
30,22	30,12	0,32
25,90	24,40	5,81
25,90	26,95	-4,04
21,58	22,38	-3,67
21,58	22,59	-4,67
17,27	17,20	0,40
17,27	18,73	-8,47
12,95	13,42	-3,65
8,63	9,51	-10,10
4,32	3,80	11,87

10. taulako errore erlatiboak begiratu, hauek ez dira oso handiak, ia denak %10 baino baxuagoak baitira. Hala ere, badaude bi errore erlatibo, -10,10 eta 11,87, % 10 baino handiagoak direnak, baino 10. taula ikus daitekeen moduan, hauek bi

kontzentrazio baxuenei dagozkie. Beraz, emaitzak oso onak lortu direla esan daiteke.

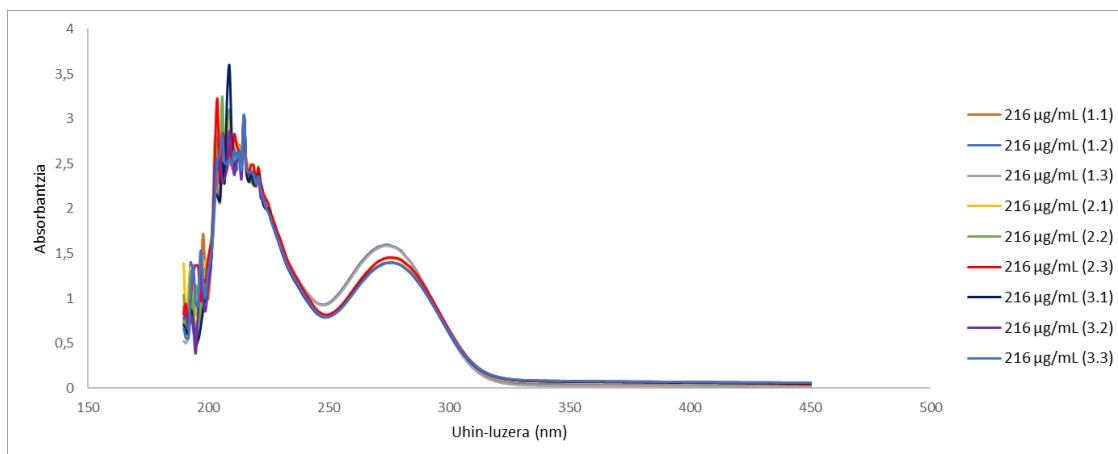
MLR metodoa erabiliz, emaitza hobekoak lortu dira. SLR-ren kasuan ikusi da errore handiena %129,39-koa zela, eta kasu honetan, errore handiena, %11,87-koa da, hau da, askoz txikiagoa. Beraz, laburbilduz, MLR metodoa Eu_diklofenako (1) pH 1 kasurako emaitza hobekoak lortzeko balio du.

4.4 DISOLBAGARRITASUNA (S) ETA DISOLBAGARRITASUN EFECTIBOAREN (S_{eff}) LORPENA

Disolbagarratasuna (S) eta disolbagarratasun efektiboaren (S_{eff}) balioak lortzeko, kontzentrazio ezaguneko disoluzioak prestatu ziren, saturazio puntu gainetik. Hauek, filtratu ondoren neurtu egin ziren UV espektrofotometria erabiliz. Neurketen emaitzak, aurretik lortutako kalibratu zuzenean sartu dira, horrela, disoluzioak duen lagin disolbatuaren kontzentrazioa jakiteko, hau da, disolbagarratasuna. Disolbagarratasun efektiboa lortzeko, S_{eff} , 4. ekuazioa erabili da.

4.4.1 DIKLOFENAKO pH 7

Diklofenako disoluzioaren hasierako kontzentrazioa 216 $\mu\text{g/mL}$ zen. Neurketekin hasi baino lehen, disoluzioa filtratu egin da soberan dagoen diklofenakoa kentzeko eta honen diluzio egokia prestatu zen, absorbantzia, espektrofotometroaren detekzio tartean sartzeko. Aurreko kasuetan bezala, datu gehiago izateko, kasu honetan ere, diluzioaren hiru erreplika prestatu ziren eta erreplika bakoitza hiru aldiz neurtu zen, 30. irudiko espektroa lortuz:



30. irudia: pH 7-ko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako diklofenako disoluzioen absorzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

30. irudian ikus daitekeenez, erreplika bakoitzaren absorbantziak antzekoak dira, lehen erreplikarena izan ezik. Beraz, datu horien bitartez lortuko diren disolbagarritasunaren balioak gainerakoen desberdinak izango direnez, hauek baztertu egingo dira disolbagarritasuna kalkulatzeko garaian.

Neurketak egin ostean, lortutako absorbantziaren maximoak 6. ekuazioan sartu ziren SLR metodoaren bitartezko disolbagarritasunak lortzeko. Horrela, kalibratu zuzenetik, disolbagarritasuna determinatu da, kalkulu egokiak eginez. Aurretik aipatu den moduan, lehenengo erreplikaren hiru neurketak baztertu egin dira, besteekin alderatuz balio desberdina ematen zutelako.

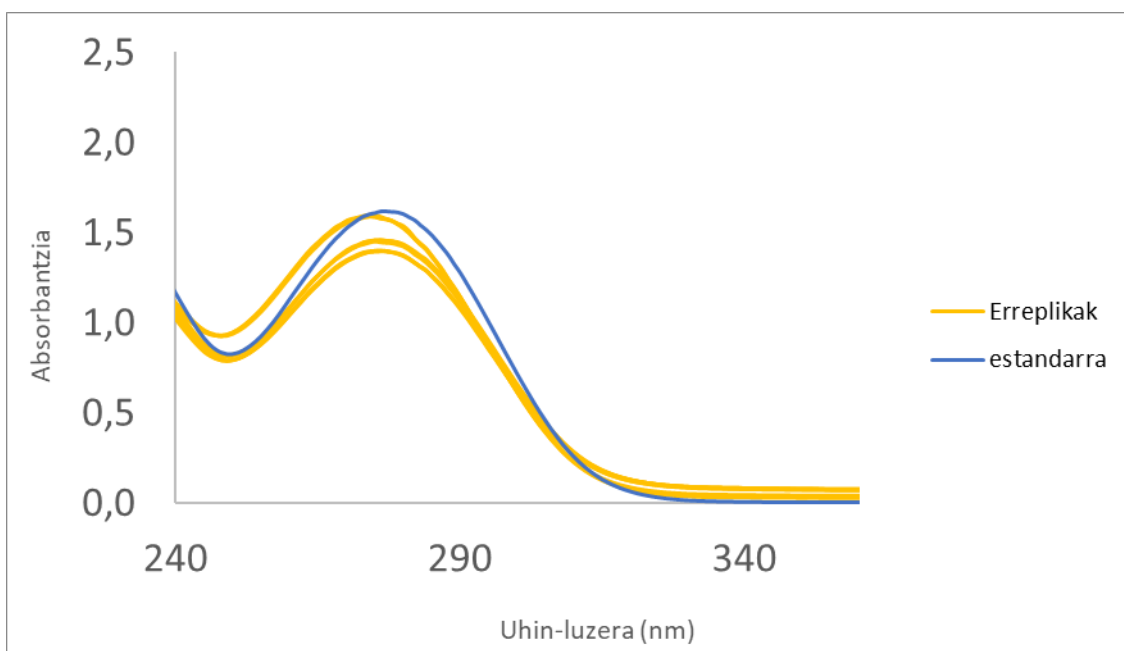
11. taula: SLR metodoaren bitartez diklofenako pH 7-arentzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	287,24
	289,88
	289,96
	278,49
	277,36
	276,90
BB	283,31
S	6,37
% RSD	2,25

SLR metodoarekin lortutako kalibratu zuzenarekin egindako kalkuluen bitartezko emaitzak ikusita (11.taula), batzbesteko (BB) S_{eff} balioa 283,31

$\mu\text{g/mL}$ -koa izan zen, desbideratze (S) eta %RSD txikiarekin. Hortaz, esan daiteke, lortutako emaitzak ez direla baliagarriak ondorioak ateratzeko, izan ere, disolbagarritasunak ezin baitu hasieran jarritako kontzentrazioa baino handiagoa izan.

Hurrengo irudian (31. irudia) ikus daiteke, disolbagarritasuna kalkulatzeko lortuako espektroak (horiz daude) eta $50 \mu\text{g/mL}$ -ko estandarren espektroa (urdinez). Antza dute, baina maximoa pixka bat mugitua dago, beraz, datu horrek eman dezake emaitza ongi ez ateratzeko erantzuna.



31. irudia pH 7-ko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako diklofenako disoluzioen absorzio espektroa bai erreplikenak bai estandarrena

MLR metodoaren bitartezko emaitzak lortzeko, neurketetatik lortutako 16 uhin-luzera desberdinen absorbantziaren balioak 7. ekuazioan sartu ziren. Horrela, ekuaziotik MLR metodoari dagozkion disolbagarritasunak determinatu dira, kalkulu desberdinak eginez.

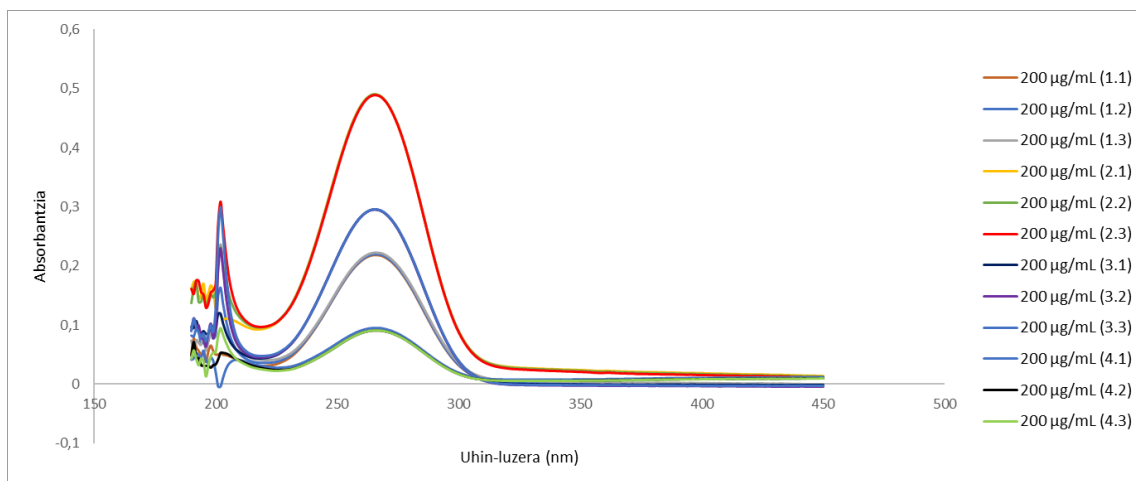
12. taula: MLR metodoaren bitartez diklofenako pH 7-rentzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	159,16
	167,38
	165,44
	145,85
	150,77
	149,69
BB	156,41
S	8,97
%RSD	5,73

MLR-ren kasuan aldiz, 12. taulan ikus daitekeen moduan, batzbesteko (BB) S_{eff} balioa 156,41 µg/ml-koa izan zen, desbideratze estandarra (S) eta %RSD txikiarekin. Lortutako disolbagarritasuna hasirako kontzentrazio baino txikiagoa denez, datu horiek ondorioak ateratzeko erabiliko dira. Hala ere, MLR metodoaren bitartez lortutako emaitzen arteko desbideratzea nahiko nabarmena da, izan ere, disolbagarritasuna altuena 159,16 µg/mL-koa baita eta baxuena aldiz, 145,85-koa.

4.4.2 DIKLOFENAKO pH 1

pH 1-eko ingurunean, diklofenako disoluzioaren hasierako kontzentrazioa, 200 µg/mL-koa zen. Kasu honetan ere, disoluzioa filtratu egin da hauspeatuta dagoen diklofenakoa kentzeko eta diluzio bat egin zen absorbantziaren seinalea espektrofotometroaren detekzio tartean sartzeko. Diluzio bakoitza 4 aldiz prestatu zen, beraz, lau erreplika egin ziren eta erreplika bakoitza 3 aldiz neurtu zen lortutako espektroa 32. irudikoa izanik.



32. irudia: pH 1-ko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako diklofenako disoluzioen absorzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

32. irudia aztertuz, ikus daiteke, kasu bakoitzean lortzen diren absorbantziak oso desberdinak direla beraien artean, nahiz eta disoluzio guztiek kontzentrazio bera eduki. Erreplika bakoitzeko neurketa bakoitza aztertzen bada, ikus daiteke, erreplika beraren neurketek absorbantziaren balio ia berdina ematen dutela kasu guztietan, hiru neurketak gainezarrita baitaude. Azaroa, beraz, errepliketan dago. Suposa daiteke, denborak absorbantzia duen eraginaren ondorioz gertatu dela hori, izan ere, erreplika bakoitza denbora ezberdina batean prestatu eta neurtu baita. Baina hori ez da horrela. 32. irudian ikusten den moduan, goitik hasita hirugarren lerroari dagokio lehenengo erreplika eta beraz, denboraren eraginaren ondoriozko arazoa bada, lerro horiek izango lukete absorbantzia handiena. Beraz, denboraren arazoa baztertua, pentsa daiteke, honen arazoa, diluzioak prestatzerako garaian egon dela, hau da, hauek ez direla ongi prestatu. Honen ondorioz, aurrean daiteke, datu hauek kalibratu zuzenean sartzean, oso emaitza desberdinak lortuko direla erreplikaren artean. Hala ere absorbantziaren artean, diferentzia txikiena erdiko bi lerroen artean daudenez, hau da, lehenengo erreplikaren eta hirugarren erreplikaren artean, emaitzak lortzeko bi erreplika horien datuez baliatuko gara. Horrela, bigarren erreplikaren eta laugarren erreplikaren datuak baztertuz.

Beraz, behin neurketak burututa, disolbagarritasunaren balioak lortzeko SLR metodoaren bitartez, neurketetatik lortutako absorbantziak 8. ekuazioan sartuko dira eta kalkulu egokiak eginez, disolbagarritasunaren balioa determinatuko da.

13. taula: SLR metodoaren bitartez diklofenako pH 1-entzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	108,39
	109,09
	110,38
	143,84
	142,62
	143,78
BB	126,52
S	18,88
%RSD	14,93

13. taulan SLR metodoaren bitartez, batzbesteko (BB) S_{eff} balioa 126,52 µg/mL-koa izan zela ikus daiteke, desbideratze (S) eta %RSD handiarekin.. Aurretik aipatu den moduan, bigarren eta laugarren errepliken datuak baztertuak izan dira, absorbantziaren balio oso ezberdina izateagatik. Hala ere, desbideratzean ikus daitekeen moduan lehen eta hirugarren errepliken arteko disolbagarritasunaren arteko ezberdintasuna handia da. Honen ondorioz, datu hauek oso fidagarriak ez direla esango da.

MLR metodoaren bidez disolbagarritasuna kalkulatzeko, kalibratu zuzena egiteko erabilitako uhin luzeran lortutako absorbantziaren balioak 9. ekuazioan sartu dira eta kalkulu egokiak eginez disolbagarritasuna determinatu da. Kasu honetan ere, bigarren eta laugarren errepliken datuak baztertu egin dira disolbagarritasuna kalkulatzeko garaian, beraien absorbantzia lehen eta hirugarren erreplikarekin alderatuta oso desberdina zelako. 14. taulan daude adierazita lortutako disolbagarritasunak MLR metodoa erabiliz.

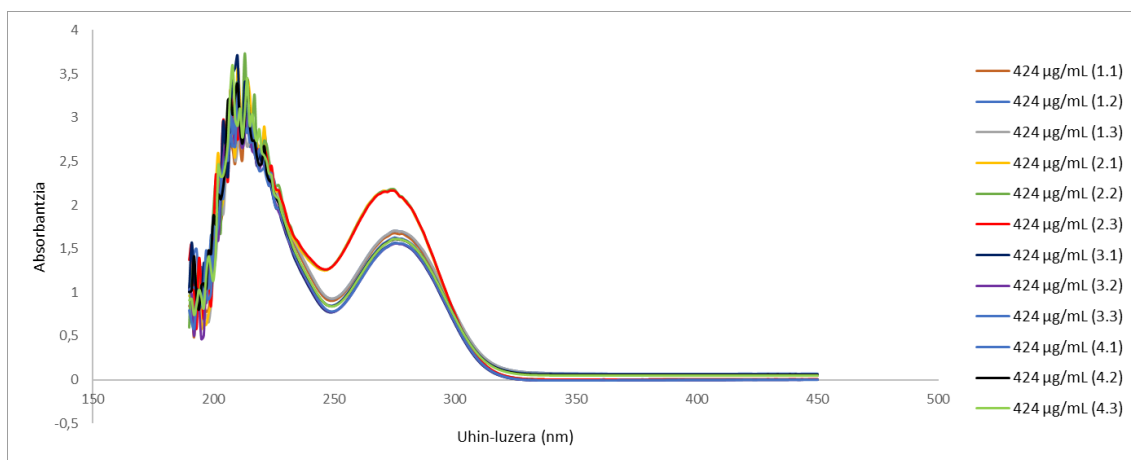
14. taula: MLR metodoaren bitartez diklofenako pH 1-entzat lortutako disolbagarritasun balioak

	Seff, µg/mL
	155,11
	155,38
	156,23
	193,64
	194,40
	194,05
BB	174,80
S	21,07
%RSD	12,05

MLR bitartez, batzbesteko (BB) S_{eff} balioa 174,80 µg/mL-koa izan zen, desbideratze (S) eta %RSD handiarekin. Hau, SLR metodoarekin lortutako baino handiago den arren, kasu honetan emaitzen arteko desbideratzea ere handiago da. Beraz, hauek emaitza fidagarriak ez direla ondoriozta daiteke.

4.4.3 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 7

424 µg/mL den Eu_diklofenako (1) konposatuaren disoluziori neurketak egin zaizkio UV espektroskopia erabiliz, horrela disolbagarritasuna lortu ahal izateko. Disoluzio hau saturatua dagoenez, filtratu egin da eta diluzio egokia egin zaio seinale detekzio tartean sartzeko, eta aurreko kasuetan bezala datu gehiago lortzeko diluzio bakoitzaren lau erreplika neurtu ziren, erreplika bakoitzari hiru neurketa burutuz. Neurketen bitartez lortutako espektroak 33. irudian adierazita daude.



33. irudia: pH 7-ko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako Eu_diklofenako (1) disoluzioen absorzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

33. irudia erreparatuz, ikus daiteke, ia erreplika guztiek absorbantziaren balio antzekoa ematen dutela, batek izan ezik. Erreplika hori, hain zuzen ere bigarren erreplika (espekto gorria), baztertu egingo da disolbagarritasuna determinatzeko garaian.

Behin neurketak eginda, absorbantziaren balioak 10. ekuazioak sartuz, SLR metodoari dagozkion disolbagarritasunak lortuko dira, kalkulu egokiak eginez.

15. taula: SLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) pH 7-rentzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	350,25
	356,71
	355,93
	326,40
	326,53
	327,56
	338,53
	336,43
	337,67
BB	339,56
S	12,13
%RSD	3,57

15. taulako datuak aztertzen badira, ikusten da, batazbesteko (BB) S_{eff} balioa 339,59 µg/mL-koa izan zela, desbideratze (S) handiarekin eta %RSD txikiarekin. Hala ere, desbideratzeari dagokionez hau ere nahiko handia da, baina diklofenako pH 1 kasuan bezain handiak. Beraz, honen ondorioz, emaitzak ez direla hain txarrak ondoriozta daiteke. Hala ere, RSD balioa nahiko txikia denez, emaitzen prezisio ona dela esan daiteke.

MLR metodoaren bitartez disolbagarritasuna determinatzeko, kalibratu zuzenean erabili diren 16 uhin luzeretan berdinetako datuak erabiliko dira neurketa hauen kasuan ere. Beraz, uhin luzera horietako absorbantziak sartuko dira 11. ekuazioan eta kalkulu egokiak eginez, disolbagarritasuna determinatuko da.

16. taula: MLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) pH 7-rentzat lortutako disolbagarritasun balioak

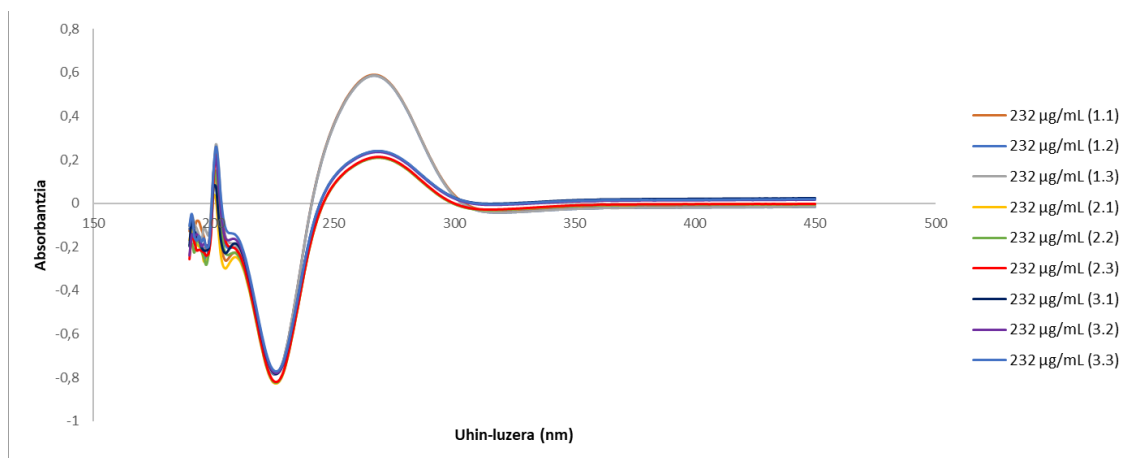
	S_{eff}, µg/mL
	266,98
	275,17
	264,22
	373,81
	280,26
	278,87
	278,71
	277,62
	286,60
BB	275,80
S	6,84
%RSD	2,48

16. taulan ikus daitekeen moduan, batazbesteko (BB) S_{eff} balioa 275,80 µg/mL-koa izan zen, desbideratze (S) eta %RSD txikiarekin. Hemen disolbagarritasuna ez da SLR metodoaren bitartez lortu dena bezain altua baina kasu honetan emaitzen arteko desbiderapena askoz txikiago da. Honen ondorioz, disolbagarritasunaren balio hau fidagarriago dela esango da. Balio hauek hobeagoak dira, MLR metodoaren bidezko kalibratu zuzenaren erregresio koefizientea hobeagoa zelako kasu honetan. Azkenik, RSD balioa erreparatuz, ikus daiteke, hau balio txikia dela eta beraz, emaitzen prezisioa ona dela, SLR metodoarekin baino prezisoagoak hain zuzen ere, balio hau txikiagoa baita MLR metodoaren kasuan.

4.4.4 EU_DIKLOFENAKO (1) pH 1

232 µg/mL den Eu_diklofenako (1) konposatuaren disoluzioaren disolbagarritasuna determinatu ahal izateko, lehenik disoluzioa filtratu egin behar izan da, saturatuta egonik, hauspeatuta dagoen konplexua baztertzeko eta horrela disoluzio garden bat lortzeko. Hau eginda, diluzio egokia prestatu zen absorbantziaren seinalea espektrofotometroaren detekzio tartean sar zedin. Diluzio bakoitzaren hiru erreplika prestatu ondoren, UV espektroskopia erabiliz berain absorbantzia neurtu zen uhin luzera desberdinetan, erreplika

bakoitza hiru aldiz neurtuz. Neurketak egin ostean ondorengo emaitzak lortu dira:



34. irudia: pH 1-eko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako Eu_diklofenako (1) disoluzioen absorzio espektroa. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

34. irudian ikus daiteke, lehen erreplikak izan ezik, gainerako errepliken absorbantziaren maximoa ia berdina dela. Beraz, honen ondorioz, lehen erreplika (espektro morea) baztertu egingo da disolbagarritasun kalkulatzeko garaian. Gainera, ikus da, erreplika guztiek tendentzia berdina dutela, hain zuzen ere, beste kasuetan ikusi ez dugun tendentzia bat. Guztiak, absorbantziaren maximora iritsi baino lehen, balio negatiboetan beherakada bat dute eta ikusi ditugun beste kasuetan beherakada bat izan beharrean beti gorakada bat izaten dute. Honen arrazoia, pH=1-eko tanpoi disoluzioan egon daiteke. Zuria egiterako garaian, tanpoi disoluzio hau erabili denez, agian honek piko bat eman du seinale horietan, eta hori 0 gisa hartzen denez, Eu-diklofenako (1) pH 1-eko disoluzioa neurtzerako garaian gorakada beharrean beherakada moduan neurtu da absorbantzia.

SLR metodoaren bitartez disolbagarritasuna kalkulatzeko, neurketak egin ostean, hauetatik lortutako absorbantziaren maximoaren balioak 12. ekuazioan sartu dira, ondorengoak izanik lortutako disolbagarritasunak.

17. taula: SLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) pH 1-entzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	30,73
	30,82
	31,45
	35,45
	35,15
	35,74
BB	33,22
S	2,46
%RSD	7,39

Kasu honetan, batazbesteko (BB) S_{eff} balioa 33,22 µg/mL-koa izan zen, desbideratze (S) txikiarekin eta %RSD handiarekin, 17. taulan ikus daitekeenez. Desbiderapenari dagokionez, kasu honetan, erreplika eta neurketen desbiderapena nahiko txikia da, eta horren ondorioz, disolbagarritasunaren balioak fidagarriak direla esan daiteke. Hala ere, RSD balioa altua dela esan daiteke eta honen ondorioz, emaitzak ez direla oso prezisoak izango.

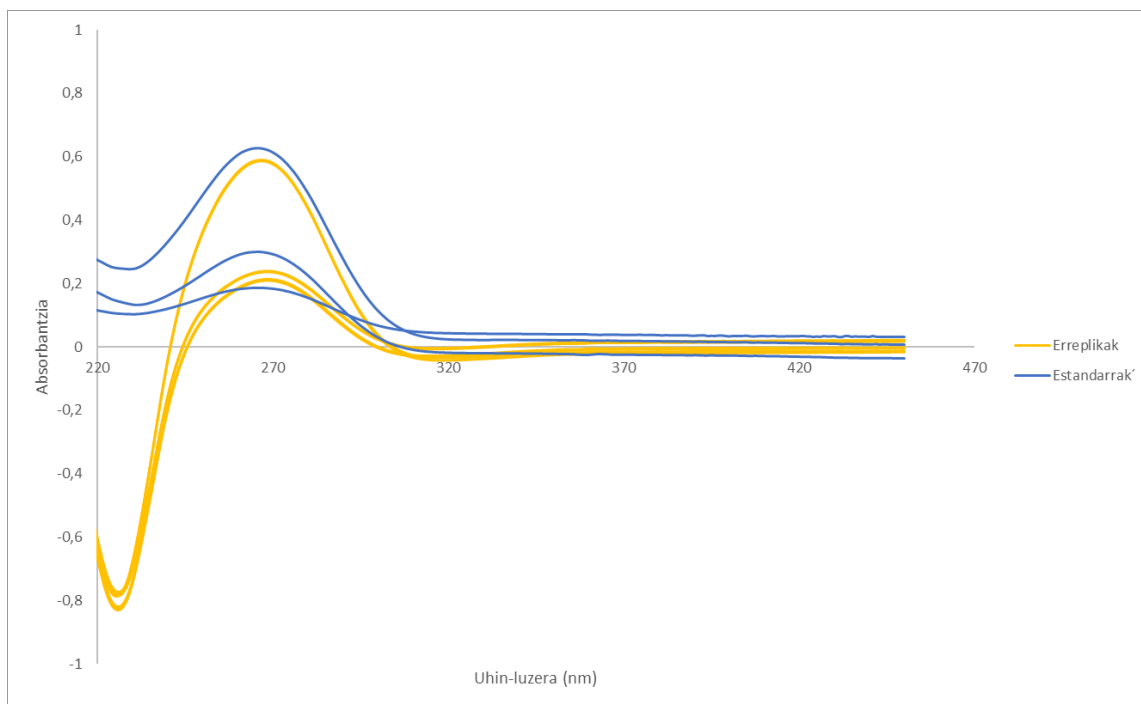
MLR metodoaren bitartez disolbagarritasuna kalkulatzeko 13. ekuazioa erabili behar da. Kasu honetan absorbantziaren maximoa hartu beharrian, 16 uhin luzera desberdinetako absorbantziak erabili behar dira, eta beraz, hauetan neurtu den absorbantzia 13. ekuazioan sartuz, eta egokiak diren kalkuluak eginez, disolbagarritasuna determinatu da. 18. taulan agertzen dira lortutako balioak.

18. taula: MLR metodoaren bitartez Eu_diklofenako (1) pH 1-entzat lortutako disolbagarritasun balioak

	S_{eff}, µg/mL
	17,51
	16,19
	19,23
	17,16
	14,65
	16,78
BB	16,92
Desbideratzea	1,51
%RSD	8,95

MLR metodoaren bitartez, batazbesteko (BB) S_{eff} balioa 16,92 µg/mL-koa izan zen, desbideratze (S) txikiarekin eta %RSD handiarekin. Desbideratzea txikia izatea seinale ona da, izan ere, honek esan nahi du, emaitzak fidagarriagoak direla, erreplika guztien disolbagarritasunak antzekoak izateagatik. Hala ere, RSD-ren balio erreparatzen badugu hau nahiko handia dela esan daiteke emaitzak, hau da, ez direla oso prezisoak.

Printzipioz, ondo dagoela pentsa dezakegu, baina 35. irudian begiratzen badugu, errepliken espektroak eta estandararekin lortutakoak ez dira antzekoak. Ikus daiteke 35. irudian, nolako forma duten eta beraz MLRen kalibraketa erabiltzerakoan erroreak sor daitezke.



35. irudia pH 1-eko ingurunean S-ren kalkulurako erabilitako Eu_diklofenako (1) disoluzioen absortzio espektroa bai erreplikenak bai estandarrarenak

Laburbilduz, 19. taulan, disolbagarritasunari dagozkion emaitza guztiak adierazten dira. Beran ikus daiteke, metodo bakoitzarekin lortutako disolbagarritasunaren balioak, diklofenakoarentzat eta Eu_diklofenako (1)-arentzat, pH 7 eta pH 1-ean.

19. taula: kasu bakoitzerako lortu diren disolbagarritasun efektiboaren (S_{eff}) emaitzen laburpena

Ingurunea	Konposatua	Kalibratu zuzena	MLR
		S_{eff} (g/mL)	S_{eff} (g/mL)
pH 7	Dikl	283,31	156,41
	Eu_Dikl	339,56	275,80
pH1	Dikl	126,52	174,52
	Eu_Dikl	33,22	16,92

4.5 LOG $P_{o/w}$ -ren LORPENEA

Sarreran aipatu den moduan, farmako batek biodistribuzio on bat izateko, garrantzitsua izango da, hau mintz biologikoetan zehar iragazkorra izatea. Honen ondorioz, farmakoaren permeabilitatea garrantzia handiko propietatea da. Farmako baten permeabilitatea neurtzeko Log $P_{o/w}$ balioa erabiltzen da, hau

da, fase organiko eta akuosoaren arteko banaketa koefizientea. Hau kalkulatzeko, diklofenakoaren edo Eu_diklofenakoaren (1) kontzentrazio ezaguna duen disoluzio akuoso bat okatanolean saturatua dagoena, uretan saturatutako oktanol disoluzio batekin nahastu da eta 24 h-z mantendu da biraka noria batean 37 °C-tan. Honen ondorioz, disoluzio akuosoan dagoen diklofenako edo konplexuaren frakzio bat oktanolera pasako da, eta hori da zehazki neurtu nahi dena, zenbat diklofenako edo konplexu pasa den fase akuosotik oktanolera. Horren bitartez, diklofenako zein Eu_diklofenako (1)-aren permeabilitatea zein den jakingo da, eta baita elkarrekin alderatu ere.

Horretarako, diklofenako zein Eu_diklofenako (1) disoluzioak prestatu dira lehenik, bi kontzentrazio ezberdinetakoak, 250 eta 100 µg/mL eta bi ingurune desberdinetan, pH 7 eta pH 1. Disoluzio hauen neurketak burutu dira baita ere. Lehen neurketak disoluzioak prestatu bezain laster egin dira, baina aurretik aipatu dugun moduan, denborak absorbantzia eragina duenez, 24 h-tara neurketak berriro errepikatu dira, absorbantziak aldaketaren bat jasan duen edo ez ikusteko, izan ere, absorbantzia aldatzen bada, horrek esan nahi du, fase akuosoan dagoen diklofenako edo konplexuaren kontzentrazioa ere aldatu egin dela eta beraz, honek eragina izango du oktanolera pasako den frakzioarekin. Horren ondorioz, Log $P_{o/w}$ hasierako disoluzioen hiru kontzentrazio desberdinekin kalkulatu da. Lehenengo kalkuluak, disoluzioari botatuko diklofenako edo Eu_diklofenako (1) mg kopuruarekin kalkulaturako kontzentrazioa erabiliz egin dira. Bigarrenak, disoluzioak prestatu bezain pronto UV espektrofotometriaren bitartez lortutako balioak, kalibratu zuzenean sartuta lortzen den kontzentrazioarekin eginak dira. Azkenik, hirugarren kalkulua, disoluzioak 24 h igaro ondoren duten absorbantzia kalibratu zuzenetan sartuta lortzen den kontzentrazioaren bitartez egin dira. Ondoren, Log $P_{o/w}$ kalkulatzeko 5. ekuazioa erabili da.

4.5.1 pH 7 INGURUNEA

Diklofenako eta Eu_diklofenako (1)-aren disoluzioak prestatu ziren eta bakoitzetik bi kontzentrazio ezberdin erabiliz, 250 eta 100 µg/mL. Gainera, kontzentrazio bakoitzeko disoluzioa hiru aldiz neurtu zen horrela emaitza gehiago izateko. Lehen esan bezala, behin disoluzioak presatuta, hauek UV espektrofotometroan neurtu ziren (espektroak eranskinetan daude) diluzio egokiak erabiliz, horrela $t=0$ deneko disoluzioen absorbantzia jakinik. Ondoren

disoluzio hauek oktanol(u)-rekin nahastu eta noria batean 24 h-z biratzen egon ondoren fase akuosoari neurketak egin zitzaizkion. Baita ere, noriako disoluzioekin batera, hasierako disoluzioak neurtu ziren, horrela t=24 h denean disoluzio horien absorbantzia, eta beraz, kontzentrazioa zein zen jakiteko.

Beraz, neurketa guzti hauetako absorbantziaren maximoak, diklofenakoaren kasurako 6. ekuazioan, eta Eu_diklofenako (1)-aren kasurako 10. ekuazioan sartuz, disoluzio bakoitzaren kontzentrazioa jakin da. Azkenik, SLR metodoaren bitartez lortutako $\text{Log } P_{o/w}$ balioak jakiteko, 5. ekuazioa erabili da. Lehen aipatu bezala, balio hau hasierako disoluzioaren hiru une desberdinetan lortutako kontzentrazio desberdinekin kalkulatu da, hau da, hasierako disoluzioaren kontzentrazio teorikoa (botatako mg kopuruarekin eta bolumenarekin kalkulatu), t=0 denean duen absorbantziatik lortutako kontzentrazioa eta t=24 denean duen absorbantziatik lortutako kontzentrazioa hain zuzen ere. Hau horrela egin da, denborak absorbantzian duen eragina ikusirik, hasierako disoluzioaren absorbantzia aldatzearekin batera, $\text{Log } P_{o/w}$ balioak ere aldatuko direlako.

20. taula: SLR metodoaren birtartez pH 7-ko ingurunean lortutako $\text{Log } P_{o/w}$ balioak

Diklofenako				Eu_diklofenako (1)			
	$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{teorikoa}	$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{t=0}	$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{t=24}		$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{teorikoa}	$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{t=0}	$\text{Log } P_{o/w}$ [] _{t=24}
	1,043	1,136	1,028		1,001	1,132	1,093
	1,116	1,228	1,380		1,915	2,006	1,920
BB	1,080	1,182	1,204	BB	1,458	1,569	1,506
S	0,05	0,06	0,25	S	0,65	0,62	0,58
%RSD	4,75	5,50	20,64	%RSD	44,35	39,42	38,83

19. taulako emaitzetan ikus daitekeen moduan, diklofenakoa europio metalera koordinatzean bere permeabilitatea igo egiten da, $\text{Log } P_{o/w}$ -ren balioa igo egiten delako. Hala ere, kontuan hartuta balioak -2 eta 2 artean egon behar dutela, bi balioak orokorrean nahiko altuak dira, nahiz eta koordinazioarekin hau hobetzea lortu den. RSD-ri dagokionean, ikusten da balio hauek txikiagoak direla diklofenako askearen kasuan. Hala ere, nahiz eta txikiagoak izan, t=24 deneko emaitzetan lortutako RSD balioa oso handia da eta beraz, emaitza ez da prezisoa izango. Eu_diklofenako (1) kasurako, RSD balioak oso altuak dira eta ondorioz, emaitzak ez dira prezisoak. Bestalde, $\text{Log } P_{o/w}$ -ren datuak

horizontalean begiratzen badira, ikusten da beraien artean datuak ez direla oso desberdinak eta beraz, lortutako datuak ez direla hain kaskarrak.

Aldiz, MLR bitartezko $\text{Log } P_{o/w}$ balioak jakiteko, 7. ekuazioa erabili da diklofenakoaren kasurako eta Eu_diklofenako (1)-aren kasurako, 11. ekuazioa. SLR metodoan ez bezala, hemen ez da absorbantziaren maximoa sartzen kalibratu ekuazioan. Kasu honetan, kalibratu zuzena egiteko aukeratutako uhin-luzeretan ematen duten absorbantziak sartzen dira ekuaziora., eta horren bitartez, kasu bakoitzean dagoen kontzentrazioa kalkulatu da. Kontzentrazio horiek erlazionatuz, hau da, 5. ekuazioa erabiliz, $\text{Log } P_{o/w}$ -ren balioa ezagutuko da. Kasu honetan ere, $\text{Log } P_{o/w}$ balioa hiru kontzentrazio ezberdinekin kalkulatu da, denborak absorbantzia duen eraginaren ondorioz.

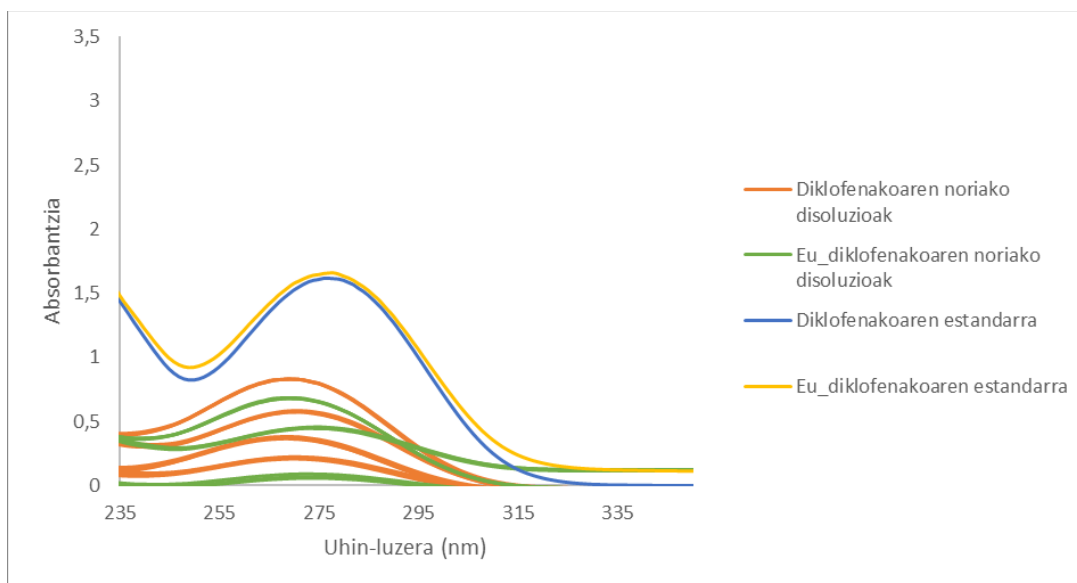
21. taula: MLR metodoaren birtartez pH 7-ko ingurunean lortutako $\text{Log } P_{o/w}$ balioak

Diklofenako				Eu_diklofenako (1)			
	$\text{Log } P_{o/w}$ []teorikoa	$\text{Log } P_{o/w}$ []t=0	$\text{Log } P_{o/w}$ []t=24		$\text{Log } P_{o/w}$ []teorikoa	$\text{Log } P_{o/w}$ []t=0	$\text{Log } P_{o/w}$ []t=24
	-	-	-		-	-	-
	-	-	0,264		0,302	-	-
BB	-	-	0,264	BB	0,302	-	-

20. taulan ikus daitekeen moduan, datu batzuk ezin izan dira lortu, izan ere, emaitzak kalibratu zuzenean sartzean, kontzentrazioa negatiboa ematen baitu. Kontzentrazio batek balio negatiboak izatea ezinezkoa denez, datuak baztertu egin dira. Beste kasu batzuetan, hasierako disoluzioaren kontzentrazioaren eta banaketa egin osteko kontzentrazioaren arteko kenketak negatiboa eman du. Logaritmoaren barrukoak ezin duenez negatiboa izan, datu horiek era baztertu egin dira. Honen ondorioz, datuek ez dute aukera ematen elkarren artean konparatzeko. Hala ere, lortu den datu bakarra aztertzen, ikus daiteke, hau SLR metodoarekin lortutako emaitzaren oso desberdina dela, eta gainera, askoz baxuagoa.

36. irudian ikus daitekeen moduan, noriako disoluzioen absorbantziaren maximoak ez dute estandarren maximoarekin bat egiten. Honen ondorio izan daiteke oktanolak UV espektroan duen interferentzia. Beraz, emaitza onak

lortzearen arrazoia hori izan daiteke, izan ere, interferentzia hori ez baita kontuan hartu.



36. irudia: pH 7-ko ingurunean $\text{Log } P_{o/w}$ -ren kalkulurako erabilitako diklofenako eta Eu_diklofenako (1) disoluzioen absorzio espektroa bai noriako disoluzioenak bai estandarrarenak

4.5.2 pH 1 INGURUNEA

Diklofenako eta Eu_diklofenako (1) kontzentrazio ezaguna duten disoluzioen neurketak egin dira $t=0$ eta $t=24$ direnean UV espektroskopia bitartez (espektroak eranskinetan daude). Azken hau, beharrezkoa da, izan ere, arestian aipatu dugun moduan, denboraren aurrean absorbantzia aldatu egiten baita, eta oktanol (u) eta diklofenako edo konplexu kantitate zehatza duten ura (o) disoluzioak norian 24 h-z biraka egoten direnez, denborak ere eragina izan dezakeelako hauen absorbantzian. Beraz, hasierako disoluzioen eta norian biraka egon diren disoluzioen fase akuosoaren neurketak egin ostean, absorbantziaren maximoa 8. eta 12. ekuazioetan sartuz, disoluzioen kontzentrazioa zenbatekoa den jakin da. $\text{Log } P_{o/w}$ kalkulatzeko, hasierako disoluzioen kontzentrazioa eta oktanol fasera pasa den kontzentrazioa erlazionatu dira, hau da, 5. ekuazioa erabili da.

22. taula: SLR metodoaren birtartez pH 1-ko ingurunean lortutako Log P_{o/w} balioak

Diklofenako				Eu_diklofenako (1)			
	Log P _{o/w} [] _{teorikoa}	Log P _{o/w} [] _{t=0}	Log P _{o/w} [] _{t=24}		Log P _{o/w} [] _{teorikoa}	Log P _{o/w} [] _{t=0}	Log P _{o/w} [] _{t=24}
	0,169	0,035	0,292		0,721	0,177	0,555
	-0,389	0,223	0,219		0,491	0,169	0,146
BB	-0,110	0,129	0,225	BB	0,606	0,173	0,350
S	0,39	0,13	0,05	S	0,16	0,01	0,29
%RSD	-357,63	103,07	20,36	%RSD	26,74	3,39	82,53

22. taulan ikus daiteken moduan, diklofenakoa aske dagoenean Log P_{o/w} balioa txikiagoa da, eta beraz, permeableagoa izango da hau koordinatuta dagoenean. Beraz, diklofenakoa koordinatuta dagoenean pH 1-aren kasuan biodistribuzio hobea izango duela esan daiteke. Hala ere, RSD balioak erreparatuz, ikusten da emaitzak ez direla batere prezisoak, RSD oso altua baita.

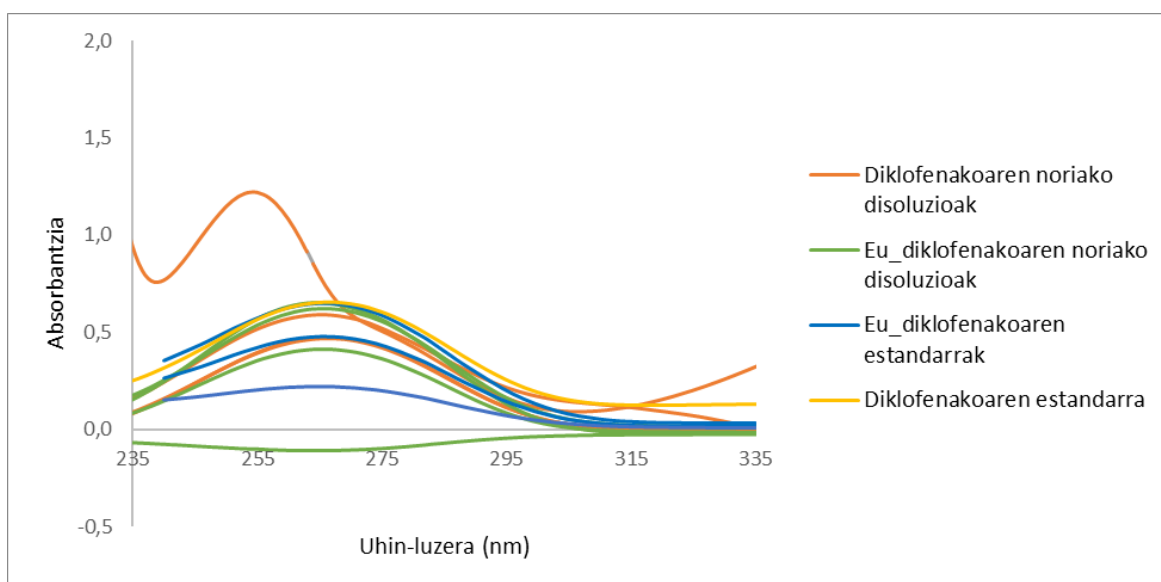
Aldiz, MLR bitartez Log P_{o/w}-ren emaitzak lortzeko, 9. eta 13. ekuazioak erabiliko dira. Kasu honetan, uhin luzera ezberdinetan lortutako absorbantziak sartuko dira kalibratu ekuaziora eta ez maximoarenak soilik. Beraz, hasierako disoluzioaren neurketak t=0 eta t=24-en egin ostean, eta norian biraka egon diren disoluzioen fase akuosoak neurtu ostean, uhin luzera desberdinetako (kalibratu zuzena egiteko erabili diren berdinak) absorbantziak kalibratu ekuazioan sartu dira eta kasu bakoitzeko kontzentrazioa kalkulatu da. Azkenik, 5. ekuazioa erabiliz, Log P_{o/w} kalkulatu da.

23. taula: MLR metodoaren birtartez pH 1-ko ingurunean lortutako Log P_{o/w} balioak

Diklofenako				Eu_diklofenako (1)			
	Log P _{o/w} [] _{teorikoa}	Log P _{o/w} [] _{t=0}	Log P _{o/w} [] _{t=24}		Log P _{o/w} [] _{teorikoa}	Log P _{o/w} [] _{t=0}	Log P _{o/w} [] _{t=24}
	0,613	0,380	0,718		2,028	1,464	1,897
	-	-0,080	-0,086		-	-	-
BB	0,613	0,150	0,316	BB	2,028	1,464	1,897
S	-	0,32	0,57	S	-	-	-
%RSD	-	216,46	180,11	%RSD	-	-	-

pH 1-eko inguruenean ere, pH 7-koaren arazo berdina gertatu da eta ondorioz, datu batzuk baztertu egin dira kasu honetan ere. Gainera, sarreran azaldu den moduan, $\log P_{o/w}$ -2 eta 2 balioen tartean egon behar du. Ikus daitekeen moduan, balio bat 2 baino handiago da, beraz, balio hori ere baztertu egingo da. RSD kalkulatu ahal izan den kasuetan, ikusten da honen balioa ikaragarri handia dela eta beraz, emaitzak ez direla batere prezisoak.

37. irudian ikus daitekeen moduan, kasu honetan absorbantziaren maximo gehienek bat egiten dute. Hala ere, ikus daiteke, norian egondako disoluzioetan, bai diklofenakoan eta bai Eu_diklofenako (1)-an, bi erreplikak ez dutela tendentzia berdina jarraitzen, gorena eta behererena dauden espektroek hain zuzen ere. Hemen ere, beraz, kasu batzuetan, oktanolaren interferentzia handia dago eta ondorioz, baita emaitza onak lortzeko zailtasuna ere.



37. irudia: pH 1-eko ingurunean $\log P_{o/w}$ -ren kalkulurako erabilitako diklofenako eta Eu_diklofenako (1) disoluzioen absorzio espektroa bai noriako disoluzioenak bai estandarrenak

4.6 LORTUTAKO DATUEN LABURPENA

Disolbagarritasunaren eta $\text{Log } P_{o/w}$ -ren emaitzak ondorengo moduan laburtzen dira.

23. eta 24. tauletan ikus daiteken moduan, diklofenako askearen eta $\text{Eu}_{\text{diklofenako (1)}}$ -aren S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ balioak aztertuz, ikusi da, orokorrean disolbagarritasun eta permeabilitate balio hobekak lortu direla diklofenako koordinatuta dauden kasuetarako. Hala ere, pH 1-aren kasuan disolbagarritasunaren balioan jaitziera bat dagoela ikusi da $\text{Eu}_{\text{diklofenako (1)}}$ -aren kasuan. Jaitziera hau oso nabarmena den arren, koordinazioaren bitartez, permeabilitatea handiagotzea lortu da, eta hau faktore garrantzitsu bat da. Laburbilduz, nahiz eta pH 1-aren kasuan disolbagarritasun jatsi, orokorrean diklofenakoaren biodistribuzio hobetzea lortu da hau metal batera koordinatuz.

Baita ere, taulak begiraturik, ikus daiteke, MLR-ren kasuan, balio batzuk ezin izan direla kalkulatu $\text{Log } P_{o/w}$ -ri dagokionez, eta batez ere, arazo hau $\text{Eu}_{\text{diklofenako (1)}}$ pH 7-aren kasuan gertatu dela. Honen arrazoia, oktanolaren interferentzian dago, hau ez baita ondo kalkulatu. Gainera, suposa daiteke permeabilitatea asko hobetu dela koordinazioaren ondorioz, eta beraz, fase akuosoan gelditutako konplexuaren kontzentrazio txikia izan daitekeela jakinda, absorbantzia hauek kalibratu zuzenean sartuz balio negatiboak lortu dira, kalibratu zuzenaren zehaztasun faltagatik eta baita kontzentrazio oso baxuak edukitzearen ondorioz.

Hala ere, orokorrean, lehen esan bezala biodistribuzio hobetu egin da, eta sarreran esan bezala, biodistribuzioa hobetzeko, kasurik onena bi parametroak igotzea bada ere, bi parametrotako bat igotzea ere biodistribuzioa hobetzeko faktore garrantzitsua da.

24. taula: pH 7-ko ingurunean lortutako emaitzak

pH 7								
Konposatua	S _{eff} μg/mL		Log P _{o/w}					
			[] _{teo}		[] _{t=0}		[] _{t=24}	
	SLR	MLR	SLR	MLR	SLR	MLR	SLR	MLR
Dikl	283,81	156,41	1,080	-	1,182	-	1,204	0,264
Eu_dikl	339,56	275,80	1,458	0,302	1,569	-	1,506	-

25. taula: pH 1-ko ingurunean lortutako emaitzak

pH 1								
Konposatua	S _{eff} μg/mL		Log P _{o/w}					
			[] _{teo}		[] _{t=0}		[] _{t=24}	
	SLR	MLR	SLR	MLR	SLR	MLR	SLR	MLR
Dikl	126,52	174,80	-0,110	0,613	0,129	0,150	0,225	0,316
Eu_dikl	33,22	16,92	0,606	-	0,173	1,464	0,350	1,897

5. ONDORIOAK

Lan honetan, Eu_diklofenako (1) koordinazio konposatuaren sintesia, karakterizazioa eta S_{eff} eta $\log P_{o/w}$ balioen determinazioa egin da datuen analisirako metodo desberdinak erabiliz, fisiologikoki garrantzitsuak diren pH-etan eta gorputz-tenperaturan.

Hona hemen azterlan honen emaitza eta ondorio garrantzitsuenak:

1. Tenperaturak eragina du absorbantzia, izan ere, tenperaturaren igoerak absorbantziaren igoera ekartzen baitu. Beraz, garrantzi handikoa izango da tenperatura kontrolatzea eta 37 °C-tan konstante mantentzea neurketak egiterako garaian.
2. Absorbantzia denboraren zehar aldatzen joango da. Zinetikak egitean ikusi den moduan, pH 1-eko ingurunean denborak paper garrantzitsu bat jolastuko du absorbantzia, izan ere, denbora aurrera joan ahala absorbantzia jaitsi egin baita. pH 7-ko diklofenako disoluzioan denborak ere eragina izango du, baina ez pH 1-ean bezain bestekoa. Hala ere, pH 7-ko ingurunean Eu_diklofenako (1) konposatuaren U.more-Ikuskor espektroetan denborak ez du eragin nabarmenik izan. Honen ondorioz, garrantzitsua da neurketetan denbora kontrolatua izatea, batez ere $\log P_{o/w}$ neurtzerako garaian, izan ere, disoluzioak prestatu eta 24 h-ra neurtzen baitira.
3. Neurketa kopurua eta erreplika kopurua geroz eta handiagoa izan, zehaztasun handiagoko emaitzak lortzeko aukera ematen du. Hori, diklofenako eta Eu_diklofenako (1) konposatuaren kalibratu zuzenak alderatuz ikusi daiteke. Gainera, geroz eta datu gehiago izanda, aukera ematen du datu batzuk baztertzeko, horrela, metodoaren balidazio egin ahal izateko.
4. S_{eff} eta $\log P_{o/w}$ -ren balioak datuen analisirako bi metodo desberdin erabilia kalkulatu dira; SLR eta MLR, hurrenez hurren. Lortutako emaitzetatik ondorengoa ondorioztatu da:
 - a. MLR metodoaren bidez erregresio koefizientearen balio altuagoa lortu da kasu guztietan. Honen bitartez, kalibratu zuzenetik datu zehatz eta baliagarriak lor ditzakegu.
 - b. Metodoaren balidazioa egiterako garaian, kontzentrazio teoriko eta esperimentalaren arteko diferentziak adierazgarriagoak dira

SLR metodoaren bitartez. Beraz, orokorrean SLR metodoarekin lortutako kalibratu zuzenaren ekuazioaren bitartez emaitzak hobeagoak lortuko dira MLR metodoarekin baino.

- c. Orokorrean, S_{eff} balioak begiratzuz, esan daiteke, balio hobeagoak lortu direla SLR metodoaren bitartez. Aldiz, $\text{Log } P_{o/w}$ -ren kasuan, MLR bitartez, balio batzuk ezin izan dira lortu, norian 24 h igaro duten disoluzioen neurketen emaitzen bitartez lortutako kontzentrazio gehienak negatiboak direlako. Beraz, kasu honetan, bi metodoak konparatzea zaila izango da. Hala ere, MLR bitartez lortu diren balio gutxi horiek SLR metodoarekin lortutakoekin alderatuz, esan daiteke nahiz eta pH 7-aren kasuan baxuagoa izan pH 1-ean lortutako balioak altuagoak izan direla MLR metodoaren bitartez.

5. Datuen analisirako metodo desberdinak albo batera utzita S , S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ -ren balioak aztertzen badira, ondorengo ikusten da:

- a. pH 7-aren kasuan diklofenakoa europio metalera koordinatzean, disolbagarritasunaren igoera nabarmena dela, eta baita permeabilitatea ere, nahiz eta azken hau hain nabarmena ez izan.
- b. pH 1-ari dagokionez, disolbagarritasuna asko jaisten da diklofenakoa koordinatuta dagoenean, baina $\text{Log } P_{o/w}$ -ri erreparatuz, ikus daiteke honek igoera nahiko nabarmen bat izan duela.

Beraz, guztia laburbiltzeko esan daiteke, diklofenakoaren bioerabilgarritasuna hobetzeko estrategia bat izan daitekeela hau Europio metalera koordinatzea. Datuen analisirako metodoei dagokionez, nahiz eta esperotakoa ez izan, ikusi da, orokorrean SLR metodoaren bitartez emaitza hobeak lortu direla eta metodoaren balidazioa egitean, hau metodo hobe delako emaitza baliagarriak lortzeko. Hala ere, ikusi da, MLR bitartez kalibratu zuzenak hobeak direla. Beraz, arazoak S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ -ren neurketan daude, eta hori argi ikusi da estandarren eta S_{eff} eta $\text{Log } P_{o/w}$ -ren neurketetako espektroak alderatuta.

Azkenik, ikusi den moduan, denbora eta tenperatura kontuan eduki beharreko faktoreak direla ikusi da neurketak egiterako garaian. Ikerlan honetan zehar, ez zaio denborari behar besteko garrantzia eman. Honen ondorioz, eta denborak emaitzetan duen eragina ikusita, etorkizun batean ildo honetako azterketa gehigarrietan denbora kontrolatzeko metodo desberdinak bilatu

beharko dira, emaitzek honen eraginik ez izateko. Baita ere, oktanolaren interferentzia saihesteko metodoren bat bilatzea komeniko litzateke, horrela $\text{Log } P_{o/w}$ -ren balioak hobetzeko.

CONCLUSIONS

The synthesis, characterisation and determination of the S_{eff} and $\text{Log } P_{o/w}$ values of the coordination compound europium diclofenac have been carried out using different methods of data analysis at physiologically relevant pH and body temperature.

The most relevant results and conclusions of this study are:

1. Temperature influences absorbance because increased temperature increases absorbance. Therefore, it will be important to control the temperature and keep it constant during measurements.
2. The absorbance will vary with time. As seen in the kinetics, in a pH 1 environment, time will play an important role in the absorbance, as the absorbance will decrease with time. Time will also influence the dissolution of diclofenac at pH 7, but not as much as at pH 1. However, time will have no significant effect on absorbance when coordinating the diclofenac with europium in a pH 7 environment. Therefore, it is important to have a controlled time on the measurements, especially when measuring $\text{log } P_{o/w}$, as the solutions are measured at 24 h.
3. Increasing the number of measurements and the number of replicates gives more accurate results. This can be checked by comparing the calibration lines for diclofenac and diclofenac europium. In addition, by increasing the data, some data can be discarded to validate the method.
4. S_{eff} and $\text{Log } P_{o/w}$ values were calculated using two different data analysis methods, SLR and MLR. The results show that:
 - a. The MLR method gave in all cases a higher value of the regression coefficient. This allows accurate and valuable data to be obtained from the calibration line.
 - b. The differences between the theoretical and experimental concentration in the method validation are more representative with the SLR method. Therefore, the calibration equation

obtained with the SLR method gives better results than with the MLR method.

- c. In general, looking at the S_{eff} values, it can be stated that higher values have been obtained by the SLR method. On the contrary, in the case of $\log P_{\text{o/w}}$, by MLR, some values could not be obtained because most of the concentrations obtained from the results of the measurements of the solutions that have spent 24 h in the waterwheel are negative. Therefore, in this case it will be difficult to compare the two methods. However, comparing these few values obtained by MLR with those obtained by the SLR method, it can be stated that, although the pH 7 values obtained were higher than pH 1 by the MLR method.
5. If the S_{eff} and $\log P_{\text{o/w}}$ values are analysed independently of the different data analysis methods, the following can be observed:
- a. a. In the case of pH 7, the increase in solubility and permeability is notable with the coordination of diclofenac with europium, although the latter is not as marked.
 - b. b. In the case of pH 1, solubility decreases considerably when diclofenac is coordinated, but looking at $\log P_{\text{o/w}}$, there is a considerable increase.

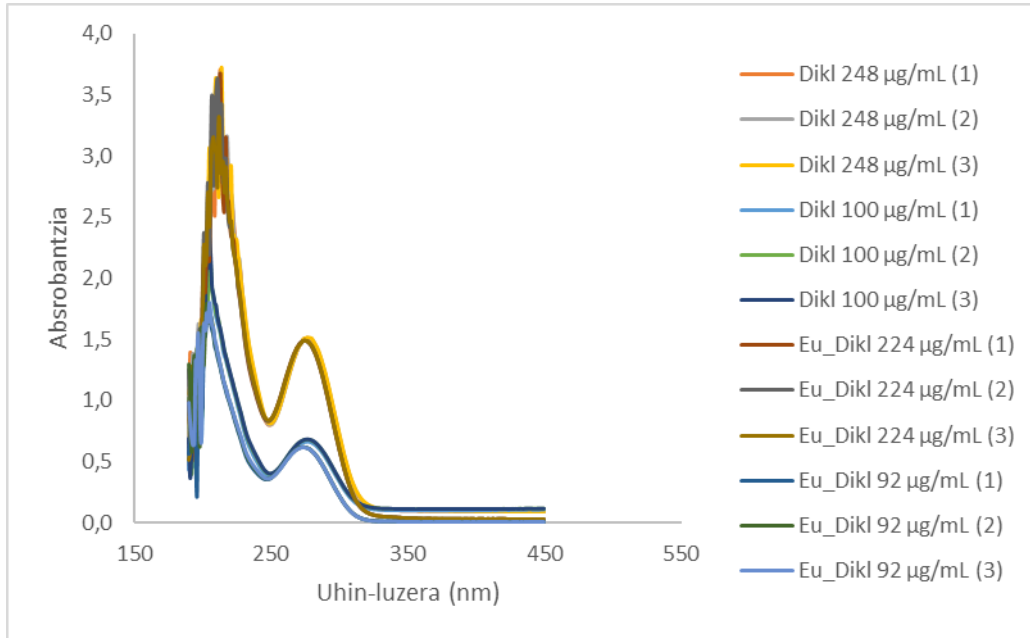
So, it can be summarised by saying that coordination with europium metal can be a strategy to improve the bioavailability of diclofenac. Regarding the data analysis methods, although not expected, it is observed that, in general, better results have been obtained by the SLR method and that this is a better method to obtain valid results in its validation. However, it has been found that the MLR calibrates are better than the correct ones. Therefore, the problems are in the measurement of S_{eff} and $\log P_{\text{o/w}}$, which has been clearly seen comparing the spectrums of standard and S_{eff} and $\log P_{\text{o/w}}$ measurements.

Finally, as we have seen, time and temperature are factors to be taken into account when taking measurements. In this study, time has not been given sufficient importance. Consequently, and given the influence of time on the results, in the future it will be necessary to look for different methods of time control in further studies in this line, so that the results are not affected. It would also be useful to find some method to avoid octanol interference, thus improving $\log P_{\text{o/w}}$ values.

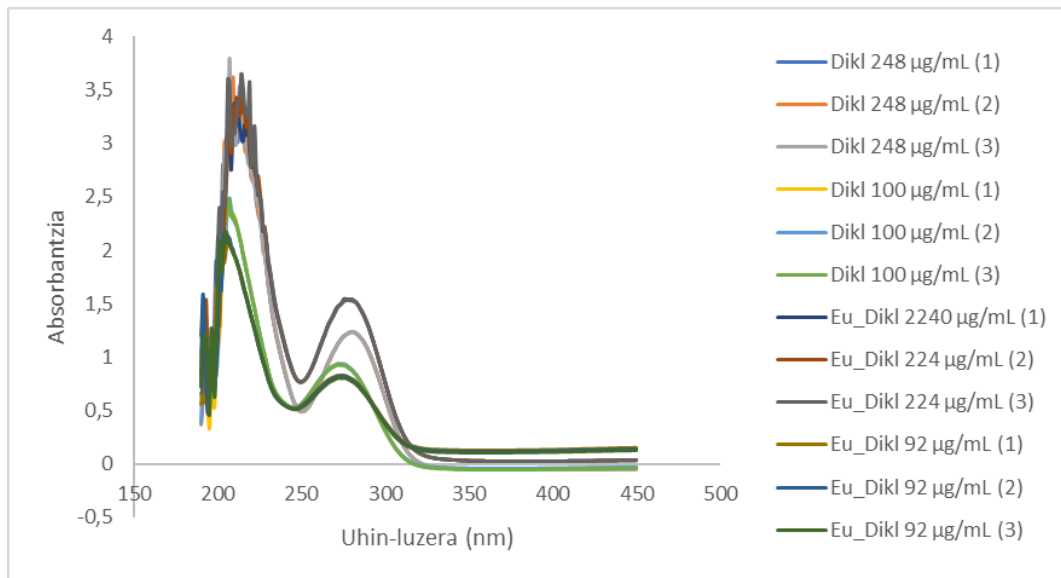
6. ERANSKINAK

LOG P_{o/w} LORPENEAN LORTUTAKO ESPEKTROAK

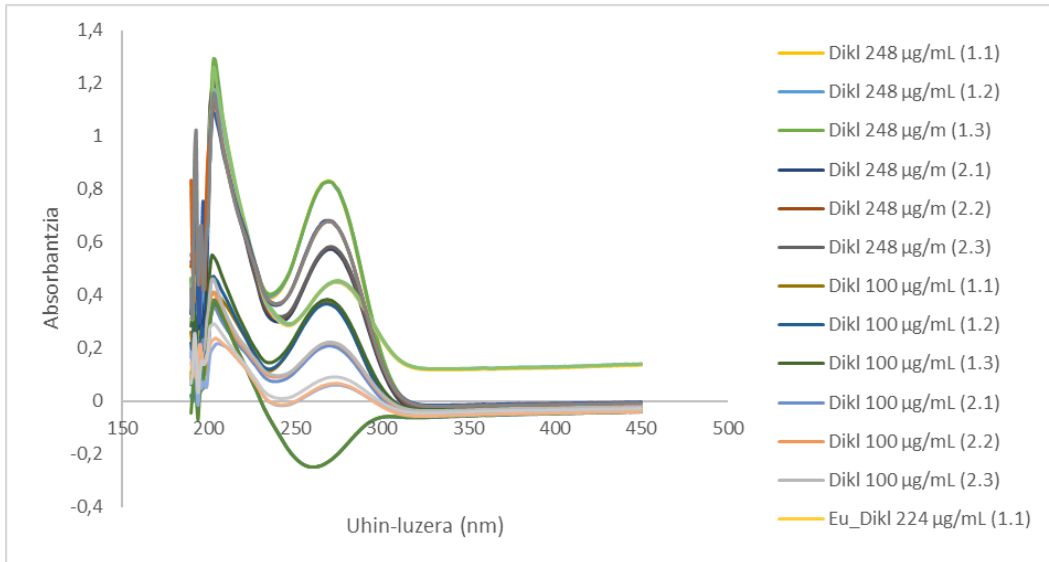
pH 7



38. irudia: pH 7-an hasierako disoluzioen espektroak $t=0$ denean. (x)-k neurketa desberdinak adierazten ditu.

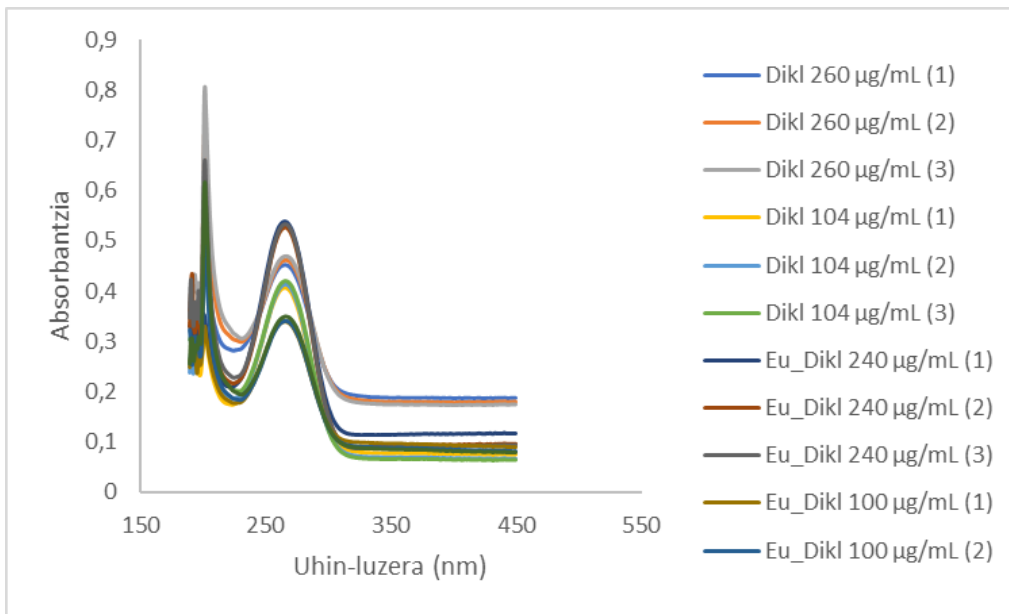


39. irudia: pH 7-an hasierako disoluzioen espektroak $t=24$ h denean. (x)-k neurketa desberdinak adierazten ditu.

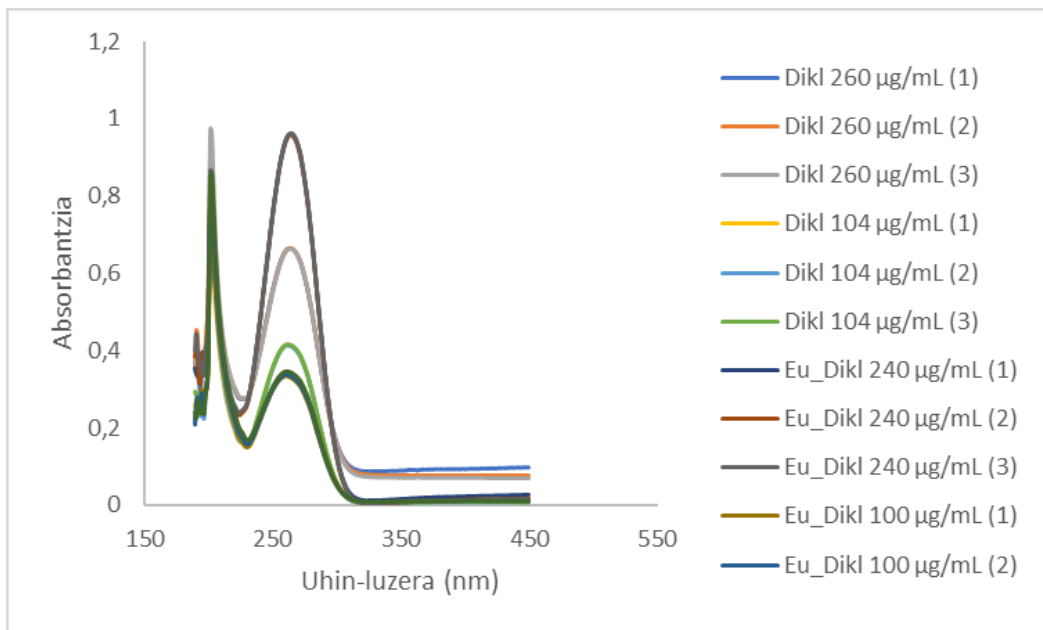


40. irudia: pH 7-an noriako disoluzioen espektroak. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

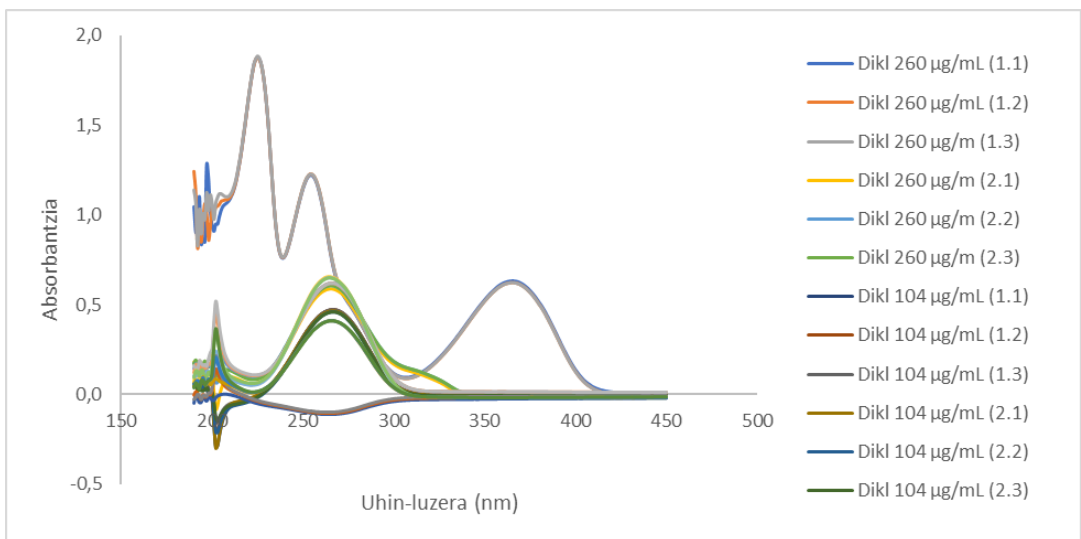
pH 1



41. irudia: pH 1-ean hasierako disoluzioen espektroak t=0 denean. (x)-k neurketa desberdinak adierazten ditu.



42. irudia: pH 1-ean hasierako disoluzioen espektroak $t=24$ h denean. (x)-k neurketa desberdinak adierazten ditu.



43. irudia: pH 1-ean noriako disoluzioen espektroak. (x,y)-k erreplika (x) eta neurketa (y) desberdinak adierazten ditu.

7. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(6), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>
- ² Schoenwald, R. D. (Ed.). (2002). Pharmacokinetics in Drug Discovery and development. Boca Raton, Florida: CRC Press, 3-4. <https://doi.org/10.1201/9781420010084>
- ³ Gleichmann, N. (2020). ¿Qué es ADME? *Redes de tecnología - La comunidad científica en línea*. <https://www.news-courier.com/drug-discovery/articles/what-is-adme-336683> helbidetik eskuratua
- ⁴ Le, J. (2020.eko Urria). *Manual MSD*. <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/biodisponibilidad-de-los-f%C3%A1rmacos> helbidetik eskuratua
- ⁵ Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413-420.
- ⁶ Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>
- ⁷ M'bitsi-Ibouily, G., Marimuthu, T., Kumar, P., Choonara, Y., Kondiah, P., & Pillay, V. (2017). Outlook on the Application of Metal-Liganded Bioactives for Stimuli-Responsive Release. *Molecules*, 22(12), 1–2. <https://doi.org/10.3390/molecules22122065>
- ⁸ Zijian Guo, Peter J. Sandler (1999). Metals in Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, 38 (11), 1512-1531. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990601\)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990601)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y)
- ⁹ Kubinyi, H. (2003). Drug research: myths, hype and reality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(8), 665–668. <https://doi.org/10.1038/nrd1156>

- ¹⁰ Refat, M. S., Mohamed, G. G., Ibrahim, M. Y. S., Killa, H. M. A., & Fetooh, H. (2013). Synthesis and Characterization of Coordination Behavior of Diclofenac Sodium Drug Toward Hg (II), Pb (II), and Sn(II) Metal Ions: Chelation Effect on Their Thermal Stability and Biological Activity. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 44(2), 161–170. <https://doi.org/10.1080/15533174.2012.752009>
- ¹¹ Kumar, S., Sharma, R. P., Venugopalan, P., Ferretti, V., Perontsis, S., & Psomas, G. (2018). Copper(II) diclofenac complexes: Synthesis, structural studies and interaction with albumins and calf-thymus DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 187, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.07.009>
- ¹² Kovala-Demertzi, D. (2000). Transition metal complexes of diclofenac with potentially interesting anti-inflammatory activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79(1–4), 153–157. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(99\)00175-0](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(99)00175-0)
- ¹³ Tissue, B. M. (2002). Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy. *Characterization of Materials*, 2(1), 688–698. Blacksburg, Virginia. <https://doi.org/10.1002/0471266965.com059>
- ¹⁴ Marill, K. A. (2004). *Advanced Statistics: Linear Regression, Part I: Simple Linear Regression*. *Academic Emergency Medicine*, 11(1), 87–93. <https://doi.org/10.1197/j.aem.2003.09.005>
- ¹⁵ Tranmer, M., Murphy, J., Elliot, M., and Pampaka, M. (2020) Multiple Linear Regression (2. edizioa); Cathie Marsh Institute Working Paper 2020-01. <https://hummedia.manchester.ac.uk/institutes/cmist/archive-publications/working-papers/2020/2020-1-multiple-linear-regression.pdf>
- ¹⁶ Angelici, R. J. (1979). *Técnica y síntesis en química inorgánica* (1. ed.). Reverté. ISBN: 84-291-7018-9