



Gradu Amaierako Lana
Kimikako Gradua

KLINIKOKI ONARTUTA DAUDEN FOTOSENTIKORTZAILEEN KARAKTERIZAZIO FOTOFISIKOA, MINBIZIAREN AURKAKO TERAPIA FOTODINAMIKOAN APLIKATZEKO

Egilea:

AMAIA GÓMEZ RUIZ DE ARBULO

Zuzendariak:

VIRGINIA MÁRTINEZ MÁRTINEZ

AINHOA OLIDEN SÁNCHEZ

GRADU AMAIERAKO LANA KIMIKAKO GRADUA

KLINIKOKI ONARTUTA DAUDEN FOTOSENTIKORTZAILEEN KARAKTERIZAZIO FOTOFISIKOAK, MINBIZIAREN AURKAKO TERAPIA FOTODINAMIKOAN APLIKATZEKO

AMAIA GÓMEZ RUIZ DE ARBULOK AURKEZTUTAKO MEMORIA

MATRIKULAZIO- ETA DEFENTSA-DATA: 2023ko ekainaren 23an

ZUZENDARIAK: Virginia Martínez Martínez
eta Ainhoa Oliden Sánchez

SAILA: Kimika Fisikoa

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
1.1 TERAPIA FOTODINAMIKOA (TFD)	3
1.2 FOTOSENTIKORTZAILEAK	5
1.2.1 Lehenengo belaunaldiko FSak	7
1.2.2 Bigarren belaunaldiko PSak (Klorinak)	8
1.2.3 Hirugarren belaunaldiko FSak	9
1.3 LAN HONETAN AZTERTIKO DIREN FS-AK	10
1.3.1 Porfirinak	12
1.3.2 Klorinak	12
1.4 HELBURUAK	14
2 OINARRI TEORIKOAK	15
2.1 PROZESU FOTOFISIKO UNIMOLEKULARRAK	15
2.1.1 XURGAPENA	15
2.1.2 DESAKTIBAZIO PROZESUAK	17
2.2 SINGLETE OXIGENOA	22
2.2.1 OXIGENO SINGLETEAREN ETEKIN KUANTIKOA	23
2.3 FS-EN ERAGINKORTASUNA TFD-AN APLIKATZEKO	24
2.4 MOLEKULEN ARTEKO AGREGAZIOA	25
3 PROZEDURA ESPERIMENTALA	26
3.1 LAGINEN PRESTAKETA	26
3.2 TEKNIKA ESPERIMENTALAK	27
3.2.1 ULTRAMORE (UM)-IKUSKOR (Ikus) ESPEKTROSKOPIA	28
3.2.2 FLUORESZENTZIAREN IGORPENA, ETEKIN KUANTIKOA ETA BIZITZA DENBORA	28
3.2.3 SINGLETE OXIGENO IGORPENAREN NEURKETAK	29
4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA	31
4.1 PORFIRINEN EZAUGARRI FOTOFISIKOAK	31
4.2 KLORINEN EZAUGARRI FOTOFISIKOAK	35
4.3 SINGLETE OXIGENOAREN ETEKIN KUANTIKOA	40
4.4 TFD APLIKATZEKO ERAGINKORTASUNA	42
5 ONDORIOAK	44
6 BIBLIOGRAFIA	46

1 SARRERA

Gaur egun, mundu mailan, minbizia oso gaixotasun kezkarria da. Izan ere, jatorri ezberdinetatik datorren gaixotasun multzoa da. Giza gorputzean, normalean, zelula somatikoek mitosiaren bitartez bikoizten dira eta guztiz berdina den beste zelula bat sortzen dute. Aldiz, kasu batzuetan arrazoi genetiko edo kanpo faktoreen ondorioz bikoizketa horretan DNAan mutazio bat ematen da. Gehienetan, gorputza akats horiek zuzentzeko gai da, horretarako dituen mekanismoen bitartez. Zenbait kasuetan, ordea, zelula horiek kontrolik gabe bikoizten dira eta tumoreak sortzen dituzte.^{1,2} Horiek, gorputzeko atal ezberdinetan haz daitezke, eta minbizia eragiten dute. Gainera, gaixotasuna oso larria bilakatzen da zelula horiek gorputzean barreiatu eta metastasia eragiten dutenean.³

Datuetan oinarrituz, 2020an, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) agentziak 18,1 milioi minbizi kasu berri diagnostikatu zirela dio (azaleko minbiziak kontuan izan gabe). Are gehiago, zenbaki horiek hurrengo bi hamarkadetan igoko direla aurreikusi du, hain zuzen ere, 2040. urterako kasu berrien %49,2ko hazkuntza aurreikusten da. Areagotze hori biztanleriaren hazkundearekin, populazioaren zahartzearen eta beste zenbait arrisku-faktoreen (tabakoa, alkohola, kutsadura eta gizentasuna, kasu) ondorioa da. Agerian da, minbizia munduko heriotza-kausa nagusietako bat dela. IARCEk estimatutako datuen arabera 2020. urtean 9,9 milioi heriotza inguru egon ziren, eta intzidentziaren joera berdina espero da, 2040. urtean 16 milioi heriotza baino gehiago espero baitira.⁴

Europar 2022. urtean, minbizia saihesteko plan bat aurrera eramanean, gaixotasun kasuen %40a saihegarriak direla frogatu baita. Plan horren bitartez gizartean ardura sortu nahi izan dute bizi-ohituren inguruan, aurretik aipatutako arrisku-faktoreak ekiditeko eta bizi-ohitura osasuntsua sustatzeko.⁵ Horretaz gain, egoera arduragarri horren aurrean hainbat ikertzaile eta herrialdeek gaitz horren inguruan ikertzen dute, minbizia pairatzen duten gaixoei biziraupen eta bizi-kalitate hobetua eskaini ahal izateko.

Egun, minbizia tratatzeko erabiltzen diren metodo ohikoenak dira kirurgia, kimioterapia eta erradioterapia. Azken biak, farmako edo iturri erradioaktibo baten

bitartez, hurrenez hurren, zelula kantzerigenoak hiltzen dituzte. Aldi berean, zoritxarrez, zelula osasuntsuen bikoizketa prozesuan eragina dute, prozesu hori motelduz edo ekidinez. Horren ondorioz, organoen funtzionamendu normala galtzen da eta horrek albo ondorio larriak sor ditzake. Beraz, ikusi da tratamendu inbaditzaileak direla. Bestalde, beste erronka nagusi bat gaixoak tratamenduarekiko garatzen duen erresistentzia da. Tratamenduaren ondoren zelula kantzerigenoen arrastoak geratzen zaizkien gaixoetan gertatzen da, izan ere, zelula horiek tratamenduan erabilitako farmakoekiko erresistentzia garatzen dute.⁶

Faktore horiek guztien ondorioz, ikertzaileek oraindik minbizia sendatzeari buruz hitz egin ezin duten arren, eraginkortasun handiagoa eta, albo eragin eta toxikotasun minimoak erakusten duen tratamendu berri bat aurkitzeko egiten ari diren ahaleginak handiak dira. Horien artean, adibidez, gaur egun, immunoterapia metodoa oso erabilia da.⁷ Beste adibide bat, Terapia Fotodinamikoa (TFD) da. Teknika hori klinikoki onartuta dago eta hainbat minbizi ezberdinetan erabiltzen da.² Izan ere, metodo horrek aurretik aipatutako lehenengo tratamenduekiko hurrengo abantailak erakutsi ditu:

- Minbizia tratatzeko erabiltzen diren lehenengo tratamenduak baino teknika selektiboagoa da zelula kantzerigenoekiko, beraz, erlatiboki teknika ez inbaditzailea da.
- Kirurgia aplikatu ezin den gorputzeko guneetan aplikatu daiteke.
- Adinekoak diren pazienteak, tratamendu aitzindarietara ahulagoak izan ahal direnak, terapia horren bitartez tratatu daitezke.
- TFDan eabiltzen diren fotosentikortzaileak bakarrik (argiaren presentzian ez badaude) ez dira toxikoak giza zelulentzat. Horien kanporaketa denbora egun edo hilabetekoa dela kontuan izanda, denbora horretan zehar argiaren presentzian ez badaude, ez dute kalterik sortuko organoetan. Ondorioz, tratamendu horrek sortzen dituen albo ondorioak kimioterapiak edo erradioterapiak eragiten dituen baino gutxiago dira. Gainera, larritasun gutxiagokoak dira; adibidez, ehunak hobeto kontserbatzen dira eta min gutxiago egiten du.

Gainera, nagusiki onkologian erabiltzen den arren, erabiltzen da dermatologian, oftalmologian eta gaixotasun kardiobaskularrak tratatzeko.^{8,9} Erakutsi dituen

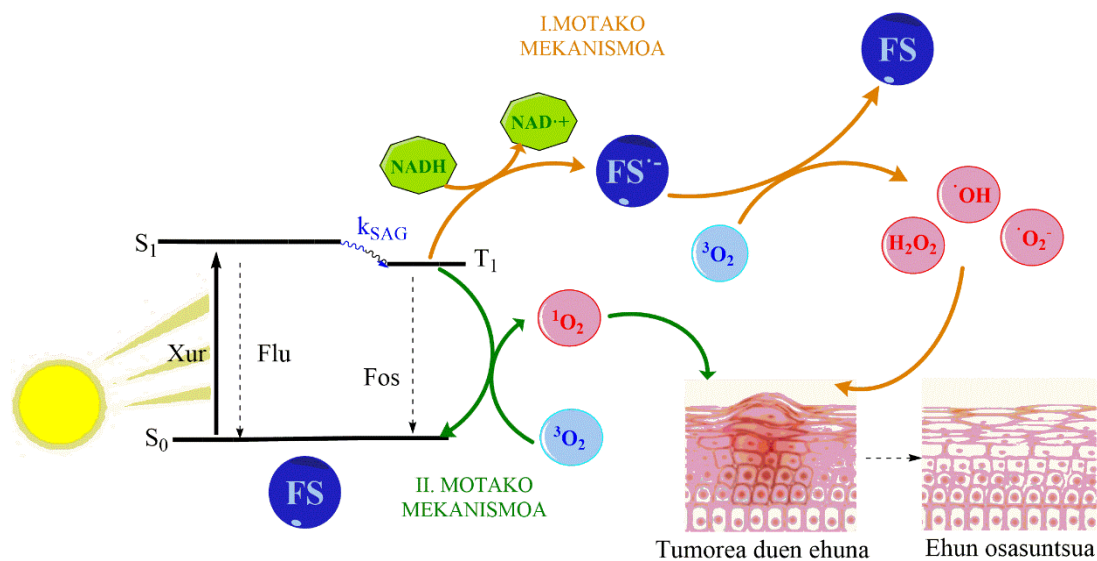
aplikazio eta abantailen ondorioz, ikerketa prozesuan dagoen teknika da, erabiltzen diren fotosentikortzaileak eta argi iturriak hobetzea du helburu.

1.1 TERAPIA FOTODINAMIKOA (TFD)

Terapia Fotodinamikoa da gorputzerako toxikoak ez diren hiru ezinbesteko osagaiez baliatuz (argia, fotosentikortzailea (FS) eta oxigeno molekularra), zelula kantzerigenoentzat toxikoak diren espezieak (singlete oxigenoa ($^1\text{O}_2$) edo ROS espezie oxidatzaileak) sortzen dituen tratamendua.

Tratamendu hori FSen propietate fotofisikoetan oinarritzen da. Batez ere, molekula horien gaitasun fototoxikoan (GF) eta dirdiran (D). Alde batetik, GFk molekula horiek espezie oxidatzaileak sortzeko duten efizientzia adierazten du. Beste modu batean esanda, FSek zelulak oxidatzeko duten ahalmena kuantifikatzen du. Bestalde, horien dirdira oso baliagarria da molekula horiek jarraitzeko eta tumorean kokatuta daudela ziurtatzeko, hau da, ituraketa kontrolatzeko.

Tratamenduak hurrengo mekanismoa jarraitzen du (1. Irudia); FSa eta argia (gorputzerako ez toxikoak), tumorea dagoen gunean sartzen dira. Zelula kantzerigenoekiko toxikoak diren substantziak modu eraginkor batean lortzeko, fotosentikortzailea era egoki batean aktibatu behar da. Horren ondorioz, molekularen propietate fotofisikoetan oinarrituz, xurgapen koefiziente (ϵ) altua erakusten duen uhin luzera zehatz bat duen argi iturri baten bidez irradiatu behar da molekula. Horrela, FS molekula kitzikatu egiten da, eta oinarrizko egoetatik (S_0) egoera kitzikatura (singlete egoera, S_1 , S_2 , ...) igarotzen da. Horretaz gain, FSaren S_1 egoera sistemen arteko gurutzaketa probabilitate altua (k_{SAG}) erakutsi behar du, lehenengo triplete egoera (T_1) populatzeko (2. atalean sakonago azaltzen da). Izan ere, FSa egoera maila horretan aurkitzea ezinbestekoa da toxikoak diren substantziak sortzeko. Ondoren, FSak, T_1 egoeran egonik eta oxigeno molekulen presentzian, zelulak bi mekanismo ezberdinen bitartez oxidatu ditzake; alde batetik, erradikalak edo ioi erradikalak sortuz (I. mekanismoa, ikus 1. Irudia), eta bestetik, singlete oxigenoa ($^1\text{O}_2$) lortuz, (II.mekanismoa, ikus 1. Irudia).



1. Irudia-Terapia fotodinamikoaren funtzionamendua azaltzen duten bi mekanismo posibleen eskema. Orokorrean, ikusten da FSa argi iturri batez irradiatu behar dela, baimendutako trantsizio batera FS(S₁) kitzikatzeko. Aktibatutako FSak duen sistemen arteko gurutzaketa desaktibazio prozesuen probabilitatearen (k_{SAG}) ondorioz, S₁ → T₁ trantsizioa ematen da. Azkenik, FS(T₁) erlaxatzeko bi aukera erakusten ditu. Alde batetik, **I. mekanismoa** (laranja), FS(T₁), substantzia erreduzitzailea (NADH, adibidez) eta oxigeno molekularra (O₂) behar ditu, erradikalen kate-erreakzioa abiarazteko eta honela, tumore zelulak hiltzeko. Aldiz, **II. mekanismoa** (berdea), FS(T₁) eta oxigeno molekularra erreakzionatuz, singlete oxigeno (¹O₂) espeziea lortzen da, zelula kantzerigenoen oxidatzaile gisa jokatzen duena.

I. motako mekanismoan (FS(T₁))ak substantzia erreduzitzaile baten presentzian, adibidez, nikotinamida adenina dinukleotidoak (NADH), elektroiti bat berenganatzen du eta FSaren anioi erradikal bat lortzen da (FS^{•-}). Espezie horrek gorputzean disolbatuta daukagun oxigenoarekin talka egitean, bi espezieen arteko elektroiti transferentzia emango da, eta oxigeno espezie erradikalak lortuko dira. Nagusiki superoxido anioia sortzen da, eta espezie hori hainbat oxigeno espezie erradikalen aitzindari izango da. Modu horretan, erradikal-kate erreakzioen bitartez zelula kantzerigenoak oxidatu eta hiltzen dira.¹⁰ Bestetik, II. motako mekanismoan (Ikus 1. Irudia) FSak ere tumore zelulen zeharkako-oxidazioa ahalbidetzen du. Kitzikapen energia FS (T₁)tik oxigeno molekularrera (³O₂) igarotzen da, eta hori oxidatuz singlete oxigenoa (¹O₂) lortzen da (2.2 atalean prozesu hori gehiago sakontzen da). Espezie oso elektrofilikoa denez, eragin kaltegarriak sortzen ditu mintzetan, proteinetan eta DNAn. Kasu horretan ere, FS eta oxigeno molekularren artean kontaktu zuzena

beharrezkoa da oxidazio-erreakzioa eman ahal izateko. Hala ere, $^1\text{O}_2$ -aren erreaktibitate handia eta erdibizitza laburraren (disoluzioan $4 \mu\text{s} - 60 \text{ ms}$ disolbatzailearen arabera)¹¹ ondorioz, erreakzio gunetik oso gertu dauden biomolekuletan bakarrik izango du eragina. Ikertzaile talde askok frogatu dute, TFDan bi mekanismoak aldi berean gertatzen direla, baina, ikusi da II motako mekanismoa I mekanismoaren aurrean gailentzen dela, fotosentikortzailea kontzentrazio handietan edo tumorea hipoxia egoeran ez dagoen heinean. Ondorioz, lan honetan II mekanismoan oinarrituko gara bakarrik FSen eraginkortasuna aztertzeko; hau da, singlete oxigeno espeziea sortzeko efizientzia neurtuko da, oxigenoaren espezie erradikalen sorrera alde batera utzita.

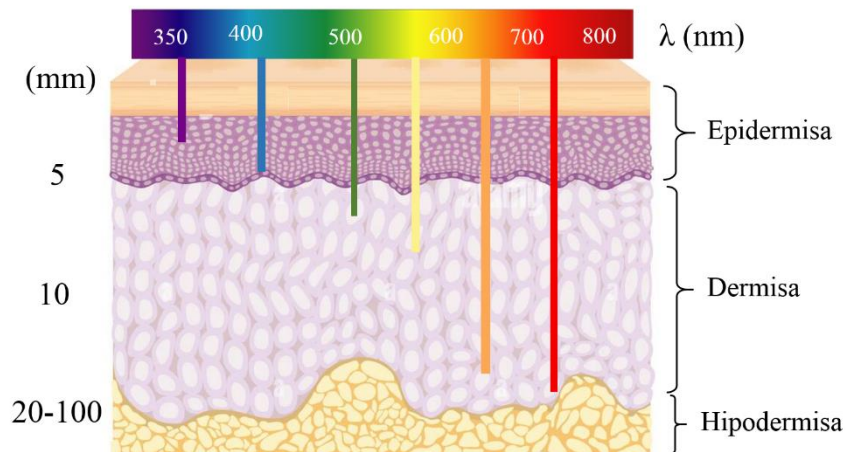
Hala ere, tumore askotan hipoxia edo anoxia guneak agertzen dira. Hipoxia kasuetan I mekanismoa nagusitzen dela aztertu da. Bestalde, anoxia guneetan, hau da, disolbatutako oxigenorik ez dagoenean FSak gehiegizko energia zuzenean biomolekulara transferitzen duela ikusi da, biomolekula zuzenean oxidatuz.^{6,9,10,12}

1.2 FOTOSENTIKORTZAILEAK

Esan bezala, fotosentikortzaileak terapia fotodinamikorako ezinbestekoak dira. Minbizia tratatzeko erabiltzen diren fotosentikortzaile gehienak tetrapirrol hezurduran oinarritzen dira, eta hemoglobinan dagoen protoporfirina konposatuaren egituraren oso antzekoa da.¹³ Oinarrizko hezurdura gainean funtzio taldeak eranstean edo lotura aldaketak egitean propietate ezberdineko FSak lortu daitezke horien ezaugarri kimiko-fisikoak hobetzeko. Hala ere, terapian erabili ahal izateko ondorengo ezaugarriak bete behar dituzte:

- Kimikoki purua izan behar da, eta horren konposizio kimiko zehatza ezaguna izan behar da.
- Ezin da toxikoa izan (argiaren presentzian izan ezik). Gainera, fotoegonkorra izan behar da, argiaren irradiazioaren pean ez degradatzeko. Horrez gain, termoegonkorra izan behar da, behintzat gorputzeko eta inguruko tenperaturarekiko.
- Ahal den neurrian, selektiboa izan behar da tumorearen zelula kantzerigenoekiko.

- Gorputzetik azkar kanporatzeko gaitasuna izan behar du, toxikotasun sistemikoa ekiditeko. Hau da, farmakoa gorputzaren zonalde zehatz batean xurgatuta ez gelditzeko, izan ere, zonalde hori eguzkiaren ondorioz irradiatzean, FSa kitzikatu eta inguruko zelulak kaltetuko ditu.
- Singlete oxigenoaren sorreraren etekin kuantikoa handia ($\phi_{\Delta} > 0,5$)¹⁴ izan behar da. Horretarako, FS(S₁) sistemen arteko gurutzaketa probabilitate nabarmena (k_{SAG}) erakutsi behar du. Gainera, FS(T₁)-ren erdibizitza denbora luzea izan behar da eta FS-FS molekulen arteko talken proportzio txikia erakutsi behar dute, FSa oxigeno molekularrarekin elkartzen eta talka egiten dutela ziurtatzeko (2.2 atalean sakontzen da).
- Absortzio-koefiziente molarra altua izan behar da espektro elektromagnetikoaren 650-850 nm zonaldean (Ikus 2. irudia). Izan ere, eremu horretan barne organismoen eta ehunen arteko interferentziak minimizatzen dira eta barneratze sakonera hobetzen da.^{13,15,16}

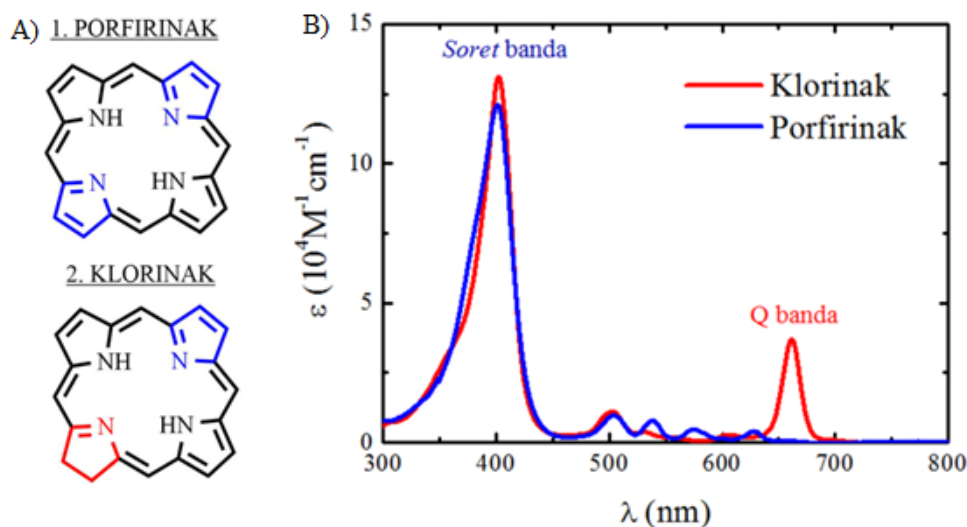


2. Irudia- Argiaren uhin-luzeraren eta azaleko barneratzearen arteko erlazioa. Leiho terapeutiko optimoa 650-850 nm tartean ageri da.

Orokorrean, FSak bi sailkapen mota ezberdinetan klasifikatu daitezke. Alde batetik, horien garapen historiko eta ikuspuntu kontzeptualen arabera hiru belaunaldietan sailkatzen dira; eta bestalde, egitura molekularretan oinarrituz, familia ezberdinetan ere banatzen dira. Familien artean, oinarritzko hiru egitura molekularren arabera sailkatzen dira; porfirinak (1. belaunaldiko familia), klorinak, zianinak eta bakterioklorinak (2. belaunaldiko familiak). Bestalde, bigarren belaunaldian beste

hainbat familiako koloratzaileak ikertuak izan dira aplikazio horretarako (esate baterako; *Methylen Blue* (MB), *Toludine Blue* eta *Rose Bengal*).^{2,12,17}

Lan honetan porfirinen eta klorinen familiako (Ikus 3A. irudia) fotosentikortzaile batzuk aztertuko dira. Familia horiek, lehenengo eta bigarren belaunaldiko familiak dira, hurrenez hurren. Beraz, familia horiek orokorrean gehiago azalduko dira, euren arteko FSen propietateak hobetzeko (aurreko baldintzak kontuan hartuta) egindako egitura aldaketak ulertzeko.



3. Irudia- A) Porfirina eta klorina familien oinarrizko egitura molekularrak. B) Familia bakoitzaren xurgapen espektroak.

1.2.1 Lehenengo belaunaldiko FSak

Lehenengo belaunaldiko fotosentikortzaileen artean hematoporfirina eta horren deribatuak daude, porfirinak. Hematoporfirina, tratamendu azidoaren bitartez (azido sulfurikoarekin) hemoglobinatik isolatutako espeziea da. FS horren deribatuak, tetrapirrol eraztuna dute oinarrizko hezurdura gisa (Ikus 3A. Irudia), eta deribatu bakoitza besteetatik desberdintzen dituen, selektibitatea eta ur-disolbagarritasuna hobetzeko helburuarekin agregatutako funtzio taldeak dira.

Lehenengo belaunaldiko FSak minbizi mota ezberdinak tratatzeko asko erabili dira, singlete oxigenoa sortzeko duten efizientziari esker. Hala ere, hainbat desabantaila erakusten dituzte. Alde batetik, 3B. Irudian agertzen den porfirinen absorbantzia espektroa aztertuz, ikusten da urdinean (*Soret* banda, espektroaren ~600-700 tartean

agertzen diren bandak) eta gorrian (Q banda, espektroaren ~380-400 tartean agertzen diren bandak) xurgatzen dutela. Aldiz, euren absorbantzia maximoa ikusgaiaren alde urdinean ageri da, horren ondorioz, espezie horiek disoluzioan kolore gorria erakusten dute. Zoritxarrez, uhin luzera horretako argi fotoiak ez dira oso sarkorrak azalean, beraz, ~5 mm-ko sakoneran dauden tumoreak tratatzeko gehienez erabili daitezke (Ikus 2. irudia). Izan ere, sakonera handiagoan dauden gaitzetan, energia hori duten fotoiak ez dira heltzen, eta ondorioz, FSa ezin da kitzikatu. Egia da, PpIX konposatuak sarkortasun handiagoko zonaldean, 630 nm-tan, argia xurgatzen duela (Ikus 2. eta 3B. irudiak), baina uhin luzera horretan absortzio-koefiziente molarra oso baxua da. Horrenbestez, molekulak xurgatutako fotoiak gutxi dira, S₁-ren populazio maila oso baxua izatea ekarriko duena eta ondorioz, ¹O₂ espeziearen sorrera ez eraginkorra. Bestalde, lehenengo belaunaldiko FSak ez dira zelula kantzerigenoekiko selektiboak, injektatzen den FS kantitatearen %1-3a bakarrik heltzen da tumorea dagoen gunera. Ondorioz, FSaren kantitate handiak ehun osasuntsuetara heltzen dira, eta gainera, horietan metatzeko joera handia dute. Orokorrean, familia horretako FSak, 2-3 hilabetez metatzen dira ehunetan. Beraz, terapia hori hartutako pazienteek denbora horretan zehar argiaren presentzia ekidin behar dute, zelula osasuntsuen funtzionamendu normala ez oztopatzeko, albo ondorioak ekarriz.

Azkenik, familia horretako farmako horien sintesian lortutako nahastetik farmako aktiboak isolatzea oso zaila da. Ondorioz, konposatu horiek purutasun txikikoak izaten dira.^{8,18}

1.2.2 Bigarren belaunaldiko PSak (Klorinak)

Bigarren belaunaldiko fotosentikortzaileei dagokienez, lehenengo FSen mugak aztertuz hobetutako fotosentikortzaileak dira. Aurretik aipatu den moduan, bigarren belaunaldiko FS familia ezberdinak ikertuak izan dira, baina, lan hau klorinen familian oinarrituko da. Izan ere, familia horren oinarritzko egitura, aurretik azaldutako porfirinen familiako egiturarekiko oso antzekoa da (Ikus 3A. Irudia).

Klorinak konposatu oso interesgarriak dira, klorofilaren, landareei kolore berdea ematen dien pigmentuaren deribatuak baitira. Beraz, naturatik (landareen klorofilatik transformazio kimiko selektibo bat eginez) zein artifizialki (tetrapirrol artifizialeatik abiatuz) eskuratu daitezke.¹⁴

3A. Irudian ikusten den moduan, porfirinak asetugabeko bi pirrol talde dituzten heinean, klorinek bi talde horietako bat asean daukate. Horrek molekularen simetria txikitzen du, molekula planarra izateari uzten diolako.¹⁹ Simetria falta horren ondorioz, xurgapen espektroan intentsitate handiagoko bi banda lortzen dira (horrek molekula horiek disoluzioan erakusten duten kolore berdea azaltzen du). Beraz, lotura bikoitza lotura bakuna bihurtzean, Q bandan absortzio-koefiziente handiagoa duten molekulak lortu dira ($5000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ baino altuagoa).

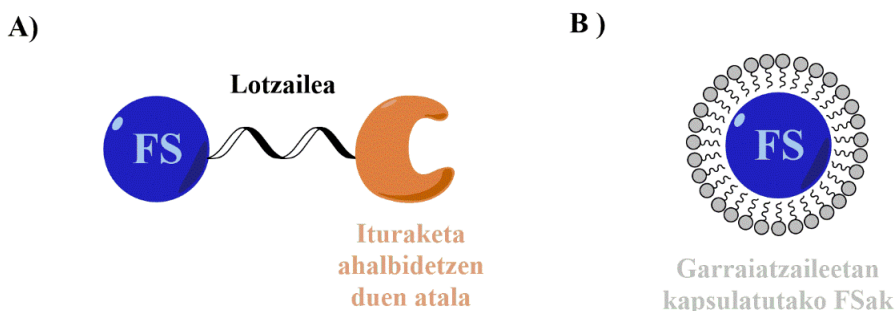
Modu horretan, 2-3 cm-ko sakoneran dauden tumoreak tratatzeko erabil daiteke, azalean sakontasun handiagotara barreiatu daitekeen argia erabil daitekeelako horiek kitzikatzeko modu eraginkorren (Ikus 2. Irudia). Are gehiago, hobekuntzak ere lortu dira horien purutasun, fotoegonkortasun eta ehunen selektibitatean. Hori guztia dela eta, FS horiek lehenengo belaunaldikoak baino eraginkorragoak dira TFDra; izan ere, argi sarkorragoen pean fotosentikortzailea aktibatuta, efektibotasun handiagoko tratamendu bat erdiesten da eta aplikazio zabalagoak dituzte.

Hala ere, aurrera pausu horiek ez dira nahikoak izan, FS horiek ere terapian erabiltzeko mugak baitituzte. Hala nola, molekula horiek ur-disolbagarritasun eskasa daukate, gorputzetik kanporatzeko zailak dira, *fotozuritze (photobleaching)* efektua erakusten dute eta tumoreekiko selektibitatea hobetu den arren, oraindik ez da nahikoa. Horregatik, ikertzaileek hamarkadak igaro dituzte bigarren belaunaldiko FS horiek hobetu eta garatu nahian, oinarrizko egitura molekularren inguruan talde funtzional ezberdinak ezarriz desabantailak minimizatzeo nahian.^{8,10,13,18}

1.2.3 Hirugarren belaunaldiko FSak

Bigarren belaunaldiko FSek dituzten mugak gaintzeko nahian, hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak garatu dira. Horien helburua da uretan disolbagarritasuna eta selektibitatea hobetzea. Aurreko belaunaldiko FS-en propietate fotofisiko egokiak dituzten konposatuetatik abiatuta, minbizi zelulekiko ituraketa (*targeting*) egokia erakusten duten partikula edo funtzio taldeekin elkartu dira (antigorputzekin, aminoazidoekin, peptidoekin, ikus 4A. irudia) edota garraiatzaileetan kapsulatu dira (liposometan, mizeletan edo nanopartikuletan, ikus 4B. irudia).

Elkartze bidez sortutako FSen helburu nagusia da zelula anormalen inguruan dauden zelula osasuntsuetan kalterik ez sortzea, eta aldi berean, zelula osagarri horiek tumoreekiko duten selektibitate handiagoa lortzea. Horretaz gain, egituran talde polarrak sartuz, sendagaiaren disolbagarritasuna uretan hobetu daiteke agregaturik sortu gabe, eta ondorioz, euren propietate fotofisikoak mantendu daitezke.^{2,10,16} FS familia hori oraindik garapen bidean dago, ez dira merkaturatu, baina TFD teknikaren itxaropena dira eta horregatik, hainbat ikerkuntza taldek ikertzen jarraitzen dute.



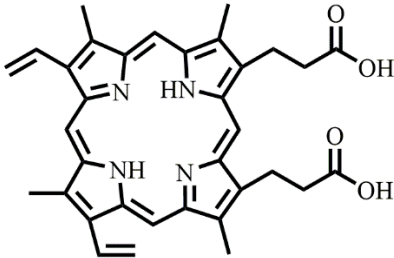
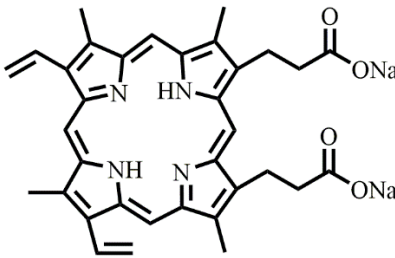
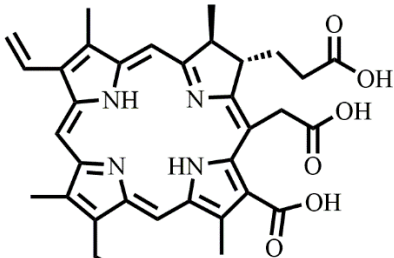
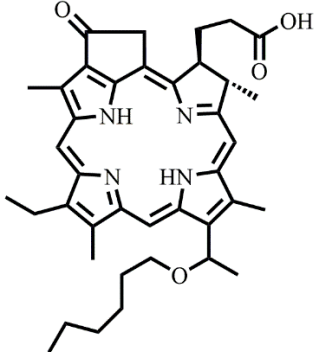
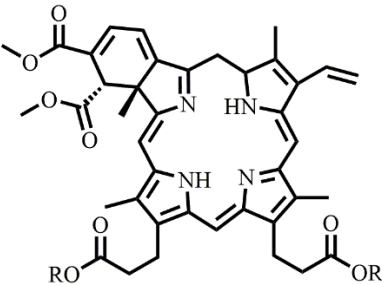
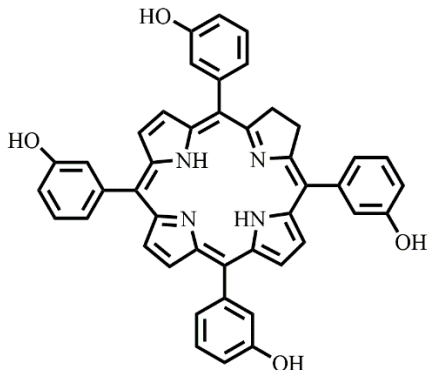
4. Irudia- Hirugarren belaunaldiko FSen egitura orokorra A) Ituraketa hobetzen duten biopartikula edo funtzio taldez lotutako FS-ak B) Garraiatzaileetan kapsulatutako FS-ak.

1.3 LAN HONETAN AZTERTIKO DIREN FS-AK

Lan honetan lehenengo eta bigarren belaunaldietako fotosentikortzaile batzuen (1. Taulako FSak) propietate fotofisikoak aztertu eta alderatuko dira. Hain zuzen ere, 3. irudian agertzen diren porfirina eta klorinen familiako FSak aztertuko dira. Horien artean, oinarritzko estrukturan egindako aldaketak molekulen propietate fotofisiko, eta ondorioz, singlete oxigenoaren etekin kuantikoan duten eragina ikertuko da.

Hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak ahalbidetzen duten ituraketa eta disolbagarritasuna oso interesgarriak izan arren, lehenengo bi belaunaldi horietan oinarritutako fotosentikortzaileetan oinarritzen dira. Horrenbestez, ezinbestekoa da hirugarren belaunaldiko FSak garatu aurretik, aurreko belaunaldietako fotosentikortzaileen propietate fotofisikoak optimizatzea, helburu den tratamendurako.

1. Taula- Lan honetan aztertuko diren fotosentikortzaileen, izen arrunta eta pisu molekularra (PM (g/mol)).

1. BELAUNALDIKO FS-AK (Porfirinen familiakoak)	
 <p style="text-align: center;">PM = 562.66</p> <p style="text-align: center;"><i>Protoporphyrin IX (PpIX) neutroa</i></p>	 <p style="text-align: center;">PM = 606.62</p> <p style="text-align: center;"><i>Protoporphyrin IX (PpIX) disodio gatza</i></p>
2. BELAUNALDIKO FS-AK (Klorinen familiakoak)	
 <p style="text-align: center;">PM = 596.7</p> <p style="text-align: center;"><i>Chlorin e6 (Ce6)</i></p>	 <p style="text-align: center;">PM = 636.82</p> <p style="text-align: center;"><i>Photochlor (HPPH)</i></p>
 <p style="text-align: center;">R: H edo CH₃ (1:1)</p> <p style="text-align: center;">PM = 719.79</p> <p style="text-align: center;"><i>Verteporfin (Vp)</i></p>	 <p style="text-align: center;">PM = 680.75</p> <p style="text-align: center;"><i>Temoporfin (mTHFK)</i></p>

1.3.1 Porfirinak

Lan honetan porfirina familiako *Protoporfirina IX* (PpIX) molekula aztertuko da. **Lehenengo belaunaldiko** FSa da, eta hemoglobina, C zitokroma eta beharrezko beste biomolekula batzuen osagarria da.

Sendagai horrek eraginkortasun handia erakusten du. Ondorioz, minbizia eta neoplasma kaltegarriak tratatzeko erabiltzen da. Hala ere, horren erabilerak muga batzuk ditu. Alde batetik, 3. irudian horren espektroa uhin luzera ezberdineko argiek duten azaleko sarkortasunarekin konparatuz, 5 mm-ko sarkortasuna duten argi iturriekin kitzikatzen da, beraz, bakarrik gainazaleko gaitzak tratatzeko erabil daiteke.

Bestetik, ur-disolbagarritasun eskasa eta horren monomeroen artean agregatzeko joera handia dauka, beraz, faktore horiek ituraketa zaildu eta farmakoaren eraginkortasuna murrizten dute, hurrenez hurren. Hori ekiditeko, azido 5-aminolebulinikoa (5-ALA) erabiltzen da profarmako gisa. Disolbagarria den azido hori zeluletan soberan sartzen da, beraz, 5-ALA molekulak horien artean elkarregiten dute, PpIX sortuz. Gainera, 5-ALA azidoak zelula kantzerigenoekiko duen afinitate handiagoaren ondorioz, tumoreetan metatzen dira.

Mugak dituen arren, garrantzi eta erabilera handiko farmakoa da. Horrenbestez, lan honetan molekula horren espezie neutroa (*azido 3,7,12,17-tetrametil-8,13-dibinil-2,18-porfinadipropionikoa*) zein disodio gatz (*disodio 3,7,12,17-tetrametil-8,13-dibinil-2,18-porfinadipropionato gatza*) moduan dagoen espeziea (Ikus 1. Taula) aztertuko dira. Molekula horren, desabantaila nagusiak diren disolbagarritasuna eta agregatuen formazioa horien artean aldaratzeko, eta bi espezieen propietate fotofisikoak mantentzen diren aztertuko.²⁰⁻²³

1.3.2 Klorinak

Klorina familiako farmakoak klinikoki onartuta daude eta **bigarren belaunaldiko** FSak dira. Horien artean, ezagunenak hurrengoak dira; *Chlorin e6*, *Photochlor*, *Verteporfin* eta *Temoporfin* dira. Aurrekoak bezala, xurgapen maximoa eremu ikusgaiko alde urdinean dute, 390-414 nm-tan. Hala ere, xurgapen banda nabarmena erakusten dute eremu ikusgaiko alde gorrian, 660-690 nm-ko tartean. Beraz, aurreko konposatuarekin konparatuz sakonera handiagoan dauden tumoreak tratatzeko erabiltzen dira.

1.3.2.1 Chlorin e6 (Ce6)

Chlorin e6-a (*azido (17S, 18S)-18-(2-karboxietil)-20-(karboximetil)-12-etenil-7-etil-3,8,13,17-tetrametil-17,18,22,23-tetrahidroporfirin-2-karboxilikoa*) (Ikus 1.Taula) TFDan aplikatu izan da, aurretik aipatu bezala horren aktibazioa espektro elektromagnetikoaren ikusgai-NIR zonaldean ematen delako, hein batean gorputzeko kanporatze onargarria duelako eta singlete oxigeno espeziea sortzeko duen eraginkortasunaren ondorioz. Farmako hori erabili da, batez ere, gibel, kolon, burmuin, biriki eta bular azal metastasia tratatzeko.⁶

Hala ere, mugak ere baditu ur-disolbagarritasun eta tumoreen selektibitateari dagokionez. Horren ondorioz, FS horretatik abiatuz hirugarren belaunaldiko FS ezberdinak garatzen ari dira, ezaugarri horiek hobetzeko helburuarekin.²⁴⁻²⁶

1.3.2.2 Fotoklor (HPPH)

Hurrengoa, Fotoklor (*2-(1-Hexiloxietil)-2-dibinil pirofeoforbidea*) (Ikus 1.Taula) konposatua da. TFDan erabiltzeko ezaugarri fotofisiko oso egokiak dituen arren, bere farmakozinetikak hainbat desabantaila erakusten ditu. Hasteko, konposatu oso lipofilikoa da, hori dela eta, gorputzean duen disolbagarritasuna oso txikia da. Gainera, farmako hori ez da erraz metabolizatzen, beraz, horren kanporatzea oso eraginkorra ez dela ikusi da. Tratamenduan sendagai hori hartu duten gaixo gehienek azaleko fotosentikortasuna nabaritu dute 21 egun igaro ostean; hots, zelula osasuntsuetarako denbora horretan zehar zitotoxikoa dela ikusi da.^{27,28} Horren ondorioz, gutxiago erabili da, batez ere, buru eta lepo, hestegorri eta biriki minbizietan.⁶

1.3.2.3 Verteporfina (Vp)

Klinikoki onartuta dagoen **bigarren belaunaldiko** Verteporfirina (*Azido trans-18-etenil-4,4a-dihidro-3,4-bis(metaoxikarbonil)-4a,8,14,19-tetrametil-23H,25H-benzo(b)porfina-9,13-dipropanoikoa / monometil esterra*) (Ikus 1.Taula) konposatua erabiltzen da, batez ere, buru, lepo, biriki, bular eta pankrea minbiziak tratatzeko.⁶

Horren egitura molekularra Ce6-aren antzekoa da, baina Ce6-ak ez bezala, benzoporfirin taldearen eratorria den eraztun monoazidoa du. Funtzio talde horrek xurgapenaren uhin-luzera NIR zonaldera lerratzen du, 690 nm-tara. Gainera, farmako hori gorputzetik ondo kanporatzen dela frogatuta da; izan ere, gaixoek 6 mg·kg⁻¹-eko dosia hartu ondoren, 2 egunetan zehar bakarrik behatzen da bere presentzia.^{6,28,29}

1.3.2.4 *Temoporfin* (mTHFK)

Temoporfina (*5,10,15,20-tetra(m-hidroxifenil)klorina*) bere izen komertzial, Foscan, moduan ezagunagoa da (Ikus 1.Taula). Farmako hori **bigarren belaunaldiko** fotosentikortzaileen artean potentzia handienetarikoa erakutsi duena izan da. 2001ean, Europan, klinikoki onartu zen buruko eta lepoko minbizi aringarrientzako. Gaur egun, horiez gain erabiltzen da, pankreas, burmuin, bular eta biriki minbizietan.⁶

Aurrekoen antzera, TFDrako efizientzia nabarmena erakusten duen arren, horren fotozinetikak muga batzuk ditu. Besteen moduan, konposatua hidrofobikoa da, horren ondorioz, terapian etanol eta propilen glikol disoluzio batean barneratzen da gorputzean. Gainera, selektibitate eta kanporaketa eskasak erakusten ditu, farmako horrekiko azaleko fotosentikortasunak bi aste inguru irauten du. Horren ondorioz, ikertzaile askok aztertu izan dute. Ikertzaileek, farmako horren propietate farmakozinetikoak hobetu nahian daude, molekularen talde funtzionalak aldatuz, baina, propietate fotofisikoak ahalik eta gutxien txikitzeko helburuarekin.^{28,30-32}

1.4 HELBURUAK

Horrenbestez, lanaren helburu nagusia da aurreko atalean aipatu diren lehenengo belaunaldiko zein bigarren belaunaldiko fotosentikortzaileak aztertzea, helburua den terapia fotodinamikoan aplikatzeko. Horretarako, tratamendu horretan eragina duten hurrengo ezaugarriak aztertuko dira:

- Farmako horiek gorputzean barneratzeko duten ur solugarritasuna (PBStan) aztertuko da.
- Polartasun ezberdineko disolbatzaileek (Azetona, MeOH eta PBS) farmako horien propietate fisiko kimikoetan duen eragina ikertuko da.
- MeOD-tan singlete oxigenoaren etekin kuantikoa determinatuko da.

Azkenik, lortutako datuetaz baliatuz, TFDan duten eraginkortasuna aztertzeko fotosentikortzaile bakoitzaren dirdira eta potentzial fototoxikoa kalkulatu dira, metanoletan. Honela, aipatutako fotosentikortzaileen ezaugarri kimiko, fotofisiko eta fototoxikoak determinatuko dira, etorkizunean hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak garatu ahal izateko.

2 OINARRI TEORIKOAK

Lanaren helburu nagusia fotosentikortzaileen ezaugarri fotofisikoak aztertzea denez, atal honetan molekula horien espektroskopia oinarri teoriko nagusiak azalduko dira.

Lehenengo azpiatalean (2.1 atala), fotosentikortzaileen ezaugarri fotofisiko unimolekular nagusiak aurkeztuko dira. Ondoren, xurgapena (2.1.1) azalduko da eta horren ondoren gerta daitezkeen desaktibazio prozesuak aztertuko dira (2.1.2); horien artean, fosforeszentzia fenomenoan (2.1.2.1 atala) sakonduko da bereziki. Bestalde, bigarren azpiatalean (2.2 atala), oxigeno molekularren talka bidezko desaktibazioa adieraziko da. Horrekin erlazionatuta, hurrengo azpiatalean FS-ek TFD erabiltzeko duten eraginkortasuna aztertuko da (2.3 atala). Azkenik, lan honetan eragina duten FS molekulen agregazioa aztertuko da (2.4 atala).

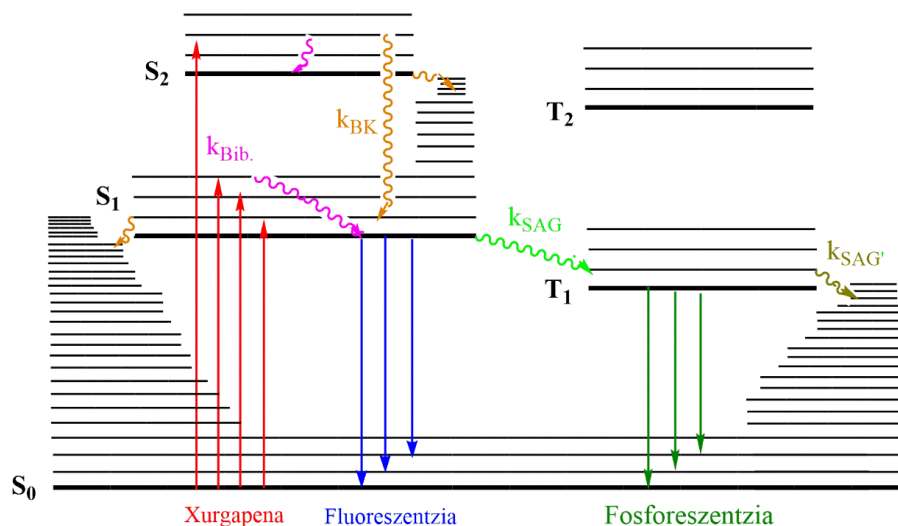
2.1 PROZESU FOTOFISIKO UNIMOLEKULARRAK

Oro har, prozesu fotofisikoak dira kitzikatutako molekula baten maila elektronikoen arteko trantsizioak azaltzen dituzten prozesuak. Horiek erradiazio ez ionizatzaile baten ondorioz gertatzen dira. Horien artean hurrengo prozesuak aurkitzen dira; kitzikapena, oinarrizko energia mailatik energia altuagoko maila elektronikotara gertatzen den trantsizioa; eta desaktibazio prozesuak, erradiatzaileak (err.) zein ez-erradiatzaileak (e-err.), hartzen dituzte bere baitan.

5. irudian agertzen den Jablonski diagraman, egoera gaseoso edo disoluzioan dagoen lagin baten prozesu fotofisiko nagusienak azaltzen dira: xurgapena alde batetik, eta erlaxazio prozesu nagusiak bestetik, fluoreszentzia, fosforeszentzia eta desaktibazio prozesu ez erradiatzaileak.

2.1.1 XURGAPENA

Jablonski diagraman ikus daitekeen moduan orokorrean konposatu baten oinarrizko egoera elektronikoa singletea egoera (S_0) izaten da, izan ere, molekula organiko gehienak egoera elektronikoa horretan aurkitzen dira giro-tenperaturan. Hori dela eta, lan honetan aztertuko diren FSen oinarrizko egoera elektronikoa S_0 izango da.



5. Irudia- Jablonskiren diagrama. FS molekulen prozesu foto-fisiko nagusiak azaltzen dira. Hasteko, xurgapena (gorriz). Ondorioz kitzikatutako molekulak jasaten dituen desaktibazio prozesu erradiatzaileak; fluoreszentzia (urdinez) eta fosforeszentzia (berdez), zein ez erradiatzaileak; bibrazionalak (k_{Bib}), barne konbertsioa (k_{BK} , lanranjaz) eta sistemen arteko gurutzaketa (k_{SAG} eta $k_{SAG'}$, berde argiz eta kakiz, hurrenez hurren).

Molekula horiek argiarekin irradiatzean energia jakin batzuk dituzten fotoiak xurgatzeko gai dira, eta kitzikatu egiten dira. Xurgatutako fotoi horren energiaren arabera, oinarrizko egoera elektronikokoan dagoen elektro batek salto egingo du egoera kitzikatutako maila (S_1, S_2, \dots) ezberdin batera; beti ere kontuan izanik, salto horiek trantsizio maila berdineko bibrazio maila (v , 5. Irudiko lerro xehez irudikatutako mailak) ezberdinetara gerta daitezke. Kitzikapen prozesu hori oso azkar ematen da, 10-15 segundotan, eta ondorioz, kitzikatutako elektroari ez dio denborarik ematen bere spina aldatzeko. Horren ondorioz, trantsizio horrek normalean spinaren multiplizitatea ($S_0 \rightarrow S_1, S_2, \dots, S_n$) mantentzen du, eta beraz, multiplizitate ezberdineko maila batera ematen diren trantsizioak ($S_0 \rightarrow T_1, T_2, \dots, T_n$) ez dira hain ohikoak izaten. Ondorioz, azken trantsizio horiei ez baimendutako trantsizio deritze. Xurgapen fenomenoaren esperimentalki neurtu daiteke. Lagina intentsitate (I_0) zehatz bat duten argiarekin irradiatzen da uhin luzera tarte batean. Hau da, argia modu zuzenean pasazten da laginetik, eta ondoren dagoen detektagailura heltzen da. Bertan, laginak transmititutako argi intentsitatea (I_t) neurtzen da uhin luzera bakoitzeko. Laginak xurgatzen duen argi intentsitatea uhin luzera bakoitzean hurrengo izango da:

$$I_{xur(\lambda)} = I_0 - I_t \quad (\text{Ek. 1})$$

Xurgatutako intentsitatea, molekulak xurgatzeko duen ahalmenarekin erlazionatu daiteke. Hori modu berean, kromoforoaren kontzentrazioarekiko (c / M), bide optikoarekiko (l / cm) eta laginaren absortzio koefiziente molarrekiko ($\epsilon / M^{-1}\text{cm}^{-1}$) zuzenki proportzionala da eta honela adierazten da:

$$A = \log(I_0/I_t) = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Ek. 2})$$

non, absortzio koefiziente molarra, ϵ , uhin luzera bakoitzean laginak argia xurgatzeko duen gaitasuna den. Parametro hori molekula bakoitzeko berezko ezaugarria da. Modu kualitatibo batean energia ezberdineko fotoiak eta laginean kitzikatutako elektroikopurua erlazionatzen ditu. Honela, uhin luzera zehatz batean, absortzio koefiziente molarra zenbat eta handiagoa izan, lagina energia hori duten fotoiekin irradiatzean, elektroik gehiago kitzikatuko dira. Gainera, laginak zenbat eta energia handiagoko fotoiak xurgatu, elektroiak orduan eta energia handiagoko egoera elektroniko kitzikatueta edo bibrazio maila energetikoeta kitzikatuko dira (ikus Jablonski diagrama, 5.irudia).

2.1.2 DESAKTIBAZIO PROZESUAK

Aurretik esan den moduan, kitzikapenaren ondorioz molekularen edozein maila elektroniko zein bibrazio maila populatu daitezke. Baina, populatuko maila edozein izanda ere, normalean oinarrizko egoerara (S_0) ematen diren desaktibazio prozesuak kitzikatutako lehenengo egoera elektronikoaren bibrazio maila baxuenetik ($S_1, 0$) ematen dira.

Orokorrean, kitzikatutako molekula sistemak bibrazio (v_n) eta egoera elektronikoetako (S_n) maila altuetatik, kitzikatutako lehenengo egoera elektronikoaren bibrazio maila baxuenera ($S_1, v=0$) igarotzean, euren gehiegizko energia fenomeno ez erradiatzaileen bitartez galtzen dute, normalean bero moduan. Prozesu horiek erlaxazio bibrazionalak eta barne konbertsio moduan (BK) ezagutzen dira (5. Irudia). Oso azkar ematen dira, hain zuzen ere, erlaxazio bibrazionala 10^{-14} eta 10^{-11} segundo tartean ematen da ($v_0 \rightarrow v_1$), eta barne konbertsioa 10^{-11} eta 10^{-8} segundo tartean ematen dira. Beraz, prozesu horiek lehenengo singlete mailaren erdibizitza denbora baino azkarragoak dira, azken horren erdibizitza denbora nanosegunduetako dela kontuan izanik.

Behin kitzikatutako elektroia kitzikatutako energia minimoko mailan egonik, oinarrizko energia egoerara itzultzeko, desaktibazio prozesu ezberdinak eman daitezke

(singlete egoeraren bizitza denboran zehar). Hurrengoak dira, 5. Irudian azaldutako eta euren artean modu lehiakor batean jarduten duten prozesuak:

- **Fluoreszentzia (Flu).** Trantsizio horretan kitzikatutako elektroia lehenengo egoera kitzikatutik oinarrizko egoerara bueltatzen da ($S_1 \rightarrow S_0$), soberako energia fotoi moduan askatuz. Probabilitate handiko prozesua da, azkarra, trantsizio horren abiadura konstantea, k_{flu} , 10^9 - 10^8 s^{-1} tartekoa izanik. Prozesu hori, hurrengo azpiatalean (2.1.2.1 atala) gehiago sakonduko da.
- **Barne konbertsioa (BK).** Prozesu ez erradiatzailea da, kitzikatutako elektroia kitzikatutako egoetatik oinarrizko egoerara bueltatzen da ($S_1 \rightarrow S_0$) eta energia barreiatzen da fotoirik igorri gabe. Bibrazio desaktibazio oso azkarra da ($k_{\text{BK}} = 10^{11}$ - 10^9 s^{-1}).
- **Sistemen arteko gurutzaketa (SAG).** Prozesu ez erradiatzailea da ere, baina, kasu horretan kitzikatutako elektroia triplete egoera batera igarotzen da ($S_1 \rightarrow T_1$), hau da, multipizitate aldaketa ematen da. Horren ondorioz, trantsizio hori ez dago oso faboratuta eta molekula organiko gehienetan prozesu ez eraginkorra da. Hala ere, trantsizio horren probabilitatea handitzeko spin-orbita akoplamenduetan oinarritutako estrategiak daude, hala nola, atomo astunak, karbonilo taldea duten ordezkatzailak eta π sistema konjokatu asko dituzten eraztunak gehi dakizkieke molekulei. Hortaz, 1. taulan lan honetan aztertuko diren fotosentikortzaileen egitura molekularrak aztertuz, azkeneko bi ezaugarriak betetzeko diseinatu direla ikus daiteke. Hau da, molekula organiko horietan sistemen arteko gurutzaketaren probabilitatea nabarmena izango da. Prozesu hori, barne konbertsioa baino motelagoa da, eta bere abiadura konstantea, k_{SAG} , 10^8 - 10^3 s^{-1} tartekoa da.
- **Fosforeszentzia (Fos).** Trantsizio hori sistemen arteko gurutzaketaren ondoriozko desaktibazio prozesu bat da. Trantsizio horretan, kitzikatutako elektroia triplete egoetatik ($T_1 \rightarrow S_0$), oinarrizko egoerara itzultzen da fotoi bat igorriz. Probabilitate gutxiko prozesua denez, intentsitate ahula eta erdibizitza luzeak ditu. Gainera, normalean efektu hori ez da fase likidoan behatzen, talka-lasaikuntza prozesuekin (2.2 atalean) ere lehiatzen baitu. Horren ondorioz, prozesu hori nabarmenagoa da tenperatura baxuetan eta sistema zurrundetan, non, talka prozesuak minimizatzen diren.

- **Sistemen arteko gurutzaketa' (SAG').** Aurretik aipatutako SAG trantsizioaren beste desaktibazio mota bat da. Desaktibazio bibrazionala da, eta kitzikatutako elektroia triplete lehenengo egoeratik oinarritzko egoerara itzultzen da ($T_1 \rightarrow S_0$), era ez-erradiatzailean. Desaktibazio prozesu hori, fosforeszentzia eta SAG' prozesuekin lehian aritzen da.

Prozesu horiek guztien konbinazio ezberdinek igorpen espektroak ezberdinak izatea eragiten dute, forman, uhin-luzeran eta intentsitatean. Sakonduz, fluoreszentzia absortzioa baino energia txikiagoetan agertuko da, baina fosforeszentzia baino energia handiagoetan (5. Irudiko prozesuen energia tartean ikus daiteke). Bestetik, igorpen bandaren intentsitatea, barne konbertsioa eta sistemen arteko gurutzaketen kontribuzioan menpe egongo da, prozesuen arteko lehiakortasunaren ondorioz.

Konposatu bakoitzaren espektro horiek ezagutzea oso garrantzitsua da, molekulen propietate fotofisikoak zehazten baitituzte. Modu horretan, molekularen portaera fisiko-kimikoa ezagutu daiteke, eta ondorioz amaierako aplikazioekin erlazionatu. Adibidez, hurrengo azpiatalean fluoreszentzian sakonduko da. Izan ere, lan honetan oso garrantzitsua izango da, FSen ituraketa kontrolatzeko.

2.1.2.1 Fluoreszentzia

Aurretik esan den moduan, lan honetan aztertuko diren FS molekuletan, fluoreszentzia espektroaren ikusgai-ultramore zonaldean baimendutako trantsizio elektronikoko oso garrantzitsua da.

Fluoreszentzia-espektroa, xugapen espektroaren ispilu irudia izan ohi da. Horren bandak simetrikoki kokatzen dira 0-0 bibrazio bandaren inguruan; baina, hori xurgapen banda baino uhin luzera altuagoetara agertzen da (Stokes-en despazamendua). Izan ere, bi trantsizio elektronikoko horien Franck-Condonen estalketa integralak oso antzekoak dira, prozesuetan parte hartzen duten bibrazio mailen uhin-funtzioen antzekotasunaren ondorioz.

Fluoreszentzia espektroari erreparaturik, fluoreszentziaren intentsitatea (I_{flu}), lehenengo egoera kitzikatuan dagoen populazio mailaren ($[S_1]$) eta horren desaktibazio konstantearen (k_{flu}) araberakoa da:

$$I_{flu} = k_{flu} \cdot [S_1] \quad (\text{Ek. 3})$$

Emisio egoeraren populazioa xurgatutako fotoien araberakoa izango da, hau da, I_{xur} -en araberakoa (Ek. 1); baina lehia dauden beste desaktibazio prozesu ez erradiatzaileen (k_{e-err}) menpe ere egongo da: barne konbetsioa (k_{BK}) eta sistemen arteko gurutzaketa (k_{SAG}).

$$k_{e-err} = k_{BK} + k_{SAG} \quad (\text{Ek. 4})$$

Beraz, xurgapenaren intentsitateak kontuan hartzen dituen prozesu ez erradiatzaile (k_{e-err}), zein erradiatzaileak bateratuz (k_{flu}), hurrengo definizioa geratzen da:

$$I_{xur} = k_{flu}[S_1] + k_{BK}[S_1] + k_{SAG}[S_1] \quad (\text{Ek. 5})$$

Fluoreszentiaren etekin kuantikoa

Fluoreszentzia fenomenoak kuantifikatzeko fluoreszentiaren etekin kuantikoa (Φ_{flu}) kalkulatu da:

$$\Phi_{flu} = \frac{I_{flu}}{I_{xur}} \quad (\text{Ek. 6})$$

Hau da, Φ_{flu} , emisio-erradiatzailearen intentsitate eta xurgapen-erradiatzailearen intentsitate osoaren arteko erlazio moduan definitzen da; edo beste era batera esanda, igorritako eta xurgatutako fotoi kopuruen arteko erlazioa da. Beraz, aurreko lau ekuazioak kontuan izanda, hurrengo erlazioa lortzen da:

$$\Phi_{flu} = \frac{k_{flu}}{k_{flu} + k_{BK} + k_{SAG}} = \frac{k_{flu}}{k_{flu} + k_{e-err}} \quad (\text{Ek. 7})$$

Ekuazio horri erreparatuz, igorpen handiko sistemetan (fluoreszenteak, $k_{flu} > k_{e-err}$) etekin kuantikoa bat baliotik oso gertu egongo da. Aldiz, igorpen gutxiko sistemetan (ez-fluoreszenteak, $k_{flu} < k_{e-err}$) etekin kuantikoa ia zero izango da. Hala ere, esperimentalki espezie baten fluoreszentiaren etekin kuantikoa neurtzeko abiadura konstanteak zuzenean ezin dira neurtu. Horregatik, hori kuantifikatzeko, emisio espektroa neurtzen da kitzikapen uhin luzera batekiko, eta igorritako fotoi kopurua emisio-espektroaren azalerarekiko (AZ_{flu}) erlazioan da. Bestetik, kitzikatutako uhin luzera horretan laginak xurgatzen dituen fotoiak hurrengo ekuazioaren bitartez neurtzen dira:

$$I = I_0(1 - 10^{-A(\lambda_{kitz})}) \quad (\text{Ek. 8})$$

Non, I uhin luzera horretan xurgatzen den intentsitatea den; I_0 , hasierako lanparren intentsitatea den; eta A (λ_{kitz}), kitzikatutako uhin luzeran laginak duen absorbantzia den.

Aurreko ekuazioak kontuan izanik, hurrengo proportzionaltasuna lortzen da:

$$\Phi_{\text{flu}} \propto \frac{Az_{\text{flu}}}{(1-10^{-A(\lambda_{\text{kitz}})})} \quad (\text{Ek. 9})$$

Beraz, etekin kuantikoa lortzeko, esperimentalki igorpena neurtzeko kitzikatu den uhin luzeran xurgapen intentsitatea neurtu eta emisio espektroaren azalera neurtu daitezke. Baina, biak lotzen dituen proportzionaltasun konstantea (Ek.9), neurtzeko aparatuen menpe dagoenez eta ezin denez jakin, Φ_{flu} ezagutzeko erreferentzia-substantzia bat beharrezkoa da fluoreszentiaren etekin kuantiko ezaguna duena.

$$\Phi_{\text{flu}}^{\text{erref}} \propto \frac{Az_{\text{flu}}^{\text{erref}}}{(1-10^{-A^{\text{erref}}(\lambda_{\text{kitz}})})} \quad (\text{Ek. 10})$$

Erreferentziak laginaren antzeko xurgapena erakutsi behar du kitzikatutako uhin luzera berdinean. Modu horretan, lagina zein erreferentzia neurketa-baldintza berdinetan neurtuko dira, proportzionaltasun konstante berdinak dituztela ziurtatzeko, eta lortutako bi espezieen arteko igorpen eta xurgapen intentsitateak erlazionatuko dira, ondorengo ekuazioa aplikatuz:

$$\Phi_{\text{flu}} = \Phi_{\text{flu}}^{\text{erref}} \cdot \frac{Az_{\text{flu}}}{Az_{\text{flu}}^{\text{erref}}} \cdot \frac{(1-10^{-A^{\text{erref}}(\lambda_{\text{kitz}})})}{(1-10^{-A(\lambda_{\text{kitz}})})} \quad (\text{Ek. 11})$$

Bizitza denbora fluoreszentea

Igorpenaren bizitza denbora etekin kuantikoarekin estu erlazionatuta dago. Fluoreszentiaren beste parametro oso garrantzitsu bat da, eta kitzikatutako lehenengo singlete egoeraren bizitza denbora (τ_{flu}) bezala definitzen da. Parametro horrek, molekulak egoera kitzikatuan igarotzen duen batezbesteko denbora adierazten du.

Esperimentalki balio hori lortzeko, lagina kitzikatu ondoren fluoreszentiaren intentsitatea denbora tarte batean neurtzen da, lanpara pultsakorrak erabiliz. Horren intentsitatea denborarekiko modu esponentzian jaisten da, hurrengo ekuazioa jarraituz:

$$I_{\text{flu}} = I_{\text{flu},0} \cdot e^{-t/\tau_{\text{flu}}} \quad (\text{Ek. 12})$$

Non, $I_{\text{flu},0}$, kitzikapen pultsoaren berehalako intentsitatea den. Ekuazio horretatik, bizitza denbora determinatzeko, logaritmo nepertarrak aplikatzen dira zuzen baten ekuazioa lortzeko eta bertatik τ_{flu} bakantzeko:

$$\ln(I_{\text{flu}}(t)) = \ln(I_{\text{flu},0}) - \frac{t}{\tau_{\text{flu}}} \quad (\text{Ek. 13})$$

Bestalde, aurretik esan den moduan, S_1 egoerak hiru desaktibazio konstanteak hartzen ditu bere baitan (Ek. 5). Modu horretan, ulertu daiteke desaktibazio prozesuen probabilitatea handiagoa denean, hau da, desaktibazio prozesuen konstanteak handiagoak direnean, laginak kitzikatutako egoeran denbora gutxiago iraungo du, egoera horren bizitza-denbora murriztuz. Hortaz,

$$\tau_{\text{flu}} = \frac{1}{k_{\text{flu}} + k_{\text{BK}} + k_{\text{SAG}}} = \frac{1}{k_{\text{flu}} + k_{\text{e-err}}} \quad (\text{Ek. 14})$$

Horrela, 11. eta 7. ekuazioak konbinatuz bizitza denbora etekin kuantiko fluoreszentearekin erlazionatu daiteke:

$$\Phi_{\text{flu}} = k_{\text{flu}} \cdot \tau_{\text{flu}} \quad (\text{Ek. 15})$$

$$k_{\text{e-err}} = \frac{1}{\tau_{\text{flu}}} - k_{\text{flu}} \quad (\text{Ek. 16})$$

Gainera, esperimentalki fluoreszentiaren etekin kuantikoa eta bizitza denbora neurtuz, desaktibazio-prozesuen konstanteak determinatu daitezke.

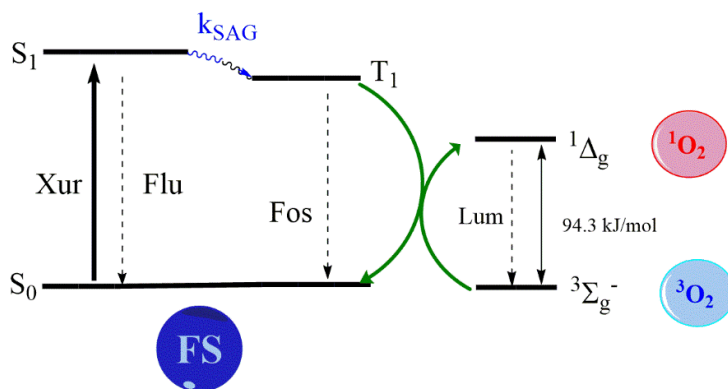
2.2 SINGLETE OXIGENOA

Aurretik aipatu bezala, lan honetan aztertuko diren fotosentikortzaileen egitura molekularrak aztertuz (1. taula), euren π sistema konjokatua dela eta, egoera kitzikatuko $S_1 \rightarrow T_1$ trantsizioen probabilitatea handia izango da (k_{SAG}). Gainera, FSak disoluzioan daudenez, erlaxatzeko bideei dagokienez talka prozesuak izango dira nagusi (2.1.1 atala). Horien artean, oxigeno molekularren talka izango da moteltze-prozesu (*quencher* ingelesez) nagusia, horren egoera elektronik bereziaren ondorioz.

Molekula horrek oinarrizko egoeran, π^* orbitalean bi elektroi desparekatu ditu, beraz, oxigeno molekularren oinarrizko konfigurazioa tripletea da, $^3\text{O}_2$. Gainera, horren lehenengo egoera kitzikatua $^1\text{O}_2$ da, eta batetik besterako trantsizioa baimenduta ez

dagoen arren multiplizitatearen aldaketaren ondorioz, bi egoera horien arteko energia tarte hain da txikia, 94.3 kJ/mol-ekoa, trantsizio hori gertatzea eragin dezakeen.

Ondorenez, $^1\text{O}_2$ espeziea lotzeko (prozesu eskematikoa 6. irudian), fotosentikortzailea xurgapen nahikoa duen uhin luzera batekin kitzikatu behar da. Honela, xurgatutako erradiazioaren zati bat, sistemen gurutzaketaren ondorioz, kitzikatutako lehenengo triplete egoerara (T_1) helduko da. Molekularen desaktibazioa eman baino lehen, fotosentikortzaileak egoera horretan oxigeno molekularrarekin talka egingo du eta egoera kitzikatuko energia transferituko dio oxigenoari. Oxigenoa kitzikatu egingo da, singlete oxigenoa lortuko da, eta aldi berean, FS molekula desaktibatuko da. Kontuan izan behar da, oxigeno molekulekin gertatzen diren talkak eraginkorrak izateko, FS-FS talken proportzioa txikia izan behar dela eta FSaren T_1 eta S_0 egoera mailen arteko energia maila 94.3 kJ/mol baino handiagoa izan behar dela.^{9,15}



6. Irudia- FS molekula T_1 egoera kitzikatutik oxigeno molekularren arteko talkaren ondorioz ematen den elektroien inbertsioa azaltzen da. Horrela, T_1 egoera kitzikatu dagoen molekula oxigenoarekin talka egitean bere gehiegizko energia oxigeno molekularrak energia hartzen du, inbertsioaren ondorioz, eta singlete oxigenoa lortzen da.

2.2.1 SINGLETE OXIGENOAREN ETEKIN KUANTIKOA

Singlete oxigenoaren sorreraren eraginkortasuna kuantifikatzeko, singlete oxigenoaren etekin kuantikoa (Φ_Δ) kalkulatu da. Parametro hori espezie horren molekulen sorrera, eta xurgatutako fotoien arteko erlazio moduan definitzen da:

$$\Phi_\Delta = \frac{\text{sortutako singlete oxigeno molekula kopurua}}{\text{xurgatutako fotoi kopurua}} \quad (\text{Ek. 17})$$

Horretarako, esperimentalki $^1\text{O}_2$ espeziearen sorrera neurtzen da, 1276 nm-tan ageri den bere luminiszentzia karakterizatuz (aurretik aipatutako trantsizioen arteko energia mailari dagokio, 94.3 kJ/mol). Seinale hori FS erreferentzia substantzia baten seinaleekin konparatzen da, singlete oxigeno etekin kuantiko ezaguna duena hain zuzen. Bi molekulak baldintza berdinetan neurtzen dira; kitzikapen uhin luzera eta disolbatzaile berdinak erabiliz, eta kitzikapen uhin luzeran absorbantzia oso antzekoa dutela egiaztatuta.

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\text{erref}} \cdot \frac{S_e}{S_e^{\text{erref}}} \cdot \frac{\alpha^{\text{erref}}}{\alpha} \quad (\text{Ek. 18})$$

$$\alpha = 1 - 10^{-A(\lambda_{\text{kitz}})} \quad (\text{Ek. 19})$$

Non, S_e singlete oxigeno seinalearen intentsitatea den 1276 nm-tan, erreferentzia eta fotosentikortzailearentzako; $\Phi_{\Delta}^{\text{erref}}$, ezaguna den erreferentziaren etekin kuantikoa den, eta α kitzikatutako uhin luzeran FSaren xurgapena adierazten duen terminoa den (Ek. 19).

2.3 FS-EN ERAGINKORTASUNA TFD-AN APLIKATZEKO

Aurretik definitu diren fluoreszentzia eta singlete oxigenoaren etekin kuantikoak, desaktibazio prozesuen probabilitatea adierazten dute. Lehenengoak, kitzikatutako elektroiak fotoiak igorritz desaktibatze duen probabilitatea erakusten du; eta bigarrenak, aldiz, singlete oxigenoa sortuz. Baina, molekularen fluoreszentzia eta singlete oxigenoaren lorpena, bi termino horien menpe egoteaz gain, molekulak fotoiak xurgatzeko duen gaitasunaren menpe egongo da baita ere. Termino horiek bat hartzen dituzten hurrengo bi termino definitzen dira, dirdira (D) eta gaitasun fototoxikoa (GF).

$$D = \varepsilon \cdot \Phi_{\text{flu}} \quad (\text{Ek. 20})$$

$$GF = \varepsilon \cdot \Phi_{\Delta} \quad (\text{Ek. 21})$$

Bi termino horiek, fotosentikortzailearen gaitasun teragnostikoa aztertze erabiltzen dira. Izan ere, alde batetik, fotosentikortzaileak dirdira (D) egokia erakusten badu, horren ituraketa hobeto kontrolatu ahal izango da. Bestetik, fototoxikotasun handia badu (GF), zeluletan eragin toxikoa sortzeko ahalmena izango du, eta ondorioz, zelkulak hiltzeko gaitasuna izango du.

2.4 MOLEKULEN ARTEKO AGREGAZIOA

Fotosentikortzaileak gorputz barruan aplikatzen direnez, konposatu horiek ingurune urtsuan disolbagarriak izan behar dira. Molekula horiek ordea, disoluzio urtsuetan orokorrean agregatu egiten dira, molekulen estruktura planarraren ondorioz. Horregatik, konposatu horien agregatuak ondo ezagutzea eta ikertzea komeni da, horiek nolabait ekiditeko.

Agregazio prozesuak, baldintza eta ingurunearen menpekoak dira; hala nola, disolbatzailea, tenperatura eta FSaren kontzentrazioaren menpekoak. Agregatuen sorreraren ondorioz, xurgapen eta igorpen espektroak guztiz aldatzen dira, sortutako agregatu horiek monomeroarekiko propietate fisikokimiko ezberdinak erakusten baitituzte. Normalean, horien xurgapen banda murrizten da, eta banda berriak agertzen dira, energia handiago zein txikiagotan, azken hori molekulen geometriaren arabera da. Izan ere, sortzen diren agregatuak bi motatakoak izan daitezke, H motakoak (plano ezberdinetan, aurrez aurre antolatuz) edo J motakoak (plano berdinetan, alboz albo antolatuz). Horiek bereizteko banda espektralaren posizioak aztertzen dira. Ezaguna da, H motako agregatuen xurgapen banda euren monomeroena baino uhin luzera txikiagotara lerratzen direla. Gainera, agregatu horiek ez dira fluoreszenteak, izan ere desaktibazio prozesu ez erradiatzaileen bidez erlaxatzen dira. Bestetik, J motako agregatuetan xurgapen zein emisio espektroen bandak monomeroena baino uhin luzera altuagoetara desplazatzen dira. Horretaz gain, agregatuek fluoreszentzia intentsitate eta bizitza denbora oso baxuak erakusten dituzte.^{17,33}

3 PROZEDURA ESPERIMENTALA

Atal hau bi azpiataletan banatuko da. Lehenengoan, FS ezberdinen lagainak nola prestatu diren azalduko da; eta bigarrengoan ezaugarri foto-fisikoak (2. atalean azaldu diren prozesuak) neurtzeko erabili diren teknika esperimentalak azalduko dira.

3.1 LAGINEN PRESTAKETA

Lan honetan aztertutako FSen propietate fotofisikoak neurtzeko disoluzio diluituak ($4\text{-}5\cdot 10^{-6}$ M) prestatu ziren, berxurgapen, berigorpen eta agregazio fenomenoak ekiditeko helburuarekin. Aipatu behar da, PpIXren kasuan, ondo disolbatzen ez zenez prozedura ezberdina jarraitu zela konposatu horren bi espezieen kasuan, klorinen familiako FSekin konparatuz.

PpIX konposatu neutroa (*MedChemExpress*, \leq %90) zein ionikoa (*Sigma-Aldrich*, \leq %90) guztiz disolbagaitzak zirenez azetonan (*Az, Scharlau*, Espektroskopikoa), horien disoluzio kontzentratuak prestatu ziren dimetil sulfoxidoan (10^{-5} M DMSO-n, *Scharlau*, Espektroskopikoa). Disoluzio horiek prestatzeko, balantza analitikoan (*SECURA 125-15-1S Sartorius*, $\pm 0,01$ mg) FS bakoitzaren 0,50 mg inguru pisatu zen eta 3 mL DMSO-tan disolbatu ziren. Ondoren, ama disoluziotik 0,10 mL ($\pm 0,01$ mL) inguruko bolumena hartu zen, aurretik aipatutako neurketa ordena lortzeko eta gorputzean onargarria den DMSO kantitatea (%1) duten disoluzioak lortzeko. Beraz, 10 mL-ko bi disoluzio egin ziren, DMSO bolumen horren gainean disolbatzaile desberdinekin (metanola (MeOH, *Scharlau*, Espektroskopikoa) eta fosfatozko buffer disoluzioa (PBS, *Sigma-Aldrich*) disoluzioak parekatu ziren.

Bestetik, Ce6 (*Sigma-Aldrich*, \leq %90), HPPH (*Sigma-Aldrich*, %98), Vp (*Sigma-Aldrich*, %94) eta m-THFK (*Sigma-Aldrich*, \leq %90)-ren kasuan 10^{-3} M inguruko ama disoluzio kontzentratuak prestatu ziren azetonan. Horretarako, balantza analitikoan FS bakoitzaren 1 mg inguru pisatu eta 10 mL azetonan disolbatu ziren. Ondoren, ama disoluzioak diluitu egin ziren $4\text{-}5\cdot 10^{-5}$ M inguruko disoluzioak prestatuz, hau da, lehenengo disoluziotik kantitate egokiak (1-2 mL ingurukoak, $\pm 0,01$ mg) hartu ziren eta azetonarekin parekatu ziren 10 mL-ko disoluzioa lortu arte. Azkenik, 1. diluzio horretatik beste 1 mL hartu zen eta 2. diluzioa egin zen ($4\text{-}5\cdot 10^{-6}$ M). Azken diluzioa disolbatzaile ezberdinekin (azetona, MeOH eta PBS) parekatu zen 10 mL-tan. Azetona

disolbatzailea erabili ez zen kasuetan, azkeneko bi disolbatzaileen kasuan hain justu, azetona aurretik lurrundu egin zen, N₂ likidoa eta huts ponpa erabiliz. Horren ondoren, matrazea intereseko disolbatzailearekin parekatu zen. Gainera, PBS-aren kasuan, aurretik DMSO tanta bat gehitu zen FSa disolbatzen laguntzeko.

Azkenik, singlete oxigenoaren neurketak egiteko FS-en 1 balioko absorbantzia zuten disoluzioak prestatu ziren.

Hasteko, Ce6ren kasuan Q bandan (espektroaren ~600-700 tartean agertzen diren bandak) absorbantzia hori izateko prestatu zen disoluzioa 5 mL-ko azetonan. Horretarako, ama disoluziotik bolumen egokia hartu zen (0,75 mL). Ondoren absorbantzia ezberdineko disoluzioak lortu ziren, prestatutako disoluziotik eta disolbatzailearen kantitate ezberdinak kubetan nahastuz, begi bistaz.

Bestetik, klorina familiako FS guztien disoluzioak MeOD-etan prestatu ziren prozedura berdina jarraituz. Baina kasu horretan, *Soret* bandan (espektroaren ~380-450 tartean agertzen diren bandak) 1 balioko absorbantzia izateko disoluzioak prestatu ziren, ondorioz, ama disoluziotik bolumen txikiagoak hartu behar izan ziren (0,3 mL ingurukoak). Horiek lurrundu eta 5 mL MeOD-ekin parekatu ziren.

Azkenik, PpIX bi espezieen kasuan MeOD disolbatzailean disolbatzen ez zirenez 5mL-ko MeOD (%1DMSO) disoluzioak prestatu ziren.

Singlete oxigenoaren etekin kuantikoa kalkulatzeko, erreferentzia moduan, New Methylene Blue (NMB, *Sigma-Aldrich*, %90)(Q bandan kitzikatzean) eta fenalenona (PN, *Sigma-Aldrich*) (*Soret* bandan kitzikatzean) erabili ziren. Horren ondorioz, horien disoluzioak azetonan prestatu ziren. Horretaz gain, PN MeOD eta MeOD (%1DMSO) disoluzioak prestatu ziren. Guztiak begi bistaz (MeOD (%1DMSO)-ko disoluzioa izan ezik, disolbatzaileen proportzioak mantendu baitziren) prestatu ziren, ondoren laginaren absorbantzia antzekoa zutela ziurtatzeko.

3.2 TEKNIKA ESPERIMENTALAK

Atal honetan, oinarri teorikoan (2. atalean azalduta) aipatutako ezaugarri fotofisikoak neurtzeko erabili diren teknika ezberdinak azalduko dira.

3.2.1 ULTRAMORE (UM)-IKUSKOR (Ikus) ESPEKTROSKOPIA

Xurgapen-espektroak neurtzeko izpi-bikoitzeko UM-Ikus espektrofotometroa (*Varian, Cary E4*) erabli zen (Ikus 7. irudia). Tresnak bi lanpara ditu: deuteriozko lanpara bat ultramore gunean eta lanpara halogenatua ikuskor eremuan, eta batetik besterako aldaketa 350 nm-tan ematen da. Espektrofotometroak, 0,5 nm-ko bereizmeneko monokromagailu bikoitza du argiaren uhin luzera hautatzeko eta 1200 lerro/mm-ko difrakzio sarea. Bestetik, transmitantzia neurtzeko (2.1.1 atalean azalduta) fotobiderkatzaile bat erabiltzen du detektagailu gisa (*Hamamatsu R928*).

Neurketak, 1 cm-ko kuartzozko kubeta batean egin ziren, 300-800 nm-ko espektro tartean, 600 nm min⁻¹-ko ekorketa abiadurarekin eta 1 nm-ko bereizmen espektralarekin. Azkenik, laginaren seinalea disoluzioko disolbatzailearen seinalearekin zuzendu zen.



7. Irudia- Varian Cary E4 UM-Ikus espektrofotometroa.

3.2.2 FLUORESZENTZIAREN IGORPENA, ETEKIN KUANTIKOA ETA BIZITZA DENBORA

Fluoreszentzia intentsitatea eta bizitza denboraren kurba espektrofluorimetroan (*Edinburgh Instruments, FLSP920*, ikus 8. irudia) neurtu ziren.

Aparatuak, fluoreszentziaren igorpena neurtzeko xenonezko lanpara bat du (Xe900VIS, 450 W) eta xurgapen espektroak neurtzeko erabiltzen den espektrofotometroaren fotobiderkatzaile berdina dauka detektagailu gisa (*Hamamatsu R928*). Horretaz gain, monokromagailu bikoitza du, kitzikapenean eta igorpenean, bi uhin-luzeren bereizmena hobetzeko.



8. Irudia- Edinburgh Instruments, FLSP920 fluorimetroa.

Etekin kuantikoa neurtzeko, 2.1.2 atalean azaldutako metodoa erabili zen (Ek.11). FS bakoitzarentzat erreferentzia ezberdina erabili zen. Alde batetik, Ce6, HPPH eta m-THFK-rako; zink ftalozianina erabili zen ($\phi_{\text{flu}}^{\text{err}} = 0,30$, toluenoan). Bestetik, Vp-rako; errodamina-800 erabili zen ($\phi_{\text{flu}}^{\text{err}} = 0,22$, etanoletan). Azkenik, PpIX neutro zein ionikorako; aurretik neurtutako Ce6 erabili zen ($\phi_{\text{flu}}^{\text{err}} = 0,17$, azetonan).

Azkenik fluoreszentiaren bizitza denboraren kurbak determinatzeko ere, tresna berbera erabili zen. Fluoreszentzia desaktibazio kurbak lortzeko denborarekiko korrelazioa duen fotoi-kontagailu kuantikoa erabili zen (TC-SPC, *Time Correlated Single Photon Count*). Desaktibazio kurbak, igorpen maximoko uhin luzeran determinatu ziren eta laginak aurretik determinatutako uhin luzeran kitzikatu ziren (*Supercontinuum VIS*), 200 ns-ko erresoluzio denborako pulsoekin eta 5 MHz-tako frekuentzia pultsuan. Detektagailu moduan *Hamamatsu C4878* erabili zen. Ondoren, τ_{flu} desaktibazioa kurben maldatik determinatu zen (Ek.13) eta neurketen doitasuna, χ^2 analisi parametroaren bidez determinatu zen.

3.2.3 SINGLETE OXIGENO IGORPENAREN NEURKETAK

Singlete oxigenoaren sorrera, 1276 nm-tan espezie horrek erakusten duen fosforeszentzia neurtuz determinatu zen. Horretarako, fluoreszentzia neurtzeko espektrofluorimetro bera erabili zen integratuta zegoen HIG-ko detektagailua erabilita (InGaAs, Hamamatsu G8605-23). Bestalde, lagina kitzikatzeko xenonezko lanpara erabili zen (Xe900VIS, 450 W).

Laginaren seinalea jasotzeko, lagina 1 cm-ko kuartzozko kubetetan neurtu zen, baina kasu horretan, aurrez aurreko (*front phase* ingelesez) konfigurazioan ipini zen (40° eta

50°-ko angeluekin kitzikapen eta emisio izpiekiko, hurrenez hurren, eta 30°-ko inklinazioarekin). Laginaren seinalea, 850 nm-ko filtro batekin iragazi zen.

2.2.1 atalean azaldu bezala, singlete oxigenoaren etekina kalkulatzeko etekin kuantiko ezaguna duen erreferentzia bat behar da. Modu horretan, Ce6 gorrian kitzikatu zenean erreferentzia moduan New Methylene Blue erabili zen (NMB, $\phi_{\Delta}^{\text{err}} = 0,55$, azetonan). Bestalde, laginak urdinean kitzikatu zirenean erreferentzia unibertsala erabili zen, fenalenona (PN, $\phi_{\Delta}^{\text{err}} = 0,98$) hain zuzen. Azkenik, emaitzak doitasun handiagoarekin lortzeko eta horren errorea determinatzeko, 3 disoluzio ezberdin neurtu ziren; 0.6-0.7, 0.7-0.8 eta 0.8-0.9 tarteko absorbantziekin. Azkenik, lortutako emaitzekin etekin kuantikoa kalkulatu zen (Ek. 18) eta emaitzen desbiderapena aztertzeko analisi estatistikoa erabili zen. Neurketan metanol deuteratua (MeOD-1) egin ziren, izan ere, hidrogenoak neurketa horrekiko oztopoa dira eta horiek deuterioarekin ordezkaturaz, neurketaren zarata kentzea lortzen da. Kasu horretan fotoiak erortzen denbora luzeagoa ematen dutelako eta ondorioz, detektatzeko errazagoak dira.^{34,35}

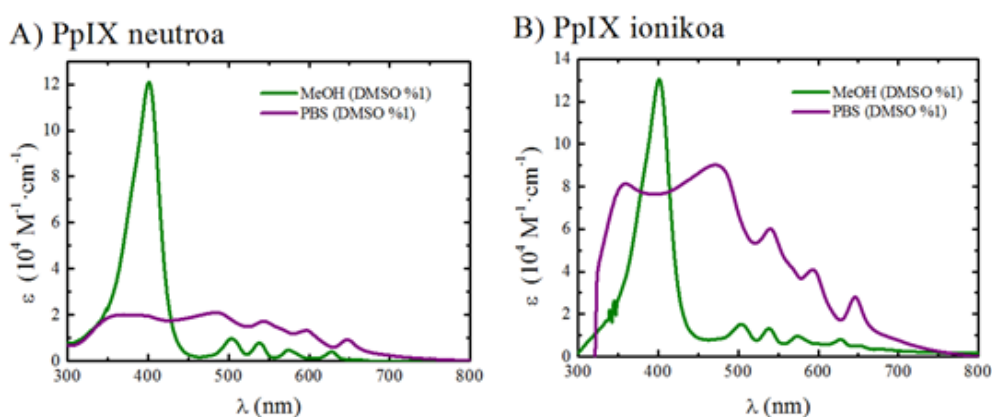
4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

Atal honetan lanean lortutako emaitzak azaldu eta eztabaidatuko dira. Lehenengo bi azpiataletan, porfirina eta klorina familietatik aztertutako sei FS desberdinen ezaugarri fotofisiko orokorrak azalduko dira, hurrenez hurren (4.1 eta 4.2 atalak). Ondoren, FS horien singlete oxigenoaren etekin kuantikoa determinatu da (4.3 atala), eta azkenik, FS hauen eraginkortasuna aztertu da TFD-an aplikatzeko (4.4 atala).

4.1 PORFIRINEN EZAUGARRI FOTOFISIKOAK

Hasteko, PpIX fotosentikortzailea aztertu da, bere forma neutro zein ionikoan (ikus horien egitura kimikoak 1.taulan), konposatuaren ur-disolbagarritasuna, eta ondorioz, horren ezaugarri fotofisikoak hobetzea xede. Hala ere, espezie ionikoan ez da neutroarekiko hobekuntzarik lortu ur-disolbagarritasunari dagokionez (3. atal esperimentalean disoluzioen prestakuntza prozesuan ikus daitekeen moduan), eta bi espezieak disolbatzeko zailtasunak izan dira. Izan ere, molekula horiek azetonan, metanolean eta PBS-tan guztiz disolbagaitzak dira. Horrenbestez, DMSO erabili behar izan da konposatua disolbatzaile horietan disolbatzeko.

Bi disoluzio horiek prestatuak, bi espezieen propietate fotofisikoak aztertu ziren. Lehenik eta behin, xurgapen espektroak aztertu ziren MeOH (%1 DMSO) eta PBS (%1 DMSO) disolbatzaileetan. Xurgapen espektro horiek 9.irudian ageri dira, espezie bakoitzarekiko xurgapen koefiziente molarrarekiko normalizatuta (ϵ , Ek. 2).



9. Irudia- PpIX espezieen xurgapen-espektroak, MeOH (%1 DMSO)-tan (berdez) eta PBS (%1 DMSO)-tan (morez) xurgapen-koefiziente molarrarekiko (ϵ) normalizatuta. A) PpIX espezie neutroa eta B) PpIX espezie ionikoa.

Konposatu neutroak zein ionikoak MeOH (%1 DMSO)-tan xurgapen koefiziente handia erakusten dute *Soret* bandan (antzekoa da bietan, $\approx 12-13 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 9A.irudia eta 2.taula); Q bandan, ordea, xurgapen askoz txikiagoa dute, 7 aldiz txikiagoa hain zuzen ere, ($\approx 1-2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Azken hori, TFDan aplikatzeko muga bat da. Izan ere, 2. Irudian ikusi den moduan *Soret* bandako uhin luzerak 5 mm-ko azaleko sarkortasuna dute bakarrik (1.2 atala). Egia da, 9. Irudiko espektroak aztertuz, azaleko sakontasun handiagoetara heldu daitezkeen uhin luzeretan ere fotoiak xurgatzen dituztela. Baina, hauek Q bandan ageri direnak alegia, oso gutxi dira. Beraz, argi energia horrekin molekula kitzikatzean S_1 energia maila oso gutxi populatuko da, eta ondorioz, singlete oxigeno espeziearen sortzeko probabilitatea ia nulua edo oso txikia izango da.

2. Taula.- PpIX neutro eta ioniko espezieen propietate fotofisikoak MEOH (%1 DMSO) eta PBS (%1 DMSO) disolbatzaileetan: λ_{xur} , xurgapen maximoko uhin luzera *Soret* bandan ($\pm 1 \text{ nm}$); ϵ , xurgapen koefiziente molarra ($\pm \%2$); ϕ_{flu} , fluoreszentiaren etekin kuantikoa ($\pm \%5$, oinarritzko igorpen bandaren etekin kuantikoa, Ce6 erreferentzia eta 10.ekuazioa erabiliz kalkulatur); λ_{em} , igorpen maximoko uhin luzera ($\pm 1 \text{ nm}$); τ_{flu} , fluoreszentiaren bizitza denbora ($\pm \%2$); k_{flu} , fluoreszentiaren abiadura konstantea ($\pm \%5$, Ek. 12); k_{e-err} , prozesu ez erradiatzaileen abiadura konstantea ($\pm \%5$, Ek. 13).

	Dis	λ_{max} (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	ϕ_{flu}	λ_{em} (nm)	τ_{flu} (ns)	k_{err} (10^8 s^{-1})	k_{e-err} (10^8 s^{-1})
PpIX neutroa	MeOH	401	12,10	0,08	632 699	11,2 11,2	0,07	0,84
	PBS	-	-	0,01	622 686	15,8 15,1 (2) 0,3 (98)		
PpIX ionikoa	MeOH	401	13,05	0,08	632 699	11,1 11,2	0,07	0,84
	PBS	-	-	0,01	624 663	15,8 (77) 1,1 (23) 12,9 (6) 4,1 (94)		

Dis: disolbatzailea.

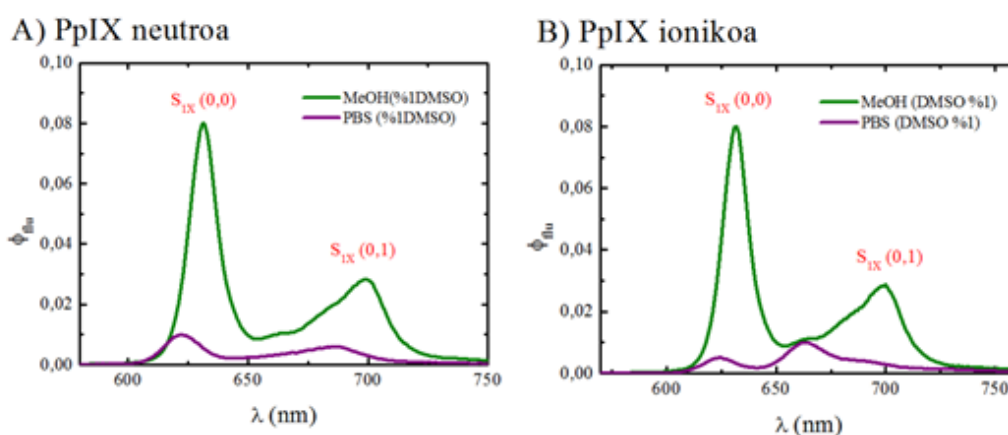
- Banda zabala lortzen da UV-Ikus espektro osoan.

Bizitza denbora biesponentzialetan, bizi-denbora bakoitzaren kontribuzioa jarri da ehunekotan.

Bestetik, PBS (%1 DMSO)an disolbatutako laginen espektroak aztertuz (9B. irudia), xurgapen banden intentsitatea asko txikitzen da, batez ere, espezie neutroaren kasuan. PBSaren natura MeOHarekin alderatuta disolbatzaile polarragoa da. Izan ere, PBSa fosfato/gatz indargetzaile bat da, hau da, gatzez beteriko disoluzio urtsu bat da, hori dela eta, konposatu neutroak agregatuak sortzen ditu ingurune horretan ondo disolbatzen ez delako (2.3 atala). Izan ere, banda oso zabalen eta espektro

distortsionatuen agerpena, dimero edota agregatu handiagoen presentziarekin erlazionatu daiteke zuzenean, disolbakortasun faltagatik hain zuzen ere. Beraz, kasu horretarako xurgapen maximoaren uhin luzera ezin da determinatu. Espezie ionikoan, aldiz, banda horien bereizmena eta intentsitatea handitu egiten da konposatu ionikoa hobeto disolbatzen delako PBS ingurunean.

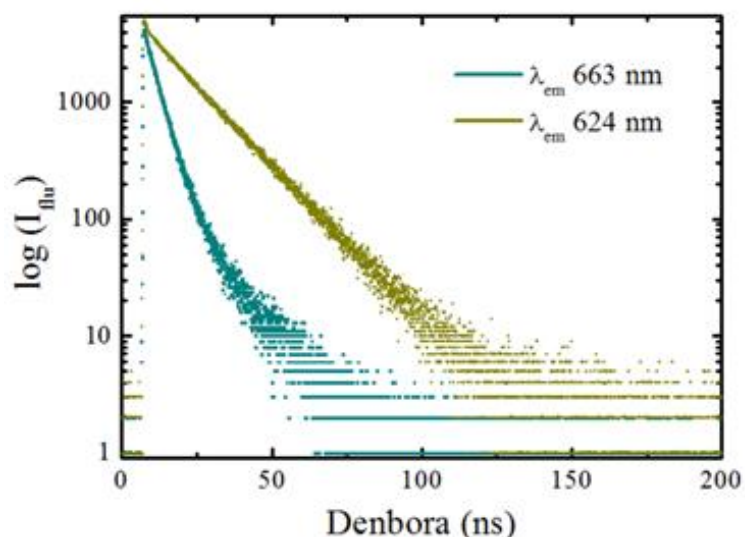
Bestalde, espezie hauen fluoreszentiaren igorpen espektroak 10. Irudian ageri dira. Bi espezieetan bi igorpen banda ikusten dira: espezie neutroan 632 nm-tan ageri da maximoa eta 699 nm-tan txikiagoa den banda bibrazionala behatzen da; eta espezie ionikoan, aldiz, 622 nm eta 686 nm-tan ageri dira bi banda hauek. Horren jatorria aztertu nahian, kontzentrazio ezberdineko laginak prestatu ziren metanolean agregatuen presentzia aztertzeko eta bi igorpen uhin luzeretan bizitza denborak kalkulatu ziren. Honela, kontzentrazio ezberdineko lagin guztietan bi bandak agertzen zirela ikusi zen eta gainera, bi igorpen uhin luzeretan bizitza denboren balioak berdinak zirela egiaztatu zen ($\tau_{flu} = 11,2$ ns; 2. taula). Ondorioz, bi igorpen horiek espezie berdinen S_1 energia mailaren bizitza denborak direla ziurtatu daiteke, eta $S_{1X}(0,0)$ eta $S_{1X}(0,1)$ egoeretakako desaktibazio trantsizioei egotzi zaie, hurrenez hurren, bibliografian baieztatu den bezala.³⁶ Hau da, S_1 energia mailatik S_0 energia mailara bi trantsizio ematen dira: lehenengoa, $S_1 v=0$ bibrazio mailatik $S_0 v=0$ bibrazio mailara eta bigarrena, aldiz, $S_1 v=0$ bibrazio mailatik $S_0 v=0$ bibrazio mailara. Lehenengo bandaren trantsizio energia tartea handiagoa duenez uhin-luzera laburragoetan ageri da.



10. Irudia- PpIX espezieen fluoreszentiaren igorpen-espektroak MeOH (% 1 DMSO)-tan (berdez) eta PBS (% 1 DMSO)-tan (morez) etekin kuantikoarekiko (ϕ_{flu}) normalizatuta. A) Espezie neutroa eta B) PpIX espezie ionikoa.

Fluoreszentziaren etekin kuantikoei dagokienez, bi espezieek balio oso txikiak dituzte ($\phi_{flu} < 0,08$ oinarrizko lehenengo igorpen banda kontuan izanda, 2. Taula). Disolbatzailearen eragina aztertuz, PBS-an fluoreszentziaren etekin kuantikoa asko txikitzen da ($\phi_{flu} = 0,08$ izatetik 0,01 izatera igorpenaren oinarrizko bandan erregistratuta, 2. taula). Izan ere, PBS-an erregistratutako bizitza denboren balioak aztertuz, 2 bizitza denboren kontribuzioa dago bi espezieetan. Bestalde, espezie ionikoaren PBStan egindako espektroa aztertuz, ikus daiteke, bigarren banda bibrazionalaren intentsitatea ($\lambda_{em} = 663$ nm), lehenengo banda bibrazionala baino intentsuagoa dela, espezie neutroan gertatzen ez den bezala (10b. irudia).

Beraz, xurgapen zein igorpen espektroek iradokitzen dute agregatuen presentziaren ondorioz izan daitekeela. Badirudi, J motako agregatuen presentzia izan daitekeela. Izan ere, aurretik azaldu den moduan porfirinen xurgapen zein igorpen espektroak PBS-an zonalde gorriantzez lerratzen dira (Ikus 2.4 atala). Egia da, igorpenean lerrakuntza hori ez dela hain ondo bereizten, ageri diren bigarren igorpen bandak, agregatuekin zerikusia dutenak, monomeroaren bigarren banda bibrazionalarekin gainezartzen direlako ($S_{IX}(0,1)$). Hori dela eta, espezie ionikoaren kasuan oinarrizko lehenengo igorpen banda baino intentsitate altuagoko banda lortu da, agregatuen zein monomeroen banden gehikuntzaren ondorioz.



11. Irudia- PpIX espezie ionikoaren bizitza denboraren desaktibazio kurbak igorpen uhin luzera ezberdinetan, 624 nm-tan (berdez) eta 663 nm-tan (urdinez).

Gainera, erregistratutako bizitza denborek agregatuen kontribuzio handiena gorrirantz lerratuta dagoen uhin luzeran agertzen dela egiaztatzen dute (0,3 ns %98-ko kontribuzioarekin PpIX neutrorako eta 4,1 ns %94-eko kontribuzioa ionikorako; 2. Taula); konposatu neutrorako, aldiz, lehenengo bandan monomeroa bakarrik ikusten da ($\tau_{flu} = 15,8$ ns; 2. taula). Konposatu ionikoaren bizitza denboraren kurbak 11. Irudian ikus daitezke, eta uhin-luzera handiagotan agregatuak monomeroarekiko nagusi direla ikusten da.

4.2 KLORINEN EZAUGARRI FOTOFISIKOAK

Klorina familiako konposatuak, PpIX espezieekin konparatuta, hobeto disolbatzen dira, baina horien kasuan ere, disolbatzeko arazoak eman dituzte interesekoa den PBS-an. Beraz, %1eko DMSO erabili behar izan zen berriro ere. Hala ere, aipatzekoa da disolbatzaile horren kantitate txiki hau ez dela toxikoa gorputzerako, beraz, onargarrizat hartu da. Terapia fotodinamikorako FSak disolbatzaile horretan propietate fotofisiko egokiak izatea garrantzitsua denez, porfirinen ezaugarriak hobetzeko asmoz, atal honetan aukeratutako klorina molekulen propietate fotofisikoak aztertu dira.

Hasteko, espezie horien xurgapen espektroak aztertu ziren azetonan, metanoletan eta PBS (%1 DMSO) disolbatzaile ezberdinetan. Lehendabizi, 12. Irudiko espektroak aztertuz, behatzen da horien xurgapen banda maximoa, lehenengo xurgapen bandak eta eremu ikusgaiaren zonalde urdinean ageri direnak, *Soret* bandei dagokiela. Eremu ikusgaiaren uhin-luzera handiagotan, Q bandak ere ageri dira guztietan, eta gainera, xurgapen intentsitate igoera ikusi da aurretik aztertutako FSekin konparatuz, hain zuzen ere, Q banda intentsuenetan $\approx 3-6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ balioko xurgapen koefiziente molarrak lortu dira (3. Taula). TFD-rako Q banda interesatzen zaigunez, bada horren ezaugarri fotofisikoak konparatu dira FS ezberdinetan eta disolbatzaile ezberdinetan (3. Taula).

Ce6 eredutzat hartuz, ikus daiteke disolbatzailearen polaritatea igotzean, xurgapen trantsizioaren bandetan efektu hipsokromikoa ematen dela. Beraz, ondorioztatu daiteke FS horren S_1 egoera elektronikoaren momentu dipolarra oinarritzko egoeraren momentu dipolarra baino txikiagoa dela, eta ondorioz, disolbatzaile apolarretan gehiago egonkortzen da. Vp eta m-TFHK FSen kasuetan, azetonan eta metanoletan

lortutako emaitzak kontuan izanik (3. taula), xurgapen banden uhin-luzerak berdinak dira eta errorearen barruan daude (± 1 nm). Hauetan, bi egoera elektronikoen momentu dipolarra antzekoa denez, ez da aldaketarik ikusten polartasun ezberdineko disolbatzaileak erabiltzean, bi energia mailen arteko GAP balioa mantentzen baita.

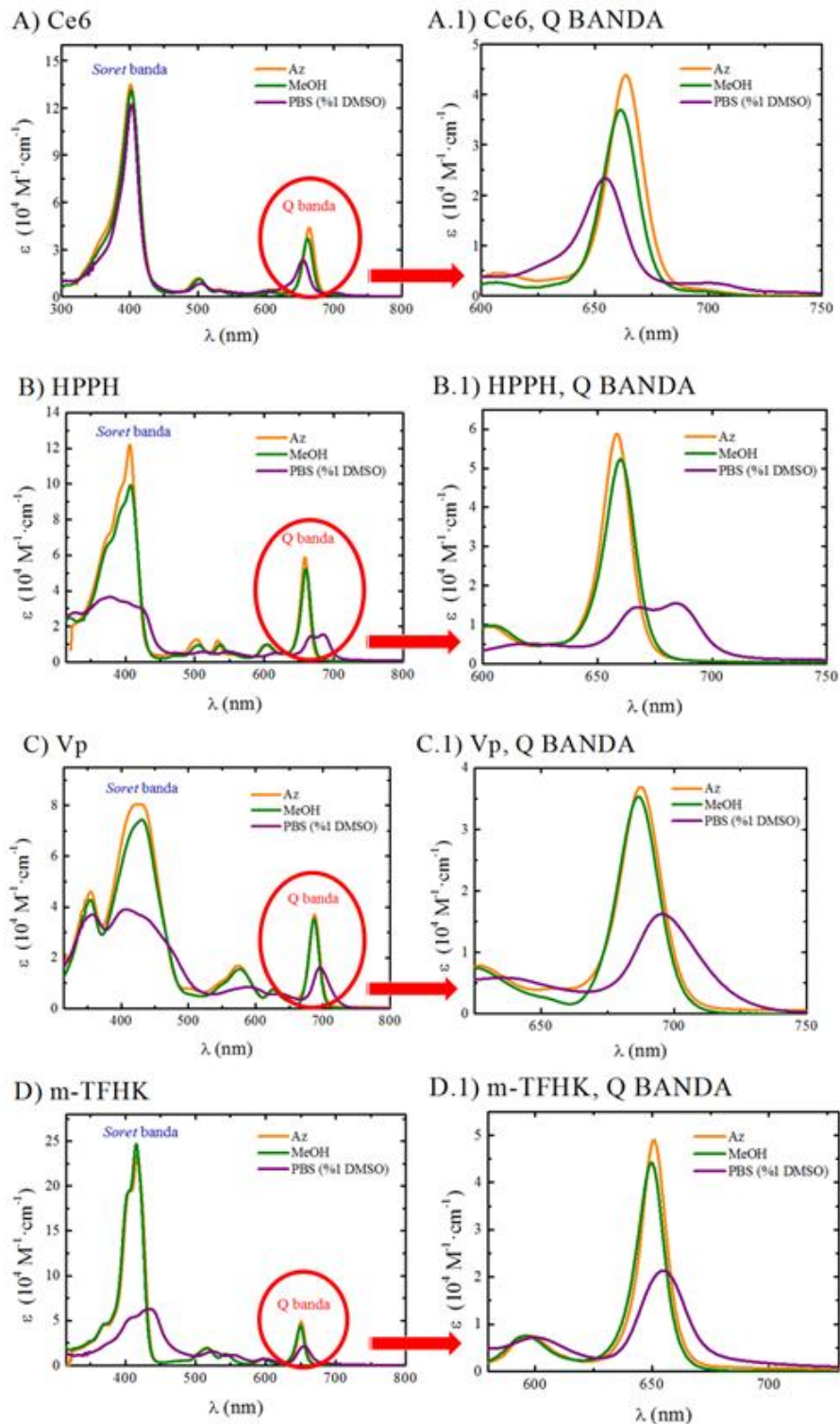
3. Taula- Klorina familiako FS ezberdinen propietate fotofisikoak, Az, MeOH eta PBS(%1 DMSO disolbatzaileetan. : λ_{sur} , xurgapen maximoko uhin luzera Q bandan (± 1 nm); ϵ , xurgapen koefiziente molarra ($\pm \%2$); ϕ_{flu} , fluoreszentiaren etekin kuantikoa ($\pm \%5$, oinarrizko igorpen bandaren etekin kuantikoa, Ce6 erreferentzia eta 10.ekuazioa erabiliz kalkulatuta); λ_{em} , igorpen maximoko uhin luzera (± 1 nm); τ_{flu} , fluoreszentiaren bizitza denbora ($\pm \%2$); k_{flu} , fluoreszentiaren abiadura konstantea ($\pm \%5$, Ek. 12); $k_{e\text{-err}}$, prozesu ez erradiatzaileen abiadura konstantea ($\pm \%5$, Ek. 13).

	<i>Dis</i>	λ_{max} (nm)	ϵ ($10^4 M^{-1} cm^{-1}$)	ϕ_{flu}	λ_{em} (nm)	τ_{flu} (ns)	k_{err} ($10^8 s^{-1}$)	$k_{e\text{-err}}$ ($10^8 s^{-1}$)
Ce6	Az	664	5,22	0,17	670	4,77	0,36	1,64
	MeOH	661	4,39	0,20	667	4,88	0,40	1,75
	PBS	655	2,78	0,05	659	4,54 (72) 3,32 (28)	0,13	2,25
HPPH	Az	658	5,88	0,31	662	6,73	0,46	1,02
	MeOH	660	5,24	0,34	665	6,24	0,54	1,06
	PBS	-	-	-	-	-	-	-
Vp	Az	687	3,62	0,18	694	5,70	0,32	1,44
	MeOH	687	3,53	0,20	692	4,91	0,40	1,64
	PBS	-	-	-	-	-	-	-
m-TFHK	Az	651	4,90	0,20	655	8,70	0,25	1,15
	MeOH	650	4,41	0,15	653	8,68	0,44	1,21
	PBS	-	-	-	-	-	-	-

Dis: disolbatzailea.

- Banda zabala lortzen da UV-Ikus espektro osoan.

Bizitza denbora biesponentzialetan, bizi-denbora bakoitzaren kontribuzioa jarri da ehunekotan.



12. Irdia- Klorina familiako FS ezberdinen xurgapen-espektroak azetonoan (Az)(laranjaz), MeOH-tan (berdez) eta PBS (%1 DMSO)-tan (morez) bakoitzaren xurgapen koefiziente molarrekiko normalizatuta (Ek. 2). A) Ce6, B) HPPH, D) Vp, E) m-TFHK. Eskumako X.1 espektroek, ezkerreko espeziearen xurgapen espektroaren handipena adierazten dute Q banden zonaldean, TFD-rako interesgarria den zonaldea hain zuzen.

FS horiek PBS (%1 DMSO)tan aztertzean (Ikus 12.irudia), aldiz, Q banda horien maximok uhin luzera handiagotara lerratzen direla ikus daiteke; eta berriro ere, J-agregatuen sorrerari egotzi zaie, PBSan konposatu hauek duten disolbagarritasun falta dela eta. Bestetik, HPPHan kontrakoa antzeman da. Disolbatzailearen polartasuna igo ahala xurgapen maximoko uhin luzeran lerrakuntza batokromikoa ikusten da. Hau da, FS horren S_1 egoera elektronikoaren momentu dipolarra oinarritzko egoerarena baino txikiagoa da. Azkenengo FS horretan ere, PBS-tan Q banda distortsinatuta agertzen da, bi maximo erakusten ditu. Horren ondorioz, gorrirantz lerratzen den maximoa J agregatuei esleitu zaie.

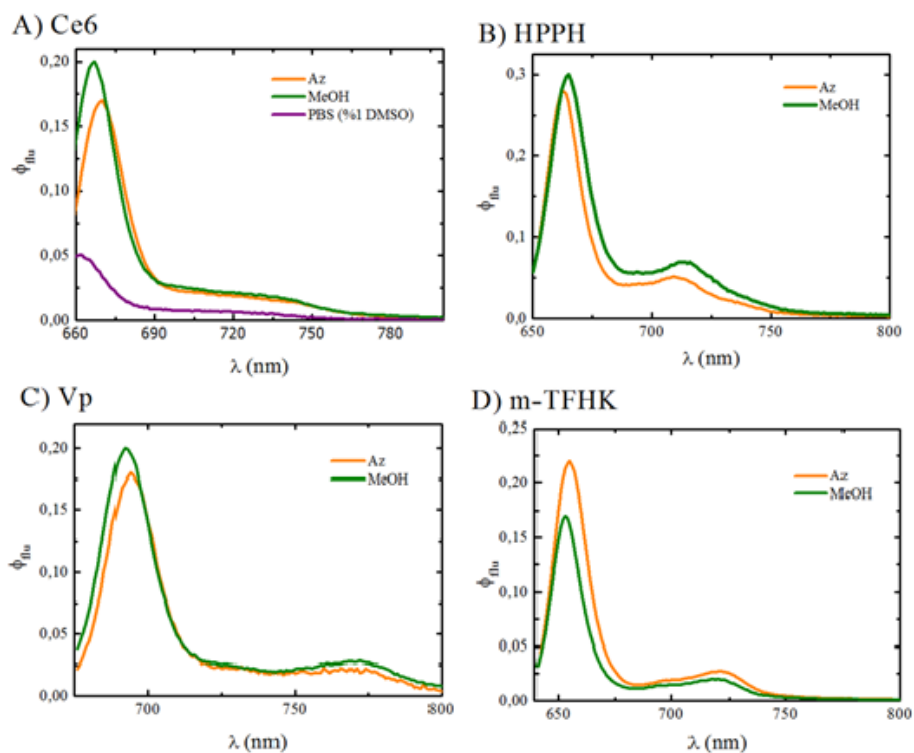
Horretaz gain, bibliografian aurreikusitakoa aztertu da, izan ere, Vp eta Ce6 FSen Q bandako uhin luzera maximoak aztertuz (Ikus 3. Taula). Ikus daiteke, Vp-aren benzoporfirin taldearen eratorria den eraztun monoazido auxokromoak, xurgapen maximoa TFDan interesekoa den zonalde gorrirantz lerratzen duela (1.3.2 atala).

Bestalde, espezie hauen fluoreszentiaren igorpen espektroak aztertzean (13. Irudia), metanol eta azetona disolbatzaileen arteko emaitzak aztertuz ikus daiteke, Ce6, Vp eta m-TFHK-en kasuan igorpen maximoko uhin luzera, uhin luzera txikiagotara lerratzen dira. Aldiz, HPPH energia txikiagoko uhin luzeretara lerratzen da (Ikus 13.irudia). Horrek bat egiten xurgapen espektroen desplazamenduekin eta aurretik azaldutako egoera elektronikoen momentu dipolarrarekin.

Etekin kuantikoen balioei dagokienez, FS guztien azetonan eta metanoletan lortutako balioak antzekoak dira, errorearen barne sartzen baitira. Bi disolbatzaile horien artean, beraz, ez da desberdintasun nabarmenik ematen, aurretik aipatu bezala, bi energia elektronikoen momentu dipolarretan ezberdintasun oso txikiak direlako. Hala ere, orokorrean PBS (%1 DMSO)-an konposatuen igorpena ia guztiz itzaltzen dela ikusi da (13A. irudia), fluoreszentiaren etekin kuantikoa nabarmen jatsi baita, gehienetan 0 edo 0-tik hurbil egonik (Ikus 3. Taula). Berriro ere, horren arrazoia agregatuen sorreraren egotzi zaio, agregatuen fluoreszentiaren etekin kuantikoa askoz txikiagoa edo nulua izaten baita (2.3 atala).

Esaterako, Ce6an, PBS-an fluoreszentzia neurtu ahal izan den konposatu bakarrean, etekin kuantiko oso txikia lortu den arren, bi bizitza denboren kontribuzioa dago (4.

taula). Horien artean, nagusia den monomeroaren fluoreszentzia bizitza denbora erregistratu da (4,54 ns %72-ko kontribuzioarekin), agregatuen kontribuzioarekin batera (3,32 ns %28-ko kontribuzioarekin). Gainera, fluoreszentiaren erdibizitzi errepertzen badiegu disolbatzailearen polaritatea murriztu ahala konposatu berberetarako, orokorrean jaitsiera bat ematen da guztietan (3. taula). Hau da, klorina fotosentikortzaileetan disolbatzailearen polaritatea igo ahala, prozesu ez erradiatzaileak gehiago faboratzen dira, horien abiadura konstanteak gora egiten baitute (1,64 izatetik azetonan 2,25 izatera PBS-an); fluoreszentiaren abiadura konstanteak behera egiten duen bitartean (0,36 izatetik 0,13 izatera, 3. Taula).



13. Irudia- Klorina familiako FS ezberdinen xurgapen-koefiziente molarrekiko (ϵ) normalizatutako xurgapen-espektoak, azetonan (Az)(laranjaz), MeOH-tan (berdez) eta PBS (% 1 DMSO)-tan (morez). A) Ce6 espezia da. B) HPPH espezia da. D) Vp espezia da eta E) m-THFK espezia da.

Aztertutako klorina familiako FS guztien artean HPPH espezieak fluoreszentiaren etekin kuantiko handiena du. Modu horretan, azertu diren FSen artean, kitzikatutako elektroietatik elektro horiek fotoi bat igorritik desaktibatzeneko probabilitate handiena erakutsiko duen konposatua da. Hala ere, horrek berez ez du esan nahi espezie

fluoreszentea izango denik, konposatu bakoitzak fotoiak xurgatzeko duen ahalmenaren menpe ere baitago. Bada, kasu horretan ere HPPH-ak erakusten du xurgapen koefiziente molarrik altuena, beraz, aztertutako FS-en artean konposaturik fluoreszenteena izango da.

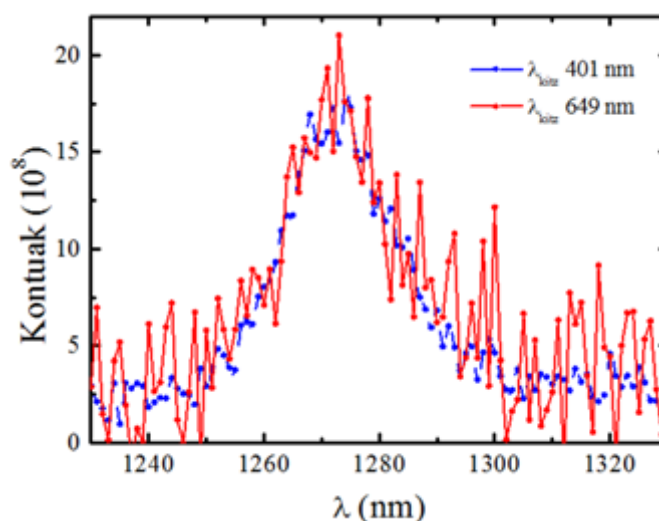
4.3 SINGLETE OXIGENOAREN ETEKIN KUANTIKOA

Hurrengo pausu batean, FS ezberdinen erabilgarritasuna TFD-an aztertzeko, singlete oxigenoaren etekin kuantikoak determinatu ziren. Hasteko, Ce6 fotosentikortzailearen singlete oxigenoaren etekin kuantikoa determinatu zen *Soret* eta Q bandetan (12a irudia), hau da, espektro elektromagnetiko ikusgaiaren zonalde urdinean ($\lambda_{kitz} = 401$ nm eta gorrian ($\lambda_{kitz} = 649$ nm) kitzikatuta. Emaitzei erreparatuz (4.taula), bi uhin luzera ezberdinetan kitzikatzean lortutako emaitzak konparagarriak eta oso antzekoak dira; izan ere, errorearen barruan sartzen dira. Ondorioz, alde batean zein bestean kitzikatuz, ez da eragin nabarmenik ikusten etekin kuantikoan eta 0,8 inguruko singlete etekin kuantikoa lortzen da bi kasuetarako. Izan ere, 2.1 atalean azaldu den moduan, *Soret* bandan kitzikatzean xurgatutako energia Q bandan xurgatutakoa baino handiagoa izan arren, bi kasuetan, energia maila berdinetik ematen da desaktibazio nagusia. Horren ondorioz, gainontzeko prozesuak azkarrak direla eta eraginik ez dutela ondorioztatu daiteke.

4. Taula.- Azetonan disolbatutako Ce6 espeziearen singlete oxigenoaren etekin kuantikoak, 401 nm-ko eta 649 nm-ko uhin luzerekin kitzikatzean.

<i>PS (Az)</i>	$\phi_{\Delta} (\lambda_{kitz} = 401 \text{ nm})$	$\phi_{\Delta} (\lambda_{kitz} = 649 \text{ nm})$
Ce6	0.77 ± 0.06	0.81 ± 0.05

Hemendik ondorioztatu daiteke, beste FSetarako ere banda batean zein bestean kitzikatu antzeko balioak lortuko direla. Hortaz, FS guztien neurketak *Soret* bandan kitzikatzen egin daitezke. Horrek hainbat abantaila ditu. Alde batetik, kontzentrazio baxuagoko disoluzioak prestatu daitezke, eta gertatu daitezkeen albo prozesuak ekiditen dira, horien artean, agregatuen sorrera, berxurgapena edota berigorpena. Beste alde batetik, lanpara zuriak espektroaren zonalde urdinean intentsitate handiagoa dauka, ondorioz, urdinean seinaleak erregistratzean zarata gutxiago izaten dute, 14. irudian ikus daitezkeen bezala.



14. Irudia- Ce6 fotosentikortzailearen oxigeno molekularren fosforeszentzia espektroa azetonan bi uhin luzera ezberdinetan kitzikatuta, $\lambda_{\text{kitz}}=401$ nm-tan (urdinez) eta $\lambda_{\text{kitz}}=649$ nm-tan (gorriz).

Beraz, behin hori ondorioztatuta, FS guztien singlete oxigenoaren etekin kuantikoak determinatu ziren, MeODtan (Ikus 3.2.3 atala).

5. Taula- MeODtan disolbatutako PS espezieen oxigenoaren etekin kuantikoak (Ek 18), *Soret* bandako uhin luzerekin kitzikatzean.

<i>FS (MeOD)</i>	ϕ_{Δ}
<i>PpIX ionikoa</i>	$0,86 \pm 0,08$
<i>PpIX neutroa</i>	$0,81 \pm 0,03$
<i>Ce6</i>	$0,77 \pm 0,08$
<i>HPPH</i>	$0,72 \pm 0,04$
<i>Vp</i>	$0,77 \pm 0,06$
<i>m-TFHK</i>	$0,84 \pm 0,04$

Orokorrean, singlete oxigenoaren etekin kuantikoak oso handiak izan dira, konposatu guztietarako $\phi_{\Delta} > 0,7$ balioak lortu dira (5. taula). Orokorrean porfirinek klorinek baino etekin kuantiko handiagoak dituzte beharbada horien oinarrizko egoeraren π sistema konjokatu zabalagoaren ondorioz. Hala ere, m-TFHK espeziea klorinen artean salbuespena da eta porfirinen antzeko etekin kuantikoa erakusten du. Seguruenik, bere π sistema konjokatuaren ondorioz lortzen da hain etekin handia (1. Taula). Izan ere, aurretik aipatu den moduan egitura molekularrean horrelako ezaugarriak izateak

sistemen arteko gurutzaketa desaktibazioak nabarmentzen ditu eta singlete oxigenoaren sorrera bultzatzen du. Hala ere, aipatzekoa da TFDan aplikatzeko oso etekin kuantiko onak lortu direla FS guztietarako, eta balio guztiak onargarriak dira. Horien artean balio onena PpIX ionikoak ($\phi_{\Delta} > 0,86$) erakutsi du.

4.4 TFD APLIKATZEKO ERAGINKORTASUNA

Fotosentikortzaile hauen eraginkortasuna terapia fotodinamikoan aztertzeke, hasteko, PpIX espezieak baztertu dira. Nahiz eta konposatu hauen singlete oxigenoaren etekin kuantikoak oso altuak izan, espezie hauek espektroaren zonalde urdinean erakusten dute xurgapenik altuena, eta horiek aktibatzeke bertan kitzikatu behar dira. Terapia fotodinamikorako, ordea, espektroaren zonalde gorria interesatzen zaigu, eta zonalde horretan konposatu hauek ez dute nahikoa xurgatzen. Horrexegatik, azken konparaketa horretan ez dira kontuan hartu.

Beraz, aukeratu diren beste fotosentikortzaileen artean eraginkorra zein den zehazteke dirdira eta gaitasun fototoxikoa kalkulatu dira (Ikus 2.3 atala Ek.20 eta Ek.23). Emaitzak 6.taulan adierazi dira.

HPPH eta m-TFHK fotosentikortzaileek, MeOH-tan, dirdira eta gaitasun fototoxiko balio handienak eta onenak dituzte (Ikus 6. Taula). Hala ere, orokorrean familia horretako PS guztien dirdira eta gaitasun fototoxikoaren balioak, $1-2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ eta $3-4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ inguruan daude, hurrenez hurren. Horrenbestez, lau fotosentikortzaileek terapia fotodinamikoan aplikatzeko balio emaitza egokiak erakutsi dituztela ondorioztatu daiteke. Horrenbestez, aplikazio horretarako farmako teragnostikoak direla ondorioztatu daiteke.

Disolbatzaile polarretan erakusten duten solugarritasuna eta propietate fototoxikoak oso interesgarriak dira. Hala ere, aipatzekoa da lortutako emaitzak oso onak badira ere, oraindik ez dela nahikoa. Izan ere, MeOH-a ezin da gorputzean kantitate handietan injektatu, toxikoa baita, eta, aurretik ikusi den moduan uraren antzekotasun handiagoa duten disolbatzaileetan (PBS) propietate horiek galtzen dituzte. Horrenbestez, arazo horiek konpontzeke hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak garatzen ari dira dagoeneko.

6. Taula.- Klorina familiako PSen dirdira (*D*, Ek. 20) eta gaitasun fototoxikoa (*GF*, Ek. 21).

<i>PS (MeOD)</i>	<i>D (10⁴ M⁻¹cm⁻¹)</i>	<i>GF (10⁴ M⁻¹cm⁻¹)</i>
<i>Ce6</i>	0,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4
<i>HPPH</i>	1,8 ± 0,3	3,8 ± 0,2
<i>Vp</i>	0,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2
<i>m-TFHK</i>	1,7 ± 0,5	3,7 ± 0,2

Horretaz gain, PSen ezaugarri garrantzitsuak diren fotosentikortzaileen triplete egoeraren bizitza denbora eta fotoegonkortasuna determinatzea interesgarria izango zen horien eraginkortasuna hobeto zehaztu ahal izateko.

5 ONDORIOAK

Horrenbestez, porfirina eta klorina familiako sei konposatuen disolbagarritasuna eta ezaugarri fotofisikoak disolbatzaile ezberdinetan aztertu ondoren, hurrengo ondorioztatu daiteke:

- Porfirina eta Klorina familiako konposatuetan disolbagarritasun arazoak eta agregatuen formazioa ikusita, horiek gorputzean injektatzeko eta TFDan aplikatu ahal izateko horien solugarritasuna ezinbestez hobetu behar da.
- Aurreikusi den moduan, PpIX espezieek xurgapen koefiziente molar handiena *Soret* bandan bakarrik erakutsi dute. Klorina espezieek, aldiz, bai *Soret* bai Q bandan xurgapen koefiziente onargarria erakutsi dute, euren egitura kimikoaren simetria galeraren ondorioz. Horrenbestez, PpIX fotosentikortzaileak intereseko aplikaziorako baztertuak izan dira, *Soret* bandako uhin luzerek azalean sarkortasun txikia dutelako.
- Auxokromoei dagokienez, alde batetik, benzoporfirin taldearen eratorria den eratzun monoazido funtzio taldeak xurgapen banda interesekoa den uhin luzera handioagoetara (≈ 690 nm) lerratzen duela ikusi da. Bestetik, fenol taldeen π sistema konjokatuak singlete oxigenoaren etekin kuantikoa nabarmenki handitu duela ondorioztatu daiteke.
- Klorina guztiak egokiak dira TFDan aplikatzeko, dirdira zein gaitasun fototoxikoari dagokionez, eraginkortasun egokiak erakutsi baitituzte. Beraz, FS teragnostikoak direla ondorioztatu daiteke. Izan ere, dirdira ahalmenaren bidez farmakoen ituraketa kontrolatu daiteke, eta gaitasun fototoxiko handia izank minbizi zeluletan kalteak eragiten ditzakete.

Hala ere, aukeratutako PBS disolbatzailean FSen desaktibazio prozesu ez erradiatzaileak nagusitzen direnez, agregatuen sorrera eta disolbatzailearen ondorioz, hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak garatzeko beharra ikusten da. Izan ere, gorputzean ura izanda disolbatzaile nagusia, FS hauek erakutsi duten dirdira zein gaitasun fototoxikoa galduko lukete. Horren aurrean, porfirina eta batez ere klorina egitura hauetan oinarritutako hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaileak garatzea irtenbide ona izan liteke, disolbagarritasuna hobe dezaketen funtzio taldeak gehituta.

Adibidez, bide hori jarraitu nahian, Euskal Herriko Unibertsitateko Espektroskopia Molekularra taldean Ce6 fotosentikortzailea NH₂-Silize nanopartikuletan kapsulatu zen. Ituraketa eta egonkortasuna hobetzeko nanopartikula horien gainazalean azido folikoa eta polietilen glikola (PEG), hurrenez hurren, gehitu ziren. Modu horretan, solugarritasun, ituraketa eta propietate fototoxiko egokiak erakusten zituen hirugarren belaunaldiko fotosentikortzaile egonkorra lortu zen, bigarren belaunaldiko FS batetik abiatuta.¹⁷ Beraz, estrategia aproposa da propietate fotofisiko egokiak dituzten etorkizun oparoko fotosentikortzaileak garatzeko.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Granados García, M.; Arrieta Rodríguez, O. G.; Hinojosa Gómez, J. *Tratamiento del cáncer*; Editorial El Manual Moderno: México D.F, 2016.
2. Mfouo-Tynga, I. S.; Dias, L. D.; Inada, N. M.; Kurachi, C. Review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2021**, *34*, 102091.
3. Salas, D.; Peiró, R. Evidencias sobre la prevención del cáncer. *RESP.* **2013**, *15*, 66-75.
4. Las cifras del cáncer en España 2023. *SEOM.* **2023**, 6-33.
5. European Commission: Europe's Beating Cancer Plan - Launch of European Cancer Imaging Initiative. *Targeted News Service* **2023**.
6. Dos Santos, A. I. F.; De Almeida, D. R. Q.; Terra, L. F.; Baptista, M. c. S.; Labriola. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2019**, *2019*, 131-150.
7. Farkona, S.; Diamandis, E. P.; Blasutig, I. M. *BMC Med.* **2016**, *14*, 73.
8. Baskaran, R.; Lee, J.; Yang, S. *Biomater. Res.* **2018**, *22*, 25.
9. Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. *Chem. Soc. reviews* **2011**, *4*, 34-362.
10. Plekhova, N.; Shevchenko, O.; Korshunova, O.; Stepanyugina, A.; Tananaev, I.; Apanasevich, V. *BIEBG.* **2022**, *9*, 82.
11. García Fresnadillo, D. *Revista Científica. TECNIA* **2017**, *20*, 5.
12. Prieto-Montero, R.; Prieto-Castañeda, A.; Sola-Llano, R.; Agarrabeitia, A. R.; García-Fresnadillo, D.; López-Arbeloa, I.; Villanueva, A.; Ortiz, M. J.; Moya, S.; Martínez-Martínez, V. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96*, 458-477.
13. Abrahamse, H.; Hamblin, M. R. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 347-364.
14. Mironov, A. *Russ. Chem. Bull.* 1996, *2728*, 150-164.
15. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915.
16. Lee, C.; Hsu, R.; Chen, H.; Wong, T. *Molecules.* **2020**, *25*, 5195.
17. Prieto Moreno, R. Novel systems for bioimaging and photodynamic therapy: BODIPY dyes and silica-based nanocarriers. Ph.D.Thesis, University of the Basque Country, Leioa, Viz, **2020**.
18. Wöhrle, D.; Hirth, A.; Bogdahn-Rai, T.; Schnurpfeil, G.; Shopova, M. *Russ. Chem. Bull.* **1998**, *47*, 807-816.
19. Koczorowski, T.; Glowacka-Sobotta, A.; Michalak, M.; Mlynarczyk, D. T.; Güzel, E.; Goslinski, T.; Sobotta, L. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 3933.
20. Desgranges, S.; Juzenas, P.; Vasovic, V.; Gederaas, O. A.; Lindgren, M.; Warloe, T.; Peng, Q.; Contino-Pépin, C. *BIOMID.* **2022**, *10*, 423.

21. Myrzakhmetov, B.; Arnoux, P.; Mordon, S.; Acherar, S.; Tsoy, I.; Frochot, C. *Pharmaceuticals*. **2021**, *14*, 138.
22. Lozovaya, G. I.; Masinovskiy, Z.; Sivash, A. A. *Orig. Life Evol. Biosph.* **1990**, *20*, 321-330.
23. Ericson, M. B.; Grapengiesser, S.; Gudmundson, F.; Wennberg, A.; Larkö, O.; Moan, J.; Rosén, A. *LIMS*. **2003**, *18*, 56-62.
24. Cunderlíková, B.; Gangeskar, L.; Moan, J. *J. Photochem. Photobiol. B, Biology* **1999**, *53*, 81-90.
25. Zhang, D.; Wu, M.; Zeng, Y.; Wu, L.; Wang, Q.; Han, X.; Liu, X.; Liu, J. *ACS*. **2015**, *7*, 8176-8187.
26. Akhlynina, T. V.; Jans, D. A.; Rosenkranz, A. A.; Statsyuk, N. V.; Balashova, I. Y.; Toth, G.; Pavo, I.; Rubin, A. B.; Sobolev, A. S. *JBC*. **1997**, *272*, 20328-20331.
27. Bellnier, D. A.; Greco, W. R.; Nava, H.; Loewen, G. M.; Oseroff, A. R.; Dougherty, T. J. *Cancer Chemother. and Pharmacol.* **2006**, *57*, 40-45.
28. Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue. *Photochemistry and photobiology* **2020**, *96*, 506-516.
29. Schmidt-Erfurth, U.; Hasan, T. Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of ophthalmology* **2000**, *45*, 195-214.
30. Senge, M. O.; Brandt, J. C. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 1240-1296.
31. Kuntsche, J.; Freisleben, I.; Steiniger, F.; Fahr, A. Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *40*, 305-315.
32. Wiehe, A.; Senge, M. O. *Photochem. Photobiol.* **2023**, *99*, 356-419.
33. Giovannetti, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. Ph.D.Thesis, University of Camerino, Camerino, MC, **2012**.
34. Buhong, L.; Lisheng, L.; Huiyun, L.; Brian C. W. *J. Biophotonics*. **2016**, *9*, 1317-1323.
35. Merkel, P. B.; Nilsson, R.; Kearns, D. R. *J. Amer. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1030-1031.
36. Nasri, S.; Guergueb, M.; Brahmi, J.; Al-Ghamdi, Y. O.; Molton, F.; Loiseau, F.; Turowska-Tyrk, I.; Nasri, H. *Molecules* **2022**, *27*, 8866.

