

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA II

(Físico-Química Farmacéutica)



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de fármacos (emodina,
ketorolaco, indometacina y piroxicam) sobre
nanopartículas metálicas mediante
espectroscopía molecular (SERS y MEF)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Margarita Hernández González

DIRECTORA

María Paz Sevilla Sierra

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Física II (Físico-Química Farmacéutica)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Caracterización de fármacos (emodina,
ketorolaco, indometacina y piroxicam) sobre
nanopartículas metálicas mediante espectroscopía
molecular (SERS y MEF)**

Margarita Hernández González

Memoria para optar al grado de doctor

Dirigida por la Dra. M. Paz Sevilla Sierra

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA II (FISICOQUÍMICA
FARMACÉUTICA) UCM
INSTITUTO DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA (CSIC)



Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Física II (Físico-Química Farmacéutica)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**Caracterización de fármacos (emodina,
ketorolaco, indometacina y piroxicam) sobre
nanopartículas metálicas mediante espectroscopía
molecular (SERS y MEF)**

Memoria presentada por Margarita Hernández González para optar
al grado de doctor

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de una colaboración entre el Departamento de Espectroscopía Nuclear, Vibracional y de Medios Desordenados del Instituto de Estructura de la Materia (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) y el Departamento de Química Física II (Físicoquímica Farmacéutica) de la UCM, bajo la dirección de la Dra. M. Paz Sevilla Sierra, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Física II (Físicoquímica Farmacéutica) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Doctora Vinculada al CSIC.

Madrid, 2016

“El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos”.

Albert Einstein.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al CSIC y a la UCM las facilidades para realizar los trabajos que se presentan en esta memoria, y a la Comunidad de Madrid y al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación recibida con los proyectos MICROSERES, POEMS y NANOBIOOTHER. Asimismo, quiero agradecer al Dr. Guillermo Antonio Mena Marugán, Director del Instituto de Estructura de la Materia y al Dr. Santiago Sánchez Cortés, Jefe del Departamento de Espectroscopía Nuclear, Vibracional y Medios Desordenados, su apoyo.

Quiero dar las gracias a la Profesora Paz Sevilla Sierra, del Departamento de Química Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, directora de este trabajo. Muchas gracias porque está claro que sin ti esta Tesis no habría sido posible. Gracias por tener siempre esa sonrisa, por animarme y ayudarme a ver las cosas desde el lado más positivo y optimista, por tu paciencia, tus grandes consejos y por todo lo que he podido aprender de ti.

GRACIAS a la Profesora Concepción Domingo Maroto, del Departamento de Física Molecular del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, actualmente jubilada. Muchas gracias por confiar en mí desde el principio y darme la oportunidad de trabajar contigo. Por tu tiempo, dedicación, por introducirme en el mundo de la espectroscopía y por enseñarme tantas y tantas cosas, no podía haber tenido a nadie mejor, pero sobre todo, gracias por tu cercanía, generosidad y cariño.

Al Profesor José Vicente García Ramos, del Departamento de Espectroscopía Nuclear, Vibracional y Medios Desordenados. Gracias por tu disponibilidad, cercanía y ayuda siempre que lo necesitaba, por esas reuniones de horas y horas en las que tanto aprendía y por darme con frecuencia la respuesta a aquello que estaba buscando.

Gracias a todos mis compañeros del Departamento de Espectroscopía Nuclear, Vibracional y Medios Desordenados, por facilitarme tanto las cosas y hacer más agradables las horas de trabajo. Al Dr. José Antonio Sánchez Gil por su cercanía y por contribuir a que las reuniones no fueran solo por trabajo, gracias por todas esas cañas compartidas. A la Dra. Sagrario Martínez Ramírez por su sonrisa, consejos y gran disposición. A la Dra. María de la Vega Cañamares Arribas por su cariño y amistad. Al Dr. Luis Díaz Sol, muchas gracias por tu alegría, por todas esas conversaciones, por

aguantar y escucharme siempre que me ponía pesada con mis cosas, por tu paciencia cuando no hacía más que pedir y sobre todo por tu cariño, esas cosas se sienten y se agradecen mucho. A la Profesora Marina Molina Santos por contribuir al buen ambiente que había en el despacho y al Dr. Pedro Carmona Hernández por su simpatía y compartir conmigo el agua deuterada.

A Elisa Corda, mi compañera de aventuras y desventuras, gracias por tu sencillez, humildad y saber estar, por todos los buenos momentos que hemos compartido juntas, no podría haber tenido una compañera mejor. A Eduardo López Tobar, muchas gracias por explicarme el funcionamiento de todo, por tu gran disposición y paciencia infinita, por contar con tu ayuda siempre, a nivel profesional y personal, por estar siempre ahí. Al Dr. Ramón Paniagua Domínguez, gracias por tus conversaciones de las cuales siempre aprendía algo, gracias por eso y por muchas cosas más, me alegro de haber coincidido contigo. A la Dra. Adianez García Leis, gracias por tu alegría que siempre conseguía animarnos, por estar pendiente e interesarte cuando había algún problema. Al Dr. Luis Froufe, gracias por transmitir la pasión por lo que haces. A la Dra. Janka Kubackova, muchas gracias por tu energía, alegría, tu forma de ver la vida, y tu facilidad para sacarme una sonrisa aunque no fuera mi mejor día, eres difícil de olvidar.

También, muchas gracias a todos aquellos con los que he coincidido en el grupo aunque fuera por un corto periodo de tiempo, hemos vivido buenos momentos y he aprendido cosas de cada uno de ellos, gracias a Juana, Roger, Alessandro, Leo, Nuno, Kiara, Diego, Vera, Johana, Rocío...

Gracias a todas las personas con las que he coincidido en el Centro de Física Miguel Antonio Catalán, que, con pequeñas cosas o gestos, me han hecho más agradable mi estancia en él. Gracias a Juan Luis, Giorgio, Maite, Elena, Michela, Dani, Ana, Mikel, Carmen, Concha, Clara, Mari, Mohamed, Mikel Sanz, Nacho, Belén... Principalmente a Esther, por todos esos momentos de intensas medidas en el inVia y todas las conversaciones que nos permitió tener. Y a Roberta por todos los encuentros en los pasillos, medidas, por tantas y tantas risas.

En especial, quiero agradecer a los miembros del Departamento de Física Macromolecular del Instituto de Estructura de la Materia su cariño y acogida en esta nueva etapa, su ayuda, cercanía y por hacerme sentir una más desde el principio. Gracias al Profesor Tiberio Ezquerro Sanz y a la Dra. Esther Rebollar González (que aunque no pertenece a este grupo está muy presente en él) por este

nuevo periodo en el Instituto. Esther gracias por acordarte y pensar en mí. Gracias a la Dra. Mari Cruz García Gutiérrez, Dra. Aurora Nogales Ruiz, Dra. Amelia Linares Dos Santos, Jing, Álvaro y Edgar

Gracias también a mis compañeros del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, que aunque hace ya unos cuantos años que me fui de allí, sigue el cariño y contacto con algunos de ellos. A David y Carlos, mis compañeros de despacho, gracias por su acogida, interés y ayuda siempre que los necesitaba. A Marta y Juan por sus buenos consejos, cariño y por todos esos desayunos ricos que aún nos seguimos tomando. También a Mariola, Gonzalo, Justo, Bibiana y Óscar por compartir conmigo tantos buenos momentos y sobre todo cañas, muchas cañas fuera del Instituto.

A mis compis de Donosti, Andrea, Denis, Marta, Marta Sanz, Leo, Ana, Ana Percebón, María Sanromán, Quique, Paolin... por hacer de mi estancia allí una gran experiencia y animarme en el principio de la escritura de esta Tesis.

Muchas gracias a mis amigos, los de siempre, aquellos que han compartido y formado parte de mi vida, la mayoría, desde que éramos unos niños. Mónica, mi compañera en tantas idas y venidas, mi confidente y junto a Patricia y Juan, las personas que mejor me conocen y entienden, Carmen y Silvina, gracias a todos porque simplemente no podéis ser mejores. También a Anita, Merche, Ana Bernal, Cris, María, Miguel, Ángel, Adrián, Pipo y demás amigos de Zaragoza y Aisa.

A mi familia por entender mis ausencias y apoyarme siempre, principalmente a mi abuela por sus consejos, yaya si voy a estar tan bien como tú, yo también quiero llegar a los 97 años, y los que te quedan. Noe muchas gracias por tu cariño, apoyo, ayuda, estar siempre que lo necesito y hacerme las cosas mucho más fáciles en Madrid. Una de las cosas más positivas de mi estancia aquí ha sido el permitirme estar más cerca de vosotras, conoceros y sobre todo compartir los primeros años de mi ahijada, ya una mujercita, y de Berta, ha sido todo un regalo.

A Ricardo por reunirlo todo y hacerme feliz.

Y el agradecimiento más importante, como siempre, a mis padres por dármelo todo. Nada sería posible sin vosotros.

A mis padres, María Jesús y Víctor.

ÍNDICE

Summary	21
Resumen	27
Listado de símbolos y acrónimos	33
Listado de figuras	37
Listado de tablas	41
1. Introducción	45
2. Objetivos	51
3. Fármacos	55
3.1. Emodina	55
3.2. Ketorolaco	57
3.3. Indometacina	58
3.4. Piroxicam	59
4. Espectroscopías amplificadas por superficies metálicas	63
4.1. Espectroscopía SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering)	64
4.1.1. Mecanismos de intensificación del efecto SERS	65
4.1.2. Factores experimentales que influyen en la intensificación de los espectros SERS	70

4.1.3. Sustratos para espectroscopía SERS	74
4.2. Espectroscopía MEF (Metal Enhanced Fluorescence)	76
4.2.1. Fluorescencia de moléculas sobre nanopartículas metálicas	79
4.2.2. Mecanismos de intensificación del efecto MEF	80
4.2.3. Tipos de interacción metal-fluoróforo.....	81
5. Parte Experimental	85
5.1. Materiales	85
5.2. Instrumentación.....	86
5.3. Síntesis de coloides metálicos	87
5.3.1. Coloides de plata	88
5.3.2. Coloides de oro	89
5.3.3. Sistemas “Core-Shell”	90
5.4. Preparación de muestras	91
5.4.1. Muestras para espectroscopía	91
5.4.1.1. Emodina	91
5.4.1.2. Ketorolaco	92
5.4.1.3. Indometacina	92
5.4.1.4. Piroxicam.....	93
5.4.2. Muestras para microscopía electrónica de transmisión	93
5.4.3. Muestras para microscopía electrónica de barrido	93

6. Resultados y discusión	97
6.1. Emodina.....	97
6.1.1. Silicio Poroso	97
6.1.2. “Core-Shell”	109
6.2. Ketorolaco.....	117
6.3. Indometacina.....	127
6.4. Piroxicam.....	133
7. Conclusiones.....	149
8. Bibliografía	153
9. Anexo.....	167

Summary

Drug characterization (emodin, ketorolac, indomethacin and piroxicam) over metal nanoparticles through molecular spectroscopy (SERS and MEF)

Nanotechnology allows matter manipulation at nanometric level, size at which quantic effects are important. Considering molecular spectroscopy, specifically Raman and fluorescence spectroscopy, the use of metal nanoparticles (NPs), gives origin to emission signal enhancement coming from the sample, due to the surface plasmon located over such NPs (LSP, Localized Surface Plasmon). This effect has allowed the development of new spectroscopic techniques of high sensitivity, whose acronyms are SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) and, SEF (Surface Enhanced Fluorescence) or MEF (Metal Enhanced Fluorescence). The intensification of the Raman or fluorescence signal of a molecule allows a greater sensitivity in its direction, being possible, additionally, to use such signals to get images of its spatial distribution in synthetic or biological samples. These techniques have multiple applications in the scope of Health Scientific area among which there are the development of drug delivery systems and the treatment of diseases such as cancer, AIDS or Alzheimer, being those techniques the ones used in the work.

Mainly, due to its dielectric constant, the most used metals to produce NPs are silver and gold. The use of silver and gold nanostructures presents two great advantages: i) the molecules are easily adsorbed on metal surface without the need of functionalization or with a simple functionalization and ii) the LSPs of such NPs are resonant with lasers that emit at 532 nm and 785 nm respectively. Metal NPs can be modified to optimize its function, for instance, can be covered with a silicon layer forming nanostructures of “*core-shell*” type, that allow the enhancement of spectroscopic signal according to the thickness of the covering layer that separates the metal from the fluorophore. They can also be immobilized in the porous of certain material such as porous silicon (PSi), which is one of the mesoporous components presently used in nanotechnology. PSi is biocompatible and presents photoluminescence in visible region which allows registering the presence of non-fluorescent molecules immobilized in the surface of its nanoporous. Nevertheless, the existent handicap is due to the need of nanoporous functionalization in order to fix the majority of molecules.

The adverse reactions to a drug present an issue to its use, being in some cases so serious that lead to its prohibition and removal from the market. Many of side effects of a drug are related with the way they are dosed, since generally, the used dosages are of high efficiency but low selectivity. Improve the bioavailability of the drugs where it is needed and reduce their adverse reactions has led pharmaceutical industry and R+D laboratories towards the application of new technologies for the development of more efficient administration techniques.

The nanotechnology applied to the controlled delivery of drugs is one of the most promising markets and so, one of the most active scientific investigation fields. As a preliminary step, and to increase the effectiveness of these works, biopharmaceutical classification systems (BSC, Biopharmaceutics Classification System) consider essential the characterization of the drugs behaviour and its carrier systems in aqueous solution and under physiological conditions. The work described in this document is within this field.

Considering all that has been stated up so far, we deduce that the drug carrier systems must be biocompatible, biodegradable, non-toxic and stable in biological media. They must also maintain constant its drug loading/therapeutic agent and release it where it should act. They must also be easy to manufacture on a large scale and at a low cost. If at the same time, these systems can be detected on their way to the therapeutic targets using spectroscopic techniques, able to produce images, their interest is even greater. Nanosystems that can be used as drug carriers are varied. In this study we have used silver NPs (AgNPs), gold NPs (AuNPs), silver "*core-shell*" systems and AgNPs immobilized in P*Si* channels. The drugs chosen were: emodin (EM) and three Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs, ketorolac tromethamine (KT), indomethacin (IM) and piroxicam (PX). The characterization of the drug-carrier systems has been made using MEF (for EM) or SERS (KT, IM and PX). In the latter case, it has been necessary to obtain the Raman spectra in solution as they were not published.

The main goal of this Thesis is the spectroscopic characterization, using SERS techniques and/or MEF, of different drugs in nanocarrier systems of current interest (metal NPs, P*Si*) in different physiological conditions. These studies may provide a basis for the development of new systems for controlled drug release with future applications in medicine and pharmacy, which will allow a minimization of side effects and improved bioavailability of the studied drugs. For the correct interpretation of the SERS results,

previously it has been necessary to carry out an analysis of the infrared vibration and Raman spectra of the drugs in solid state and in solution.

To achieve these objectives, the experimental works presented in this document were performed. Previously to the study of EM infiltrated in PSi, the sheets of porous material were characterized by SEM microscopy, Raman spectroscopy and fluorescence emission. Fluorescence emission spectra of EM were obtained in different solutions which subsequently were infiltrated in the PSi. Finally MEF spectra of EM were acquired in: i) EM-AgNP complex infiltrated in PSi at vacuum and atmospheric pressure, ii) complex BSA/EM-AgNP infiltrated in PSi at vacuum and atmospheric pressure. These results allowed us to determine the amplification factor of fluorescence (EF) of the drug and the penetrability of the nanocarrier in the PSi pores. *Core-shell* systems were fabricated with silver core and SiO₂ coating with different coating thicknesses that were characterized by TEM microscopy. MEF spectra of adsorbed EM in the surface of these NPs were acquired, which allowed us to determine the thickness of maximum enhancement of the drug fluorescence.

In the case of KT, FT-IR and Raman spectra of the drug in solid state were acquired prior its study in dissolution. Its high solubility in water allowed us to obtain spectra of KT in aqueous solution at pHs 2.0 and 8.0, also acquired in solvents with different polarizabilities (SP). These results were used in the characterization of the SERS bands of the drug adsorbed on the surface of AgNPs at the proposed pHs.

For IM case, first, the FT-IR and Raman spectra of the drug in solid state were acquired. In aqueous solution it was not possible to obtain Raman spectra because of its low solubility, although it was possible to obtain spectrum in other solvents with different polarizabilities. Finally, SERS spectra in silver colloid were obtained for pH = 3.0 and pH = 6.0.

The results are completed by the Raman spectrum for solid PX. Then, Raman spectra were acquired in organic solvents since the drug is poorly soluble in water. Finally the SERS spectra of PX were obtained in silver and gold colloid at various pHs, 1.0, 2.0, 4.0 and 7.0.

The presented data allowed us to establish the following conclusions:

- The nanocarriers systems (NPs and PSi) presented herein are capable of adsorbing EM, KT, IM and PX drugs on its surface, without functionalization. The spectroscopic characterization of the drugs in the carrier system has been possible using enhanced spectroscopic techniques by metal surface. In aqueous medium and at the studied pHs, drugs are stable and suffer no degradation when adsorbing on the metal surface.

- For EM-AgNPs systems in PSi, it has been possible to discern the fluorescence signal of the drug from the one of the porous material. PSi acts selectively allowing the entry of the EM monomer but not of its aggregates, for the pore sizes used. A greater fluorescence enhancement factor, EF, is obtained when PSi sheets are loaded under atmospheric conditions and when the drug is bound to the BSA protein. After the first 30 days since the sample preparation, a considerable decrease of this factor is observed. The penetration of EM-NPs complexes into the pores of the PSi sheet is uniform when the solvent is methanol, whilst it shows a maximum accumulation area, located at 2-3 μm of the Si-PSi interface, when the solvent is H_2O .

- Core-Shell systems with a AgNPs core and a coating of silicon dioxide with thicknesses of 3 nm, 28 nm, 36 nm and 40 nm have been synthesized. The EM adsorbed on its surface presents MEF effect, being this maximum for a layer thickness of 36 nm. In systems with layer thickness of 3 nm the spectroscopic behavior of the system is similar to that obtained using uncoated AgNPs.

- It has been carried out the spectroscopic characterization (infrared and Raman) of KT in various solvents with different polarizability, and adsorbed on AgNPs at $\text{pH} = 2.0$ and $\text{pH} = 8.0$. No remarkable differences were observed in the Raman spectra of KT neither in the different solvents nor at different pHs, but affirmatively in the case of SERS spectra. From their analysis we can deduce that at $\text{pH} < \text{pK}_a$, the enol form of KT approaches the surface of the AgNPs by the aromatic ring, whereas at $\text{pH} > \text{pK}_a$ the pyrrolizidine group of the keto form is the closest to the surface.

- It has been carried out the characterization of IM in various solvents with different polarizability and adsorbed in AgNPs, at $\text{pH} = 3.0$ and $\text{pH} = 6.0$. IR and Raman spectra in solution are similar to those of the γ crystalline form. The analysis of SERS

spectra allows to deduce that at $\text{pH} < \text{pK}_a$ there are IM dimmers, placed perpendicular to the surface, with the benzoyl group close to it. However, at $\text{pH} > \text{pK}_a$, IM is in the monomer form and is placed flat to the metal surface.

- It has been carried out the characterization of PX, in different solvents with distinct polarity and adsorbed on AgNPs, at $\text{pH} = 1.0$, $\text{pH} = 2.0$, $\text{pH} = 4.0$ and $\text{pH} = 7.0$. In DMSO bands corresponding to the zwitterionic conformer appear, while in 1,4-Dioxane, 1-Propanol and EtOH there is the presence of the neutral closed form. The SERS spectra of PX in AuCT and AgHX are similar indicating in both cases the presence of the same conformer and the same orientation. At $\text{pH} = 1.0$ the bands of the open cationic and zwitterionic form are present, at $\text{pH} = 2.0$ and $\text{pH} = 4.0$ the dominant bands correspond to the zwitterionic form with an orientation parallel to the surface of the metal and at $\text{pH} = 7.0$ the analysis of the predominant bands, although weak, indicates the presence of the anionic form, with the pyridyl ring close and perpendicular to the metal surface.

Resumen

Caracterización de fármacos (emodina, ketorolaco, indometacina y piroxicam) sobre nanopartículas metálicas mediante espectroscopía molecular (SERS y MEF)

La nanotecnología permite la manipulación de la materia a nivel nanométrico, tamaño en el que los efectos cuánticos son importantes. En el caso de la espectroscopía, molecular, y más concreto, en la espectroscopía Raman y de fluorescencia, el uso de nanopartículas (NPs) metálicas, da lugar a una amplificación de la señal de emisión que proviene de la muestra, debido a los plasmones superficiales localizados sobre dichas NPs (LSP, Localized Surface Plasmon). Este efecto ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas espectroscópicas de alta sensibilidad, cuyos acrónimos en inglés son SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) y, SEF (Surface Enhanced Fluorescence) o MEF (Metal Enhanced Fluorescence). La intensificación de la señal Raman o de fluorescencia de una molécula permite una mayor sensibilidad en su detección, pudiéndose, además, utilizar dichas señales para obtener imágenes de su distribución espacial en muestras sintéticas o biológicas. Estas técnicas presentan múltiples aplicaciones en el área de las Ciencias de la Salud, entre las que se incluyen el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos y el tratamiento de enfermedades como cáncer, SIDA o Alzheimer, y son las que se han utilizado en este trabajo.

Debido, principalmente, a su constante dieléctrica, los metales más usados para fabricar NPs son la plata y el oro. El empleo de nanoestructuras de plata y oro presenta dos grandes ventajas: i) las moléculas se adsorben fácilmente sobre ellas sin necesidad de funcionalización o con una funcionalización sencilla y ii) los LSPs de dichas NPs son resonantes con láseres que emiten a 532 nm y 785 nm respectivamente. Las NPs metálicas pueden modificarse para optimizar su función, por ejemplo, pueden recubrirse de una capa de óxido de silicio formando nanoestructuras tipo “*core-shell*”, que permiten intensificar dicha señal en función del grosor de la capa de recubrimiento que separa el metal de las moléculas de fluoróforo. También pueden inmovilizarse en los poros de ciertos materiales, como el silicio poroso (PSi), que es uno de los componentes mesoporosos utilizado actualmente en nanotecnología. El PSi es biocompatible y presenta fotoluminiscencia en el visible lo que permite registrar la presencia de moléculas no fluorescentes inmovilizadas en la superficie de sus nanoporos. Sin embargo, la desventaja

que presenta se debe a la necesidad de la funcionalización de los nanoporos para poder fijar la mayoría de las moléculas.

Las reacciones adversas a un medicamento constituyen un problema para su uso, llegando en algunos casos a ser tan graves que provocan la prohibición y retirada del mercado del mismo. Muchos de los efectos secundarios de un fármaco están relacionados con la forma en que se administran ya que, en general, las dosis utilizadas son de una alta eficacia pero baja selectividad. Mejorar la biodisponibilidad de los fármacos allí donde se requiere y reducir sus reacciones adversas, ha llevado a la industria farmacéutica y a los laboratorios de I+D, hacia la aplicación de las nuevas tecnologías para el desarrollo de formas de administración más eficaces. La nanotecnología aplicada a la liberación controlada de fármacos es uno de los mercados más prometedores y, por consiguiente, uno de los campos de investigación científica más activo. Como paso previo, y para agilizar la eficacia de estos trabajos, los sistemas de clasificación biofarmacéutica (BSC, Biopharmaceutics Classification System) consideran imprescindible la caracterización del comportamiento de los fármacos y sus sistemas transportadores en disolución acuosa y en condiciones fisiológicas. El trabajo de esta memoria se enmarca dentro de este campo.

De todo lo expuesto hasta ahora, se deduce que los sistemas transportadores de fármacos han de ser biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y estables en medio biológico. Asimismo, han de mantener constante su carga de fármaco/agente terapéutico y liberarla allí donde debe actuar. Además, deben ser fáciles de fabricar a gran escala y con bajo costo. Si al mismo tiempo, estos sistemas pueden ser detectados en su recorrido hacia las dianas terapéuticas mediante técnicas espectroscópicas, con capacidad de producir imágenes, su interés resulta aún mayor.

Los nanosistemas que pueden emplearse como transportadores de fármacos son muy variados. En este estudio se han utilizado NPs de plata (AgNPS), NPs de oro (AuNPs), sistemas “*core-shell*” de plata recubiertos de dióxido de silicio, y AgNPs inmovilizadas en canales de PSi. Los fármacos elegidos han sido: emodina (EM), así como tres AntiInflamatorios No EsteroideoS, AINES, en inglés NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), ketorolaco trometamina (KT), indometacina (IM) y piroxicam (PX). La caracterización de los sistemas fármaco-transportador se ha hecho usando espectroscopía MEF (para EM) o SERS (para IM, KT y PX). En el caso de estos últimos,

ha sido necesario obtener los espectros Raman en disolución ya que no estaban publicados.

El objetivo principal de esta Tesis es la caracterización espectroscópica, utilizando técnicas SERS y/o MEF, de diferentes fármacos en sistemas nanotransportadores de interés actual, (NPs metálicas, PSi) en distintas condiciones fisiológicas. Estos estudios pueden servir de base para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos con futuras aplicaciones en medicina y farmacia, que permitirán una minimización de los efectos secundarios y una mejor biodisponibilidad de los medicamentos estudiados. Para la interpretación correcta de los resultados SERS ha sido necesario llevar a cabo previamente un análisis de los espectros de vibración infrarrojo y Raman de los fármacos en estado sólido y en disolución.

Para alcanzar estos objetivos se realizaron los trabajos experimentales presentados en esta memoria. Como trabajo previo al estudio de EM infiltrada en PSi, se caracterizaron las láminas de material poroso por microscopía SEM, espectroscopía Raman y emisión de fluorescencia. Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia de EM en las diferentes disoluciones que posteriormente se infiltraron en el PSi. Finalmente se adquirieron espectros MEF de EM en: i) complejos EM-AgNP infiltrados en PSi a vacío y a presión atmosférica, ii) complejos BSA/EM-AgNP infiltrados en PSi a vacío y a presión atmosférica. Estos resultados nos permitieron determinar el factor de amplificación de la fluorescencia (EF) del fármaco y la penetrabilidad del nanotransportador en los poros del PSi. Se fabricaron sistemas “*core-shell*” con núcleo de plata y recubrimiento de SiO₂, con distintos espesores de recubrimiento, que fueron caracterizados por microscopía TEM. Se adquirieron espectros MEF de EM adsorbida en la superficie de estas NPs lo que nos permitió determinar el espesor de amplificación máxima de la fluorescencia del fármaco. En el caso de KT se adquirieron espectros FT-IR y Raman del fármaco en estado sólido previamente al estudio en disolución. Su alta solubilidad en agua nos permitió obtener espectros de KT en disolución acuosa a pHs 2,0 y 8,0, también se adquirieron en disolventes con distintas polarizabilidades (SP). Estos resultados se utilizaron en la caracterización de las bandas SERS del fármaco adsorbido en la superficie de AgNPs a los pHs propuestos. Para la IM, en primer lugar, se adquirieron los espectros FT-IR y Raman del fármaco en estado sólido. En disolución acuosa no fue posible obtener espectros Raman por su baja solubilidad, aunque si se obtuvo espectro en otros disolventes con diferentes polarizabilidades. Finalmente, se

obtuvieron espectros SERS en coloide de plata a pH = 3,0 y pH = 6,0. Los resultados se completan con el espectro Raman para el PX en estado sólido. Seguidamente se adquirieron los espectros Raman en disolventes orgánicos ya que el fármaco es muy poco soluble en agua. Por último se obtuvieron los espectros SERS de PX en coloide de plata y oro y a varios pHs, 1,0, 2,0, 4,0 y 7,0.

Los datos presentados nos permitieron establecer las siguientes conclusiones:

- Los sistemas nanotransportadores (NPs y PSi) presentados en esta memoria son capaces de adsorber los fármacos, EM, KT, IM y PX, en su superficie, sin necesidad de funcionalización. La caracterización espectroscópica de los fármacos en el sistema transportador ha sido posible con técnicas de espectroscopías intensificadas por superficie metálica. En medio acuoso y a los pHs estudiados, los fármacos son estables y no hay degradación de los mismos al adsorberse en la superficie metálica.

- Para los sistemas EM-AgNPs en PSi se ha podido discernir la señal de fluorescencia del fármaco de la del material poroso. El PSi actúa de forma selectiva permitiendo la entrada del monómero de EM pero no de sus agregados, para los tamaños de poro utilizados. Se obtiene un mayor factor de amplificación de la fluorescencia, EF, cuando las láminas de PSi se han cargado a presión atmosférica y cuando el fármaco va unido a la proteína BSA. Pasados los primeros 30 días desde la preparación de las muestras se observa una disminución considerable de dicho factor. La penetración de los complejos EM-NPs en los poros de la lámina de PSi es uniforme cuando el disolvente es metanol, mientras que presenta una zona de máxima acumulación, situada a 2-3 μm de la interfase Si-PSi, cuando el disolvente es H₂O.

- Se han sintetizado sistemas “*core-shell*” con un núcleo de AgNPs y un recubrimiento de dióxido de silicio con espesores de 3 nm, 28 nm, 36 nm y 40 nm. La EM adsorbida en su superficie presenta efecto MEF, siendo éste máximo para un espesor de capa de 36 nm. En sistemas con grosor de capa de 3 nm el comportamiento espectroscópico del sistema es similar al obtenido utilizando AgNPs sin recubrir.

- Se ha llevado a cabo la caracterización espectroscópica (infrarrojo y Raman) de KT en varios disolventes con distinta polarizabilidad, y adsorbido en AgNPs, a pH = 2,0 y pH = 8,0. No se han observado diferencias remarcables en los espectros Raman de KT en los diferentes disolventes ni a diferentes pHs, pero sí en los espectros SERS. De su

análisis se puede deducir que a $\text{pH} < \text{pKa}$, el KT en forma enólica se aproxima a la superficie de las AgNPs por el anillo aromático, mientras que a $\text{pH} > \text{pKa}$ el grupo pirrolizínico de la forma cetónica es el más próximo a la superficie.

- Se ha llevado a cabo la caracterización de IM en diversos disolventes con distinta polarizabilidad y adsorbido en AgNPs, a $\text{pH} = 3,0$ y $\text{pH} = 6,0$. Los espectros IR y Raman en disolución son similares a los de la forma cristalina γ . El análisis de los espectros SERS permite deducir que a $\text{pH} < \text{pKa}$ hay dímeros de IM, colocados perpendicularmente a la superficie, con el grupo benzoilo cerca de la misma. En cambio, a $\text{pH} > \text{pKa}$ la IM está como monómero y se coloca de forma plana a la superficie del metal.

- Se ha llevado a cabo la caracterización de PX, en diversos disolventes con distinta polarizabilidad y adsorbido en AgNPs, a $\text{pH} = 1,0$, $\text{pH} = 2,0$, $\text{pH} = 4,0$ y $\text{pH} = 7,0$. En DMSO aparecen bandas correspondientes al conformero zwitteriónico, mientras que en 1,4-Dioxano, 1-Propanol y EtOH hay presencia de la forma neutra cerrada. Los espectros SERS de PX en AuCT y AgHX son similares indicando, en ambos casos, la presencia del mismo conformero y la misma orientación. A $\text{pH} = 1,0$ están presentes las bandas de la forma catiónica abierta y zwitterionica, a $\text{pH} = 2,0$ y $\text{pH} = 4,0$ las bandas dominantes corresponden a la forma zwitteriónica con una orientación paralela a la superficie del metal y a $\text{pH} = 7,0$ el análisis de las bandas predominantes, aunque débiles, indica la presencia de la forma aniónica, con el anillo piridil próximo y perpendicular a la superficie metálica.

Listado de símbolos y acrónimos

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AgCT: Coloide de plata usando como reductor citrato trisódico.

AgHX: Coloide de plata usando como reductor hidrocloreuro de hidroxilamina.

AgNPs: Nanopartículas de plata.

AINES: AntiInflamatorios No EsteroideoS.

AuCT: Coloide de oro usando como reductor citrato trisódico.

AuNPs: Nanopartículas de oro.

BSA: Albúmina de suero bovina.

BSC: Sistemas de clasificación biofarmacéutica.

CCD: Dispositivo de carga acoplada (Charge Coupled Device).

CK2: Caseína quinasa

COX: Ciclooxygenasa.

DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]antraceno.

DMF: Dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTGS: Detector de sulfato de triglicina deuterado (Deuterated Triglycine Sulfate Detector).

EF: Factor de amplificación de la fluorescencia.

EM: Emodina.

EMA: Agencia Europea de Medicamentos.

EtOH: Etanol.

FRET: Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o transferencia lineal de energía (Fluorecence Resonance Energy Transfer).

Her-2/neu: Protooncogén del cromosoma 17 que codifica una glicoproteína con actividad tirosina quinasa.

HS: Puntos calientes (Hot Spots).

IM: Indometacina.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Janus JAK: Tirosina quinasa no específica.

KT: Ketorolaco trometamina.

LSP: Plasmón Superficial Localizado.

MEF: Fluorescencia amplificada por metales (Metal Enhanced Fluorescence).

MEM: Mecanismo de intensificación electromagnético.

MTC: Mecanismo de intensificación químico o de transferencia de carga.

NIR: Infrarrojo cercano (Near Infrared).

NPs: Nanopartículas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PMT: Tubos fotomultiplicadores (Photomultiplier tubes).

PSi: Silicio poroso.

PX: Piroxicam.

P56lck: Tirosina quinasa específica de leucocitos.

RAM: Reacciones Adversas al Medicamento.

SEF: Fluorescencia amplificada por superficies metálicas (Surface Enhanced Fluorescence).

SERS: Espectroscopía Raman amplificada por superficie (Surface-Enhanced Raman Scattering).

SERRS: Espectroscopía Raman resonante amplificada por superficie (Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering).

SM-SERS: Espectroscopía Raman amplificada por superficie de una molécula aislada (Single-molecule Surface-Enhanced Raman Scattering).

SP: Polarizabilidad.

TPA: 12-O-tetra-decanoilforbol 13-acetato.

Listado de figuras

Figura 3.1.	Representación de la estructura química de EM.	55
Figura 3.2.	Equilibrio ácido-base de la EM.....	56
Figura 3.3.	Representación de la estructura química de KT.....	57
Figura 3.4.	Representación de la estructura química de IM.	58
Figura 3.5.	Representación de la estructura química de PX.....	59
Figura 4.1.	Esquema del efecto Raman.	64
Figura 4.2.	Esquema de la intensificación de la sección eficaz Raman	67
Figura 4.3.	Esquema del mecanismo de transferencia de carga (MTC).....	70
Figura 4.4.	Diagrama de Jablonsky para la fluorescencia	77
Figura 4.5.	Diagrama de Jablonsky en ausencia y presencia de metal.....	79
Figura 5.1.	Espectrofotómetro Raman Renishaw inVia.	86
Figura 5.2.	Espectros de absorción UV-Visible de coloides de plata, AgHX y AgCT	88
Figura 5.3.	Imágenes SEM de AgNPs.....	89
Figura 5.4.	Espectro de absorción UV-Visible de coloide de oro, AuCT.	89
Figura 6.1.	Imágenes SEM de la sección transversal de láminas de PSi cargadas	97
Figura 6.2.	Imágenes SEM de la sección transversal de las láminas de PSi, sin carga, con diferente tamaño de poro.....	98
Figura 6.3.	Espectros Raman de la sección transversal de una lámina de PSi sin carga.....	99
Figura 6.4.	Espectros de emisión de fluorescencia de una lámina de PSi sin carga ..	100
Figura 6.5.	Espectros de emisión de fluorescencia de EM en disolución	101

Figura 6.6.	Espectros de emisión de fluorescencia a 3 μm de la interfase Si-PSi de diferentes láminas de PSi cargadas y sin carga.....	103
Figura 6.7.	Espectros de emisión de fluorescencia a 3 μm de la interfase Si-PSi de diferentes láminas de PSi cargadas con las muestras de EM.....	105
Figura 6.8.	Intensidad de emisión de fluorescencia de la sección transversal de diferentes láminas de PSi cargadas	108
Figura 6.9.	Imágenes TEM de los sistemas “ <i>core-shell</i> ” sintetizados	110
Figura 6.10.	Espectros de absorción UV-Visible de los sistemas “ <i>core-shell</i> ”	111
Figura 6.11.	Espectros MEF de EM en los sistemas “ <i>core-shell</i> ” sin lavar y en coloide AgCT	113
Figura 6.12.	Espectros SERS y MEF de EM en los sistemas “ <i>core-shell</i> ” lavados y en coloide AgCT	115
Figura 6.13.	Espectros Raman y FT-IR de KT en estado sólido	118
Figura 6.14.	Espectros de absorción UV-Visible de KT en disolución acuosa.....	120
Figura 6.15.	Espectros Raman de KT en disolución acuosa	121
Figura 6.16.	Espectros Raman de KT en distintos disolventes	122
Figura 6.17.	Espectros de absorción UV-Visible de KT en AgHX.....	123
Figura 6.18.	Espectros SERS de KT en coloide AgHX	124
Figura 6.19.	Representación de la forma de aproximación de las moléculas de KT a la superficie de las AgNPs	126
Figura 6.20.	Espectros Raman y FT-IR de IM en estado sólido.....	128
Figura 6.21.	Espectros de absorción UV-Visible de IM en disolución acuosa	129
Figura 6.22.	Espectros Raman de IM en distintos disolventes	130
Figura 6.23.	Espectros SERS de IM en coloide AgHX	131

Figura 6.24. Representación de la forma de aproximación de las moléculas de IM a la superficie de las AgNPs	132
Figura 6.25. Estructura y equilibrio acido-base de PX en disolución acuosa	134
Figura 6.26.a Espectro Raman de PX en estado sólido.....	135
Figura 6.26.b Espectro FT-Raman de PX en estado sólido.....	135
Figura 6.27. Estructuras de las formas polimórficas de PX	137
Figura 6.28. Espectro de absorción UV-Visible de PX en distintos disolventes.....	138
Figura 6.29. Espectros Raman de PX en distintos disolventes	139
Figura 6.30. Espectro Raman pre-resonante de PX en DMSO.....	141
Figura 6.31. Espectros SERS de PX en coloide AgHX	142
Figura 6.32. Espectros SERS de PX en coloide AuCT	144
Figura 6.33. Representación de la forma de aproximación de las moléculas de PX a la superficie de las AgNPs y AuNPs	145

Listado de tablas

- Tabla 1.** Factor de amplificación de fluorescencia, EF, de las muestras estudiadas .. 107
- Tabla 2.** Longitud de onda de absorción máxima en los espectros UV-Visible de los sistemas “*core-shell*” 112
- Tabla 3.** Asignación de las principales bandas Raman de β PX sólido y de las bandas SERS en coloide AgHX a diferentes pHs..... 167

1. Introducción

La nanotecnología permite la manipulación de la materia a nivel nanométrico, tamaño en el que los efectos cuánticos son importantes, confiriéndole así, características y propiedades especiales [1, 2]. Sus usos actuales son muchos y muy diversos [3] y van desde la producción de energía [4-6], hasta el desarrollo de nuevos materiales [7, 8] con aplicación en electrónica [9, 10], robótica [11, 12] o medicina [13, 14] entre otros campos. Entre sus principales aplicaciones en el área de las Ciencias de la Salud se incluyen el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos [15, 16] y el tratamiento de enfermedades como cáncer [17, 18], SIDA [19, 20] o Alzheimer [21]. En el caso de la espectroscopía, molecular, y más concreto en la espectroscopía Raman y de fluorescencia, el uso de nanopartículas (NPs) metálicas, da lugar a una amplificación de la señal de “*scattering*” o emisión que proviene de la muestra, debido a los plasmones superficiales localizados sobre dichas NPs (LSP, Localized Surface Plasmon), lo que ha permitido el desarrollo de nuevas técnicas espectroscópicas de alta sensibilidad, cuyos acrónimos en inglés son SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) [22, 23] y SEF (Surface Enhanced Fluorescence) o MEF (Metal Enhanced Fluorescence) [24]. Estas técnicas son las que se han utilizado en este trabajo.

Debido principalmente a su constante dieléctrica, los metales más usados para fabricar NPs son la plata y el oro [25]. El empleo de nanoestructuras de plata y oro presenta dos grandes ventajas: i) las moléculas se adsorben fácilmente sobre ellas sin necesidad de funcionalización o, en la mayoría de los casos, con una funcionalización sencilla [26] y ii) los LSPs de dichas NPs [27] son resonantes con láseres que emiten a 532 nm y 785 nm respectivamente, dando lugar a intensos espectros SERS y MEF. La intensificación de la señal Raman o de fluorescencia de una molécula permite una mayor sensibilidad en su detección, pudiéndose, además, utilizar dichas señales para obtener imágenes de su distribución espacial en las muestras sintéticas o biológicas [28].

Las NPs metálicas pueden modificarse para optimizar su función. En el caso de la señal de fluorescencia, pueden recubrirse de una capa de óxido de silicio formando nanoestructuras tipo “*core-shell*” [29], que permiten intensificar dicha señal en función del grosor de la capa de recubrimiento que separa el metal de las moléculas de fluoróforo. Estos sistemas minimizan los efectos de apagamiento (“*quenching*”) de la fluorescencia permitiendo que la amplificación sea la que domine el espectro.

El silicio poroso (PSi) es uno de los materiales mesoporosos utilizado actualmente en nanotecnología [30-34]. Igual que el dióxido de silicio [35, 36], el PSi es biocompatible [37, 38], pero en vez de eliminarse por excreción biliar hepática, se degrada en el organismo dando lugar a ácido ortosilícico, lo que le otorga una prioridad en el uso. Otra ventaja adicional del PSi es su fotoluminiscencia en la región visible del espectro electromagnético, que no tiene el dióxido de silicio. La fluorescencia del PSi fue descubierta por Canham en 1990 [39] y es de gran utilidad ya que permite registrar la presencia de moléculas no fluorescentes inmovilizadas en la superficie de sus nanoporos. Sin embargo, la desventaja de estos sistemas se debe a la necesidad de la funcionalización de los nanoporos para poder fijar la mayoría de las moléculas [40].

En 1972, la Organización Mundial de la salud (OMS) [41] definió las *Reacciones Adversas a un Medicamento* (RAM) como todo efecto perjudicial e indeseado que aparece con las dosis del fármaco utilizadas en el hombre, para la profilaxis, tratamiento o diagnóstico de una enfermedad. Estas RAM constituyen un problema frecuente en la práctica médica [42], llegando en algunos casos a ser tan graves que provocan la prohibición y retirada del mercado de algunos fármacos, además de producir un gran impacto en el presupuesto para Sanidad de un país. Los datos publicados indican que los ingresos hospitalarios de pacientes debidos a RAM se sitúan entre el 3% y el 5%, con una prevalencia de RAM en pacientes hospitalizados entre el 7% y el 15% y una mortalidad por esta causa entre el 0,05% y el 3,7% [43-47]. Muchos de los efectos secundarios de un medicamento están relacionados con la forma en que se dosifican ya que, en general, las dosis utilizadas son de una alta eficacia pero baja selectividad, puesto que los fármacos no actúan únicamente en el lugar donde se espera que se produzca su efecto, sino que se distribuyen por todo el organismo, generando problemas y alteraciones en sitios no deseados. Mejorar la biodisponibilidad de los fármacos allí donde se requiere y reducir sus reacciones adversas, ha llevado a la industria farmacéutica y a los laboratorios de I+D, hacia la aplicación de las nuevas tecnologías para el desarrollo de formas de dosificación más eficaces [48-50].

La nanotecnología aplicada a la liberación controlada de fármacos es, en la actualidad, uno de los mercados más prometedores [51, 52] y, por consiguiente, uno de los campos de investigación científica más activo, no solo en lo referente a diseño de nuevos sistemas nanotransportadores, sino también en lo que respecta a la caracterización químico-física de los mismos, así como a los procesos que tienen lugar durante el

transporte del fármaco y su liberación local en la diana deseada. Como paso previo, y para agilizar la eficacia de estos trabajos, los sistemas de clasificación biofarmacéutica [53, 54] (BSC, Biopharmaceutics Classification System) consideran imprescindible la caracterización del comportamiento de los fármacos y sus sistemas transportadores en disolución acuosa y en condiciones fisiológicas. Los BSC son herramientas muy útiles en la actualidad, ya que aceleran y mejoran los procesos de diseño y regulación de nuevos fármacos, o nuevos sistemas de liberación de los ya antiguos, por lo que ahorran gran cantidad de dinero a la industria farmacéutica. El trabajo de esta memoria se enmarca dentro de este campo.

De todo lo expuesto hasta ahora, se deduce que los sistemas transportadores han de ser biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y estables en medio biológico. Asimismo, han de mantener constante su carga de fármaco/agente terapéutico y liberarla allí donde debe actuar, a ser posible, de manera controlada temporalmente, retardando la liberación de los que son muy solubles en agua y acelerando la de los poco solubles. Además, deben ser fáciles de fabricar a gran escala y con bajo costo. Si al mismo tiempo, estos sistemas pueden ser detectados en su recorrido hacia las dianas terapéuticas mediante técnicas espectroscópicas, con capacidad de producir imágenes, su interés resulta aún mayor.

En el caso de que la molécula a estudiar sea un fármaco, el uso de NPs metálicas biocompatibles tiene una doble función. Por un lado, constituyen un sistema nanotransportador del medicamento y, por otro, permiten la obtención de señales espectroscópicas amplificadas, con gran sensibilidad en la detección y distribución del mismo en las células diana. Las NPs permiten así, solucionar problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional, pudiendo usarse, tanto sistemas NP-fármaco aislados, como formando parte de sistemas de liberación de varias etapas, que son más complejos.

Los nanosistemas que pueden emplearse como transportadores de fármacos son muy variados, ya que van de los polímeros biodegradables [55], a las NPs metálicas [56], pasando por liposomas [57], matrices inorgánicas mesoporosas [58-60] (como la sílice o el silicio poroso), etc. En este estudio se han utilizado NPs de plata (AgNPs), NPs de oro (AuNPs), sistemas “*core-shell*” de plata recubiertos de dióxido de silicio, y AgNPs inmovilizadas en canales de PSi. Para este último caso, se ha diseñado un nuevo procedimiento, que consiste en cargar el PSi con el sistema “AgNPs-fármaco”, de

manera que no ha sido necesario funcionalizar el PSi para inmovilizar el medicamento y, además, se ha podido monitorizar su presencia en los nanoporos mediante su señal MEF.

Los fármacos elegidos para este trabajo han sido: emodina (EM), que es una antraquinona usada tradicionalmente como laxante y antiinflamatorio a la que se le han descubierto también propiedades antitumorales y que ha sido estudiada previamente en el grupo de investigación [61-66] donde se ha realizado el trabajo, así como tres AntiInflamatorios No EsteroideoS, AINES, en inglés NSAIDs (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs), ketorolaco trometamina (KT), indometacina (IM) y piroxicam (PX). En el caso de PX sus efectos secundarios le han llevado a restricciones por parte de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) [67], lo que justifica el interés en disponer de nuevas formas de administración al paciente que mejoren su biodisponibilidad al alcanzar su diana terapéutica. La EM, IM y PX presentan una solubilidad muy baja en agua, salvo a pHs básicos, mientras que el KT es muy soluble a cualquier pH. En el caso de EM existen datos previos de fluorescencia, Raman y SERS que se han utilizado para abordar los estudios que se presentan en esta memoria. En el caso de los antiinflamatorios IM, KT y PX, tan solo se encuentran en la bibliografía datos de fluorescencia en disolución o de espectroscopía Raman en sólido.

La caracterización de los sistemas fármaco-transportador se ha hecho usando espectroscopía MEF (para EM) o SERS (para IM, KT y PX). En el caso de estos últimos, al no aparecer publicado su espectro Raman en disolución, se han realizado experimentos en diferentes disolventes.

El trabajo presentado en esta memoria puede servir de base para diseñar nanosistemas de liberación controlada de fármacos, en donde se incluyan los nanotransportadores aquí caracterizados.

2. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis es la caracterización espectroscópica, utilizando técnicas SERS y/o MEF, de diferentes fármacos en sistemas nanotransportadores de interés actual, (NPs metálicas, silicio poroso) en distintas condiciones fisiológicas. Estos estudios pueden servir de base para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos con futuras aplicaciones en medicina y farmacia, que permitirán una minimización de los efectos secundarios y una mejor biodisponibilidad de los medicamentos estudiados. Para la interpretación correcta de los resultados SERS ha sido necesario llevar a cabo previamente un análisis de los espectros de vibración infrarrojo y Raman de los fármacos en estado sólido y en disolución.

Los objetivos específicos son:

- Estudio por espectroscopía MEF de: i) complejos EM-AgNP infiltrados en PSi a vacío y a presión atmosférica, ii) complejos BSA/EM-AgNP infiltrados en PSi a vacío y a presión atmosférica. Determinación del factor de amplificación de la fluorescencia (EF) y de la penetrabilidad del nanotransportador en los poros del PSi.
- Fabricación de sistemas “*core-shell*”, con núcleo de plata y recubrimiento de SiO₂ (Ag - SiO₂) con distintos espesores de recubrimiento. Estudio por espectroscopía MEF de EM en dichos sistemas y determinación del espesor óptimo para obtener la mayor amplificación de la fluorescencia del fármaco.
- Estudio por espectroscopía SERS de KT adsorbido en coloide de plata AgHX, a diferentes pHs fisiológicos. Se ha llevado a cabo una caracterización previa de los espectros FT-IR y Raman del fármaco. Asignación de las bandas y propuesta de estructura de unión al metal.
- Estudio por espectroscopía SERS de IM adsorbida en coloide de plata AgHX, a diferentes pHs fisiológicos. Se ha llevado a cabo una caracterización previa de los espectros FT-IR y Raman del fármaco. Asignación de las bandas y propuesta de estructura de unión al metal.
- Estudio por espectroscopía SERS de PX adsorbido en coloide de plata AgHX y en coloide de oro AuCT, a diferentes pHs fisiológicos. Se ha llevado a cabo una caracterización previa de los espectros Raman del fármaco. Asignación de las bandas y propuesta de estructura de unión al metal.

3. Fármacos

En este trabajo se han estudiado cuatro moléculas distintas: EM una molécula tradicional en farmacia, usada como laxante y antiinflamatorio, que también posee propiedades antitumorales; y tres AINES, KT, IM y PX.

3.1. Emodina

La EM (*Rheum emodi*, romaza del Himalaya), según la IUPAC, 1,3,8-trihidroxy-6-metilantraceno-9,10-diona (figura 3.1.) es una antraquinona obtenida a partir del rizoma *Rheum palmatum L* [68], una planta muy utilizada en medicina tradicional china.

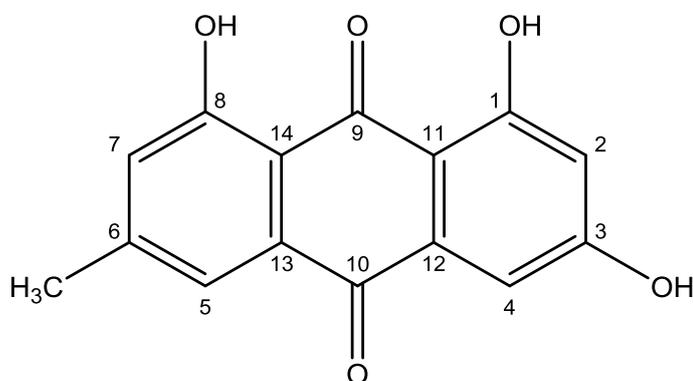


Figura 3.1. Representación de la estructura química de EM (1,3, 8-trihidroxy-6-metilantraceno-9, 10-diona).

Es un sólido amorfo de color amarillo, poco soluble en agua (solubilidad < 0,1 g / 100 mL) y muy soluble en disolventes orgánicos, carbonato sódico, disoluciones acuosas de hidróxido alcalino y de amoníaco o dimetilsulfóxido (DMSO) [69].

Esta antraquinona natural presenta, en disolución acuosa, un equilibrio ácido-base con dos pKa's, $pK_{a1} = 7,5$ y $pK_{a2} = 10,5$, correspondientes a la desprotonación en las posiciones 3 y 8 de la molécula (figura 3.2.) [62]. En disolución acuosa y a pHs inferiores a 7,5 se produce la agregación de la molécula debido a la interacción no covalente $\pi-\pi^*$ entre anillos aromáticos, lo que produce el apilamiento de los mismos; en disoluciones con pH básico la presencia de cargas negativas impide la interacción y, por tanto, la agregación.

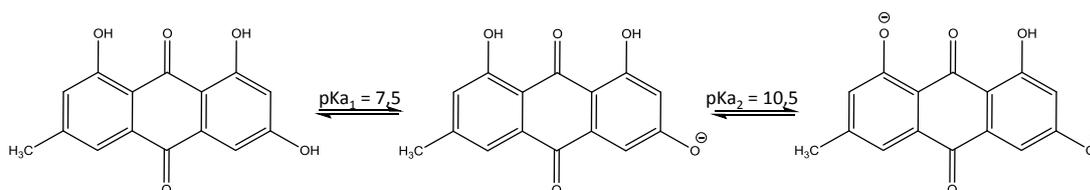


Figura 3.2. Equilibrio ácido-base de la EM.

En disolución ácida o neutra la EM presenta una banda ancha de absorción en el UV-Visible entre 350-500 nm con un máximo a 440 nm (λ_{\max}), responsable de su color amarillo. En condiciones alcalinas esta banda se desplaza a 450-600 nm, estando su λ_{\max} entre 520 - 555 nm, proporcionando un color rojo a la disolución [62].

Desde hace mucho tiempo se conocen sus efectos anti-bacterianos, anti-inflamatorios, anti-ateroescleróticos, vaso relajantes e inmunosupresores [70-72], además a lo largo de las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que la EM es un agente activo contra el cáncer [73, 74]. La antraquinona inhibe algunas proteínas quinasas como CK2 (caseína quinasa, implicada en el control del ciclo celular, reparación del ADN y otros procesos celulares) [75], P56lck (proteína tirosina quinasa específica de leucocitos), Her-2/neu (protooncogén del cromosoma 17 que codifica una glicoproteína con actividad tirosina quinasa) [76, 77] y Janus (JAK, tirosina quinasa no específica destinada a la regulación de la expresión genética) evitando la proliferación de las células cancerosas en muchos tipos de cáncer: mama, hepático [78, 79], pulmón [80-82], páncreas [83] y leucemia [84-86]. También inhibe la formación de papilomas cutáneos inducidos por el inmunosupresor DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]antraceno) junto con TPA (12-O-tetra-decanoilforbol 13-acetato) promotor del tumor [87].

No presenta efectos secundarios importantes aunque en ciertas ocasiones puede ocasionar con un uso prolongado en algunos pacientes, al igual que pasa con otras antraquinonas, náuseas o vómitos, provocando la disminución del apetito, diarreas repentinas.

3.2. Ketorolaco

El KT (figura 3.3.) se comercializa en forma de sal, ketorolaco trometamina. Es un AINE, y dentro de estos, pertenece al subgrupo pirrolacético (pirrolo-pirrol). Su nombre químico según la IUPAC es 5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-ácido carboxílico, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

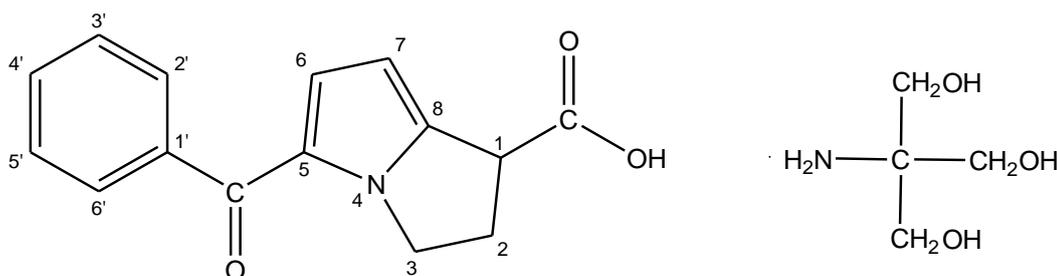


Figura 3.3. Representación de la estructura química de KT (5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-ácido carboxílico, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol).

El KT presenta isomería óptica y al igual que en otros AINE la forma S es la que presenta actividad biológica [88]. Es de color blanco y se decolora con la exposición prolongada a la luz. Puede existir en tres formas cristalinas, todas ellas solubles en agua (solubilidad = 15 mg/mL). También es soluble en disolventes orgánicos como etanol (EtOH) (solubilidad = 7 mg/ml), DMSO (solubilidad = 50 mg/ml), y dimetil formamida (DMF) (solubilidad = 50 mg/mL) [89]. El grupo carboxílico presenta un pKa = 3,5 [90]. A pH básico presenta una absorción en el UV-Visible con $\lambda_{\text{max}} = 323 \text{ nm}$ [91].

Entre sus propiedades se encuentra la analgésica, antipirética y antiinflamatoria. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas [92], las cuales juegan un papel importante en la regulación de diversas funciones como la coagulación de la sangre o la respuesta inflamatoria alérgica. Esta inhibición trae acarreada la disminución de los efectos que éstas ejercen en el organismo, tanto positivos como negativos. Está indicado para el tratamiento del dolor moderado o severo a corto plazo.

Además de sus propiedades beneficiosas este fármaco, al igual que otros AINES, presenta importantes efectos secundarios, entre los que se encuentran: riesgo

cardiovascular, ulceraciones gastrointestinales, hemorragia y perforación, toxicidad renal, retención de líquidos y edema, hemorragias [93].

La preocupación por la alta incidencia de efectos secundarios con KT ha causado su retirada en Alemania y Francia [94], mientras que en otros países su dosis y la duración máxima permitida del tratamiento se han visto reducidas. En el caso de España [95] desde 2007 la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en coordinación con el resto de Agencias de Medicamentos de los países de la Unión Europea y con la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) limitó su utilización únicamente a uso hospitalario.

3.3. Indometacina

La IM (2-[1-(4-clorobenzoyl)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il] ácido acético), es un AINE perteneciente a la familia de derivados del ácido indolacético, su estructura química se representa en la figura 3.4. Es un polvo cristalino blanco amarillento sensible a la luz, con baja solubilidad en agua (solubilidad = 0,937 mg/L) [96, 97] e hidrocarburos pero soluble en disolventes orgánicos como, DMSO (solubilidad = 17,5 mg/mL) y EtOH (solubilidad = 20 mg/mL) [98]. En disolución de EtOH presenta tres máximos con λ_{\max} a 230, 260 y 319 nm. En disolución acuosa presenta dos máximos con λ_{\max} a 265 nm y 320 nm [99] y un pKa= 4,5 del ácido carboxílico [100].

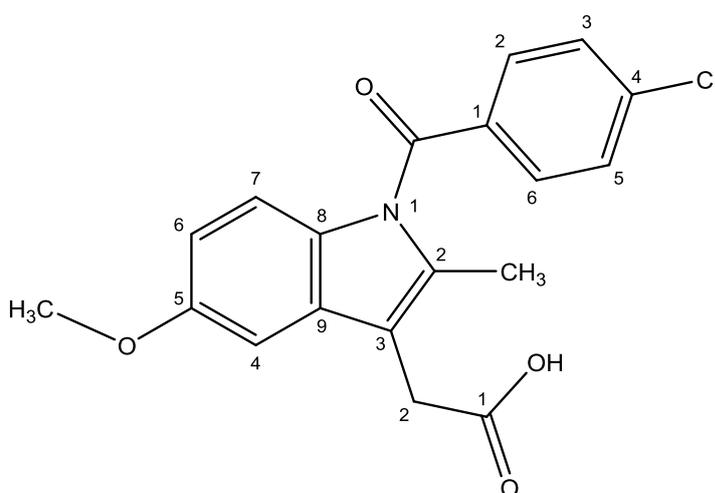


Figura 3.4. Representación de la estructura química de IM (2-[1-(4-clorobenzoyl)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il] ácidoacético).

Se absorbe de manera rápida y casi completa en el organismo tanto por vía oral como rectal. Los efectos anti-inflamatorios de la IM se deben, al igual que los de las otras AINES, a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas.

Se usa para aliviar el dolor de moderado a agudo, como antirreumático ya que la producción del factor reumatoide IgM puede ser disminuido con este fármaco, también puede usarse como antipirético por la acción central sobre el centro hipotalámico que regula la temperatura, produciendo vasodilatación periférica. Por último, la IM también se utiliza a veces para reducir la cantidad de calcio en la sangre y para tratar cierto tipo de baja presión arterial.

A pesar de todos los beneficios citados su uso se restringe en muchas ocasiones debido a los efectos secundarios que origina: reacciones neurológicas, problemas gastrointestinales, riesgos hepáticos, riesgo cardiovascular o renal, reacciones de hipersensibilidad [93].

3.4. Piroxicam

El PX (figura 3.5.) (4-hidroxi-2-metil-N-(piridin-2-il)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido), es un AINE perteneciente a la familia del oxicam. En estado sólido presenta estructura cristalina y color blanco amarillento. Es insoluble en agua (solubilidad = 0,23 mg/L) [96, 97], ligeramente soluble en EtOH (solubilidad = 5 mg/mL), DMF (solubilidad = 20 mg/mL) y DMSO (solubilidad = 25 mg/mL) [89].

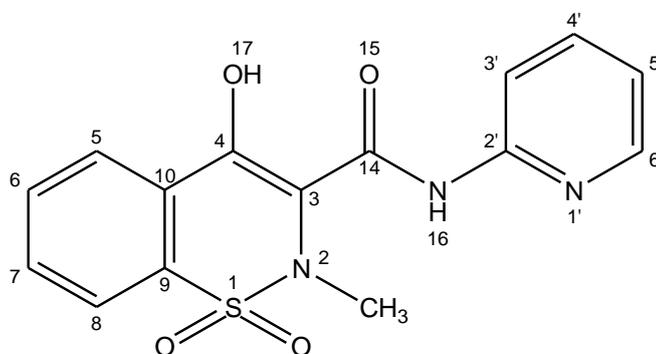


Figura 3.5. Representación de la estructura química de PX (4-hidroxi-2-metil-N-(piridin-2-il)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido).

En estado sólido presenta dos formas polimórficas, α y β , y color blanco amarillento. En disolución tiene un comportamiento complejo debido a la existencia de diferentes conformeros, siendo las formas neutras las únicas farmacológicamente activas [101, 102]. Presenta un $pK_{a1} = 5,1$ debido a su protón ácido y un $pK_{a2} = 1,8$ por su nitrógeno débilmente básico [103]. Su banda de absorción máxima está en $\lambda_{max} = 360$ nm [104].

El PX actúa a nivel bioquímico igual que las otras AINES impidiendo la síntesis de prostaglandinas [92], independientemente de la etiología o causalidad de la inflamación, y posee, por tanto, propiedades tanto analgésicas como antiinflamatorias y se utiliza para aliviar el dolor, inflamación y la rigidez.

Presenta, como los otros dos AINES estudiadas, efectos secundarios adversos como: problemas gastrointestinales, problemas renales, reacciones alérgicas o dermatológicas, riesgos hepáticos, problemas en el sistema nervioso central, problemas en la visión, reacciones adversas sobre el metabolismo, reacciones de hipersensibilidad [93].

Debido a estos efectos secundarios en julio del 2007 la AEMPS [105] estableció restricciones importantes en su uso y a partir de ese momento los medicamentos que lo contienen entraron en la categoría de diagnóstico hospitalario.

4. Espectroscopias amplificadas por superficies metálicas

La espectroscopía es una técnica que estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Para una molécula, la absorción o la emisión de energía a ciertas longitudes de onda lleva asociada un cambio en los niveles cuánticos de energía molecular, la relación entre la longitud de onda y los correspondientes niveles de la transición energética aporta una información característica de cada molécula.

En 1928 el físico C. V. Raman descubrió el efecto que lleva su nombre [106], motivo por el cual recibió el premio Nobel en 1930. Cuando un haz luminoso de frecuencia ν_0 , incide sobre un sistema que contiene enlaces químicos capaces de vibrar con frecuencia ν_S , tiene lugar una absorción energía por parte del sistema, pasando a un nivel electrónico superior virtual. El retorno al estado electrónico fundamental puede implicar un cambio en el nivel vibracional, emitiéndose en ese caso una radiación inelástica (difusión o “*scattering*”), de energía diferente a la original, que constituye la radiación Raman, y que puede ser de dos tipos, según el fotón tenga una ganancia de energía (Raman anti-Stokes, de frecuencia $\nu_0 + \nu_S$) o pérdida de la misma (Raman Stokes, de frecuencia $\nu_0 - \nu_S$). La pérdida de energía de los fotones incidentes da lugar a un espectro vibracional, que como el infrarrojo, es único para cada molécula y es una auténtica “huella digital” que sirve para identificarla. Dentro de la espectroscopía este fenómeno se conoce con el nombre de espectroscopía Raman, explicado gráficamente en la figura 4.1.

Esta técnica presenta dos inconvenientes principales, el primero relacionado con su baja sección eficaz, por la baja probabilidad de “*scattering*” de un fotón (por término medio sólo uno difunde entre unos 10^6), que puede aumentarse considerablemente en el caso de que el nivel superior virtual coincida con un estado electrónico realmente existente en la molécula, dando lugar a la espectroscopía Raman resonante (figura 4.1.). El segundo, más difícil de evitar, proviene de la luminiscencia emitida por los sistemas, tanto de manera intrínseca como por parte de impurezas que éstos pudieran presentar, que, al ser de mayor intensidad, enmascara las señales Raman.

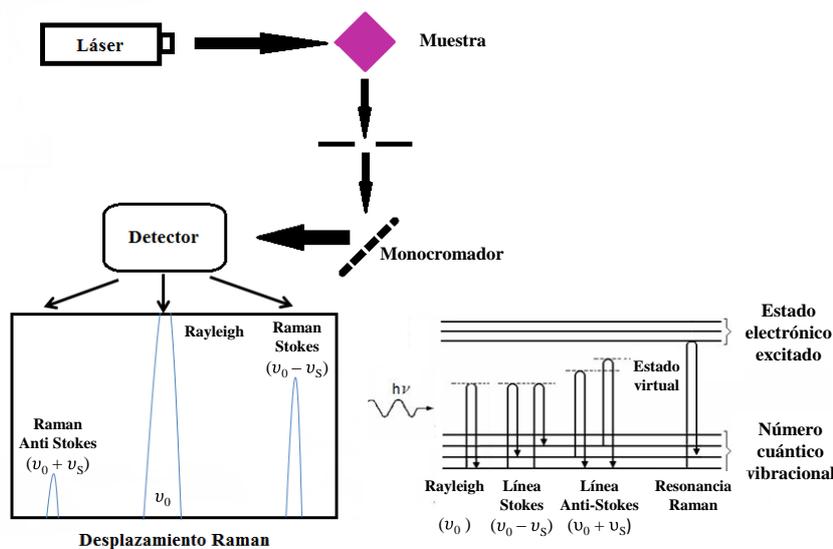


Figura 4.1. Esquema explicativo del efecto Raman.

4.1. Espectroscopía SERS (Surface-Enhanced Raman Scattering)

El fenómeno de la dispersión Raman intensificada por superficies metálicas rugosas fue descubierto por Fleischmann et al. [107] en 1974, al observar el aumento de la intensidad de las bandas del espectro Raman de la piridina cuando ésta se encontraba adsorbida sobre un electrodo de plata y previamente sometido a varios ciclos de oxidación-reducción. Jeanmarie y Van Duyne [108] y Albrecht y Creighton [109] interpretaron este efecto como un incremento del campo electromagnético sobre la superficie metálica, debido a la rugosidad de la misma. Como consecuencia de estos hechos, en 1977, se desarrolló la espectroscopía SERS cuyas características fundamentales son el aumento de sección eficaz Raman y la considerable atenuación de la fluorescencia de las moléculas pegadas a la superficie metálica de forma simultánea.

Para explicar la espectroscopía SERS se han propuesto un gran número de mecanismos y múltiples variantes de cada uno de ellos, actualmente se considera la existencia de dos contribuciones principales: i) el mecanismo de intensificación electromagnético (MEM) y ii) el mecanismo químico o de transferencia de carga (MTC), sin embargo, no existe un acuerdo definitivo acerca de la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total.

4.1.1 Mecanismos de intensificación del efecto SERS

La interacción del campo electromagnético, \vec{E} de la radiación incidente con una molécula de polarizabilidad α , induce en ésta un momento dipolar inducido, $\vec{\mu}$, según la expresión:

$$\vec{\mu} = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

La intensificación SERS se puede interpretar como una amplificación de \vec{E} , o bien de α , que ocurre a través de dos mecanismos diferentes, el MEM y el MTC. El MEM considera que se produce un aumento del campo electromagnético en las proximidades de la superficie metálica, mientras que el MTC explica el fenómeno en base a una modificación de la polarizabilidad del adsorbato debido a la formación de un complejo de transferencia de carga.

La contribución de cada uno de estos mecanismos a la intensificación total observada puede variar dependiendo de las condiciones experimentales.

Mecanismo Electromagnético

Cuando una NP metálica es irradiada con una onda monocromática plana, el campo eléctrico asociado causa la oscilación coherente de los electrones de la banda de conducción del metal. Estas oscilaciones colectivas de los electrones de conducción se definen como plasmones superficiales localizados (LSP) [110, 111]. Dichos plasmones pueden ser excitados, además de en NPs, en protuberancias superficiales, pero no sobre superficies planas. La necesidad de una geometría específica es de central importancia en la explicación del SERS, los sistemas activos deben poseer un tamaño entre 5 y 100 nm. El límite superior está determinado por la longitud de onda, para partículas del tamaño de la longitud de onda o mayor, se excitan progresivamente multipolos de orden superior que, contrariamente al modo dipolar, no son eficaces para la intensificación. En el extremo opuesto, cuando las nanoestructuras responsables del SERS se vuelven demasiado pequeñas, la conductividad efectiva del metal disminuye y las propiedades electrónicas de las NPs ya no muestran efectos cuánticos [112].

Una radiación de frecuencia ω_0 y amplitud de campo eléctrico E_0 , incide sobre una molécula situada a una distancia “d” de la superficie de una partícula metálica, de forma esférica y radio “r”, muy inferior a la longitud de onda de la radiación. La gran intensificación Raman se debe a dos procesos fundamentales (figura 4.2.):

(1) Intensificación del campo electromagnético incidente sobre la molécula: la intensidad del campo electromagnético total incidente que llega a la molécula, situada en la posición d aumenta considerablemente, debido a que dicho campo está compuesto por la radiación que incide directamente sobre la molécula, $E_0(d, \omega_0)$ y, además, por el campo que dispersa el propio metal a la misma frecuencia, $E_S(d, \omega_0)$. Por lo tanto, el campo electromagnético total E_I de frecuencia ω_0 que incide sobre la molécula en d será:

$$E_I(d, \omega_0) = E_0(d, \omega_0) + E_S(d, \omega_0) \quad (2)$$

Este campo induce en la molécula un momento dipolar $\vec{\mu}(d, \omega_0)$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R . Cuando la frecuencia ω_0 coincide con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, el campo dispersado E_S resulta ser muchísimo mayor.

(2) Intensificación de la radiación Raman: la radiación Raman de frecuencia ω_R puede ser amplificada a su vez por la NP, de modo análogo a la radiación láser. De este modo el campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición del detector (d’), es una composición del dispersado directamente por la molécula, de intensidad E_R y de frecuencia ω_R , y el campo dispersado por la NP metálica cuando son excitados plasmones superficiales de intensidad E_{RS} y de frecuencia ω_R :

$$E_{SEERS}(d', \omega_R) = E_R(d', \omega_R) + E_{RS}(d', \omega_R) \quad (3)$$

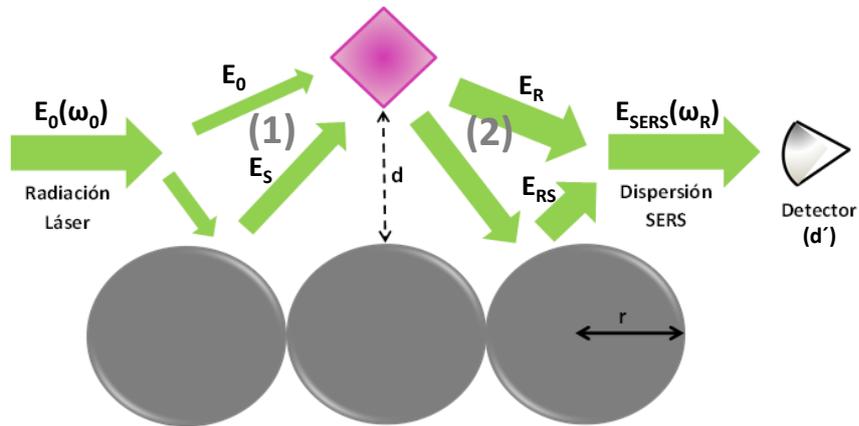


Figura 4.2. Intensificación de la sección eficaz Raman mediante la doble amplificación de la radiación incidente (1) y de la emisión (2).

El factor de intensificación G se puede definir de la siguiente manera:

$$G = \frac{I_{SERS}}{I_{RAMAN}} = \left| \frac{\alpha_R}{\alpha_{R0}} \right| |gg'|^2 \quad (4)$$

Donde I_{RAMAN} es el valor de la intensidad del campo eléctrico dispersado inelásticamente en ausencia del metal, α_R y α_{R0} son la polarizabilidad Raman de la molécula en presencia y ausencia del metal respectivamente y g y g' la amplificación del campo electromagnético y radiación Raman respectivamente. Por tanto, se puede decir que la mayor contribución al efecto SERS procede de la dispersión del metal y su intensidad depende de $|g|^4$.

Reglas de selección SERS

El campo electromagnético en el exterior de una superficie metálica rugosa está fuertemente polarizado en la dirección perpendicular a ésta y, consecuentemente, los modos vibracionales normales a la misma sufrirán una mayor intensificación que los paralelos. De este hecho surgen las reglas de selección SERS, diferentes a las del Raman convencional y que pueden proporcionar una valiosa información acerca de la orientación y del modo de interacción de las moléculas objeto de estudio con la superficie [113]. También se puede obtener información adicional sobre la orientación de la molécula adsorbida y del mecanismo de interacción metal-adsorbato, cuando se estudia el efecto

que provocan, sobre esta orientación, varios factores, como pueden ser el recubrimiento de la superficie, la presencia de aniones en el medio, el valor de pH, la variación de la longitud de onda de excitación, etc [114].

Las diferentes intensidades de los campos perpendicular y paralelo afectan de distinta manera a las componentes de polarizabilidad de la molécula y dependen, además, de la longitud de onda de excitación, por tanto, la relación de intensidades de los modos paralelos y perpendiculares de la molécula también dependerá de dicha variable. De esta forma, cuando la longitud de onda se desplaza hacia el azul, dentro de la región visible del espectro electromagnético, puede ocurrir que, la relación de intensidades se invierta, y se intensifiquen en mayor medida los modos paralelos.

La existencia de distintas reglas de selección en el SERS respecto al Raman se evidencia también en la aparición de bandas debidas a modos vibracionales prohibidos según las reglas de selección de la espectroscopía Raman convencional. Cuando estos modos “ocultos” se manifiestan en el espectro, suelen hacerlo con una gran intensidad y un desplazamiento en frecuencia muy pequeño.

Influencia de la morfología de las nanopartículas en la intensificación SERS

Para una esfera metálica la máxima intensificación del campo electromagnético, mayor intensidad SERS, es en la superficie. Cuando la forma de la NP difiere de la esfera, la intensificación SERS ya no es uniforme sobre la superficie y las mayores amplificaciones SERS no se obtienen por medio de NPs esféricas aisladas, sino por agregados de NPs y estructuras fractales, en los llamados puntos calientes (hot spots, HS) [115, 116]. En el punto medio situado entre dos NPs metálicas esféricas de oro o plata separadas una distancia de 1 nm puede aparecer una intensificación extra del campo electromagnético de hasta 10^{11} [117, 118].

Efecto de la distancia a la superficie

El efecto del LSP de las NPs metálicas disminuye al aumentar la distancia a la superficie de las mismas, siendo casi despreciable a distancias mayores de 100 Å [119,

120]. Este gradiente del campo electromagnético existente sobre la superficie metálica hace que los modos vibracionales relacionados con los grupos moleculares del analito, que se encuentran más cercanos a la superficie, experimenten una mayor intensificación que los correspondientes a aquellos grupos más alejados, utilizándose ésto para conocer la forma por la cual se produce la interacción entre el adsorbato y el metal [121, 122].

Mecanismo de Transferencia de carga

El MTC implica la absorción de una molécula de analito sobre la superficie del metal, por lo que a este modelo se le llama en muchas ocasiones mecanismo “químico”.

Cuando la entalpía de absorción es muy negativa y similar a las energías de un enlace químico (quimisorción) la alteración del volumen de la nube electrónica del adsorbato es significativa, sobre todo en el caso de moléculas pequeñas, y proporciona el máximo factor de amplificación SERS, dando origen al “efecto de la primera capa”, (las moléculas de la primera capa de adsorción dan máxima amplificación) [111].

El MTC puede ser considerado un caso especial de resonancia Raman en el que se produce la transferencia de un electrón desde el nivel de Fermi del metal hasta un orbital molecular libre del adsorbato o viceversa [123].

La transferencia de carga puede ocurrir desde el orbital HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) del adsorbato hasta el nivel de Fermi del metal o desde éste al LUMO (orbital molecular desocupado de menor energía) de la molécula adsorbida, por lo que existen dos posibles procesos de transferencia de carga dependiendo del sistema (figura 4.3.). Normalmente, la transferencia de carga tiene lugar desde el metal a la molécula adsorbida.

La transferencia de carga es más probable en analitos que contienen electrones en su estructura, como las moléculas aromáticas y tiene lugar mayoritariamente en puntos de la superficie en los que existen rugosidades superficiales a escala atómica, llamadas “*adatoms*” [124]. Estos sitios activos constituyen el lugar donde ocurre con más probabilidad la transferencia de carga entre el metal y el adsorbato, por lo que la fracción de moléculas adsorbidas que contribuyen a la intensificación SERS mediante MTC es relativamente pequeña.

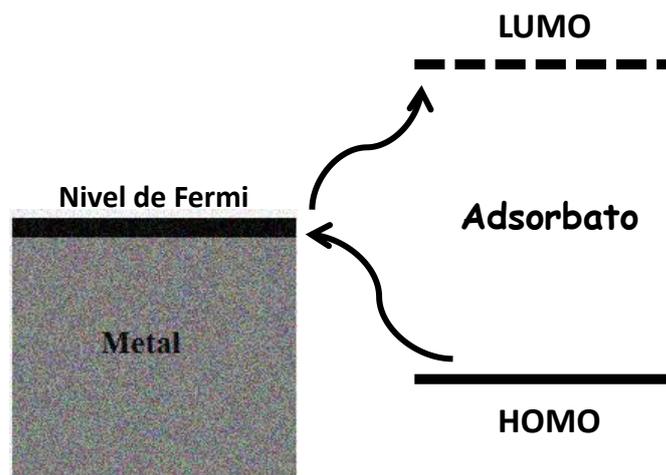


Figura 4.3. Esquema del mecanismo de transferencia de carga (MTC) entre el metal y el adsorbato.

La intensificación SERS global es debida al efecto multiplicativo del MEM y a la amplificación generada por una transferencia de carga entre el metal y el adsorbato. El MEM explica la mayor parte del efecto SERS: la necesidad de un material nanoestructurado, la dependencia de las resonancias plasmónicas con las propiedades ópticas del metal, la forma y el tamaño de la nanoestructura, su efecto de corto alcance, las altas intensificaciones cuando las NPs están agregadas generando HS y que el aumento de adsorbato no produzca un aumento proporcional en su intensidad, pero por otro lado no puede explicar su dependencia con la naturaleza de la molécula y con el potencial eléctrico cuando se usan electrodos como soportes metálicos.

4.1.2. Factores experimentales que influyen en la intensificación de los espectros SERS.

Los principales factores experimentales con los que se puede influir en la señal SERS de una molécula son:

- Adsorbato, la molécula adsorbida.
- Naturaleza del metal.
- Morfología de la superficie metálica.

- Características químicas de la superficie metálica.
- Valor del pH del medio.
- Concentración del adsorbato.
- Efecto de especies químicas interferentes.
- Longitud de onda de excitación.

Adsorbato

El acercamiento de la molécula a la superficie implica dos procesos, difusión hacia la superficie y adsorción sobre ésta, que puede tener lugar a través de fisisorción o de quimisorción. En ocasiones esta interacción es tan fuerte que se puede producir una modificación catalítica de la molécula. Para que se produzca la adsorción es necesario que el adsorbato tenga un centro capaz de interactuar con la superficie metálica, como puede ser la nube electrónica de un sistema conjugado, los pares de electrones libres, fundamentalmente de heteroátomos ligados a anillos aromáticos, o de un grupo funcional cargado, positiva o negativamente, o átomos capaces de formar complejos organometálicos con oro o plata, como el átomo de azufre. Debido a que la superficie de las nanopartículas presenta una carga negativa, una molécula cargada positivamente presenta mayores posibilidades de adsorción.

En el estudio estructural de una especie adsorbida sobre un metal es interesante el registro de los espectros SERS a diferentes valores de pH ya que, al producirse la ionización molecular, puede variar la forma en que las moléculas se adsorben sobre el metal. Del mismo modo ocurre al variar la concentración del adsorbato, que determina su orientación sobre la superficie metálica expuesta. También hay que considerar obtener los espectros SERS con diferentes líneas de excitación, ya que una misma molécula puede adsorberse de diferentes maneras sobre un metal, y es posible que cada una de estas formas presente condiciones de resonancia Raman diferentes, dependiendo de las distintas longitudes de onda.

Naturaleza y morfología de la superficie metálica

Las propiedades optoelectrónicas del metal determinan su capacidad para intensificar los espectros SERS. Los más utilizados son los metales oro, plata y cobre [22, 110, 125], debido a que el LSP es excitable en la región visible del espectro electromagnético.

La morfología de la superficie metálica es también un factor importante, ya que se necesita rugosidad, lo que hace necesario una posterior modificación de las NPs metálicas aisladas para hacerlas activas, esta activación consiste en su agregación.

Características químicas de la superficie metálica.

La presencia de sustancias químicas en las proximidades de la superficie de las NPs, que proceden de restos de los reactivos empleados en la preparación de las mismas o de productos de descomposición de los mismos, se manifiesta en la aparición de bandas en los espectros SERS [126] que pueden dificultar su análisis. Sin embargo, esta presencia es necesaria para asegurar la estabilidad de las NPs en suspensión. Hay, además, otros efectos asociados al aumento de la carga superficial de las NPs, cuando las especies químicas se encuentran en forma iónica, como, por ejemplo, los aniones citrato y cloruro, presentes en los coloides obtenidos por reducción con citrato e hidroxilamina, respectivamente. Así, los espectros SERS son más intensos en el caso de adsorbatos neutros o cargados positivamente que los que tienen carga negativa, que, incluso, pueden no experimentar amplificación. Por otro lado, la presencia de estos iones, adsorbidos sobre la superficie metálica, puede ser ventajosa, ya que permiten el acercamiento de analitos a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno, pares iónicos, etc.

Valor del pH del medio

El pH del medio influye en los espectros SERS de dos maneras fundamentales:
i) puede producirse una ionización del adsorbato que, experimenta así un cambio estructural y, por lo tanto, puede interaccionar de manera distinta con el metal y
ii) cuando los espectros se registran en medio alcalino, la elevada concentración de iones hidroxilo en las proximidades de la superficie metálica hace que las moléculas de

adsorbato se vean desplazadas por dichos iones, alejándose del metal lo que puede originar una pérdida de intensidad global de los espectros SERS.

Concentración del adsorbato

La existencia de centros de interacción sobre la superficie del metal con diferente afinidad, respecto a un mismo adsorbato, hace que la concentración de éste sea una variable de importancia significativa en el perfil de los espectros SERS. A baja concentración se ocuparán los centros de unión más activos respecto a un mismo adsorbato, mientras que a mayores concentraciones comenzarán a ocuparse otros centros menos afines.

También por efecto de la concentración puede cambiar la orientación de las moléculas de adsorbato sobre el metal. En general, si el número de moléculas que se encuentran sobre la superficie metálica es pequeño, tenderán a orientarse de forma paralela a dicha superficie, mientras que si la concentración es elevada se colocarán de forma perpendicular a la misma [127].

Efecto de especies químicas interferentes

La presencia de impurezas, contaminantes puede competir con el adsorbato en la adsorción sobre el sustrato metálico modificando su espectro SERS. En muchas ocasiones, estas especies químicas exógenas presentan bandas en el espectro SERS, incluso si se hallan en concentraciones mucho más bajas que la molécula de interés. Entre ellas se encuentra la Rodamina 6G y el paraquat [126].

Longitud de onda de excitación

La longitud de onda de excitación es un factor importante que determina el perfil de los espectros y la intensificación SERS global. La dependencia del perfil espectral SERS con la longitud de onda de excitación se debe al posible efecto resonante del adsorbato y del metal, así como al hecho de que una misma molécula puede adsorberse de diferentes

maneras sobre una superficie metálica, y es posible que cada una de estas formas presente condiciones de resonancia Raman a distintas longitudes de onda.

4.1.3. Sustratos para espectroscopía SERS

Desde los primeros estudios realizados con electrodos se han empleado numerosos tipos de soportes, entre los que destacan los coloides y las películas metálicas. Los coloides metálicos, concretamente de plata y oro, fueron utilizados por primera vez en espectroscopía SERS por Creighton et al. [128] Son de fácil preparación, proporcionan una amplia resonancia plasmónica en el intervalo visible-IR cercano y son muy estables. Dependiendo de las condiciones de preparación, como la temperatura, la concentración de los reactivos, la pureza del agua, del número inicial de núcleos y de la cinética de reducción del metal, puede variar de forma considerable el tamaño medio de las partículas, así como su distribución. Presentan el inconveniente de que necesitan de su agregación para dar lugar a SERS, de su tendencia a flocular y de su baja reproducibilidad.

En la preparación de los coloides, una cuestión crítica es la posibilidad de controlar la forma y el tamaño de las NPs obtenidas, ya que las propiedades optoelectrónicas de ellas dependen íntimamente de estos parámetros. El control se puede ejercer, en alguna medida, a través del método utilizado en la fabricación. Los más comunes son reducción química, ablación láser y fotorreducción.

Reducción química

La naturaleza del reductor determina en gran medida la forma, el tamaño y las propiedades eléctricas de las NPs resultantes. La reacción que tiene lugar sigue el siguiente esquema:



Los reductores más frecuentemente usados son borohidruro sódico (NaBH_4) [128, 129], citrato trisódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [130], y el clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH HCl}$) [131]. El primero de ellos es el más energético, por lo que es necesario llevar a cabo la reacción en frío para evitar la agregación de las partículas iniciales, presenta la desventaja de no poder emplearse para obtener espectros SERS en todo el espectro electromagnético, sino sólo en la región visible, aparte de tener un problema con los gases generados en la reacción que actúan como contaminantes. El citrato es un reductor más débil y necesita alta temperatura durante un tiempo prolongado para poder reducir el metal. El uso de clorhidrato de hidroxilamina presenta la ventaja de poder hacer la reducción a temperatura ambiente, además de una descomposición de los productos de reducción a N_2 y NO_x , que se desprenden de la suspensión en estado gaseoso. Los coloides metálicos preparados por reducción química resultan estables en suspensión por meses o hasta años aunque su uso no es aconsejable en SERS después de varios días, ya que las propiedades superficiales se pueden modificar sensiblemente.

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido la aparición de NPs mixtas, tipo "core-shell", que combinan las propiedades plasmónicas de dos metales, lo que hace que el ámbito de aplicación sea aún mayor. Son preparadas a partir de diferentes metales, como Ag-Au [132, 133], o de mezcla de plata y otros compuestos inorgánicos, Ag-CdS [134], Ag-ZnO [135], Ag-TiO₂ [136, 137] y Ag-SiO₂ [138, 139] entre otros. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para el control de la forma y el tamaño de las AgNPs y AuNPs [140-146].

La forma de las NPs es diversa y variada, actualmente pueden obtenerse esferas, elipsoides, cubos, partículas romboidales, estrellas, huecas y rellenas, muchas de ellas activas en SERS.

Ablación laser

Es un método en el que se eliminan las impurezas [147], su eficiencia varía mucho cambiando la duración del pulso láser [148] y la longitud de onda del mismo [149].

Fotorreducción

Estos métodos se basan en la fotorreducción de iones sobre determinados soportes [150-152]. Para la plata la reducción puede inducirse por irradiación con una fuente láser de una disolución del ion metálico.

El SERS es una técnica espectroscópica con gran cantidad de aplicaciones que van desde el análisis químico-bioquímico hasta la caracterización de nanoestructuras y aplicaciones biomédicas, debido a la combinación de especificidad y alta resolución espacial. Es aceptado como poderosa técnica analítica para el análisis químico ultrasensible que ha permitido detectar una molécula aislada (SM-SERS) [153-157]. Destacan, por su importancia y número de trabajos publicados, las aplicaciones SERS al estudio de materiales biológicos, análisis y detección de contaminantes, estudio y conservación del Patrimonio Histórico-Artístico así como las referentes al análisis forense. Las aplicaciones biológicas han crecido considerablemente en los últimos años [158] y abarcan no solo el uso de NPs metálicas para análisis de moléculas biológicas [159], sino también el estudio de procesos biofísicos y biomédicos o como método rápido de clasificación de bacterias [160]. Finalmente, la combinación de la técnica SERS con otras relacionadas con los plasmones superficiales localizados, como la técnica MEF, resulta de gran utilidad en el análisis de moléculas biológicas de gran complejidad [161, 162].

4.2. Espectroscopía MEF (Metal Enhanced Fluorescence)

La emisión de luz por parte de una molécula, debida a una transición desde un estado electrónico excitado al estado fundamental se denomina luminiscencia: fluorescencia si el estado excitado es un singlete, S_1 o S_2 (transición permitida), o fosforescencia, cuando dicho estado excitado corresponde a un triplete, T_0 , (transición prohibida).

El esquema típico para la fluorescencia es conocido como diagrama de Jablonski [163], que se puede ver en la figura 4.4. Del mismo se deduce, que las características que definen un espectro de fluorescencia son la transición electrónica entre los estados singletes excitados y el estado fundamental, sin embargo, la correspondiente banda de emisión contiene la estructura vibracional del estado electrónico fundamental.

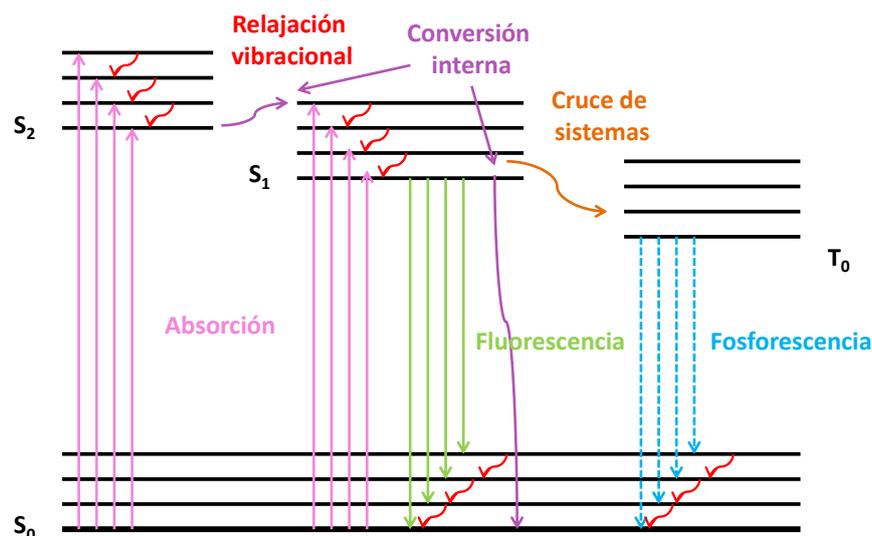


Figura 4.4. Diagrama de Jablonsky para la fluorescencia.

La absorción tiene lugar en femto-segundos y tras ella la molécula se encuentra en alguno de los estados vibracionales de uno de sus estados electrónicos excitados. Desde aquí la molécula se relaja a niveles vibracionales más bajos del estado electrónico excitado, proceso que tiene lugar en pico-segundos. En este punto la molécula se relaja al estado electrónico fundamental a través de diferentes procesos. Los más importantes son:

- *Fluorescencia:* ocurre en nanosegundos. La energía de la fluorescencia es siempre menor que la energía de la absorción, por tanto, la emisión se observa a longitudes de onda mayores que la excitación.
- *Fosforescencia:* es un cruce entre sistemas que ocurre cuando los estados de energía del estado singlete traslapan los del estado triplete.
- *Conversión interna:* estos procesos no radiativos son generalmente rápidos (10^{-12} s) y, por tanto, compiten en la mayoría de las moléculas con la fluorescencia.
- *Fenómenos de transferencia de energía:* desactivación, posible disociación molecular, etc.

Todos estos procesos contribuyen a determinar el rendimiento cuántico, ϕ_0 , que depende de la temperatura y del medio en que se efectúan las mediciones. En condiciones

normales, los fenómenos de desactivación pueden llegar a ser muy efectivos y por ello no todas las moléculas que absorben dan lugar a fluorescencia.

El rendimiento cuántico, ϕ_0 , se puede expresar como

$$\phi_0 = \frac{k_P}{(k_R + k_{NR})} \quad (6)$$

donde k_R es la suma de las constantes de velocidad de los procesos radiativos de desactivación y k_{NR} la suma de las constantes de velocidad de los procesos no radiativos de desactivación. El tiempo de vida medio, τ_0 , viene determinado por

$$\tau_0 = \frac{1}{(k_R + k_N)} \quad (7)$$

Las constantes de velocidad de los procesos radiativos, k_R , dependen mayoritariamente del coeficiente de extinción del cromóforo y solo en una pequeña proporción se ven afectados por el entorno, resultando en la práctica valores constantes. El único control posible en un experimento es la modificación de los procesos no radiativos usando, por ejemplo, un amortiguador o “*quenching*” colisional, con una constante de velocidad, k_q , que conduce a nuevas ecuaciones para el rendimiento cuántico, ϕ_q ,

$$\phi_q = \frac{k_R}{(k_R + k_{NR} + k_q[Q])} \quad (8)$$

siendo $[Q]$ la concentración de ligando amortiguador, y para el tiempo de vida medio, τ_q ,

$$\tau_q = \frac{1}{(k_R + k_{NR} + k_q[Q])} \quad (9)$$

En el caso de transferencia de energía, FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), proceso en el cual se produce la transferencia de energía entre dos moléculas sin emisión de fotón, aparece un proceso no radiativo con constante k_{FRET} que viene dada por

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (10)$$

Las constantes que rigen ambos procesos, k_q y k_{FRET} , disminuyen el rendimiento cuántico y el tiempo de vida medio a la vez, lo que supone, en la práctica, disminuir la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, la sensibilidad de los experimentos de

fluorescencia se puede modificar en presencia de superficies metálicas nanoestructuradas [164, 165].

4.2.1. Fluorescencia de moléculas sobre nanopartículas metálicas

La interacción del momento dipolar de las moléculas fluorescentes con los LSP, generados por la oscilación colectiva de los electrones en la superficie de nanoestructuras metálicas, altera las constantes de velocidad de los procesos radiativos, modificando el diagrama de Jablonski de la siguiente forma

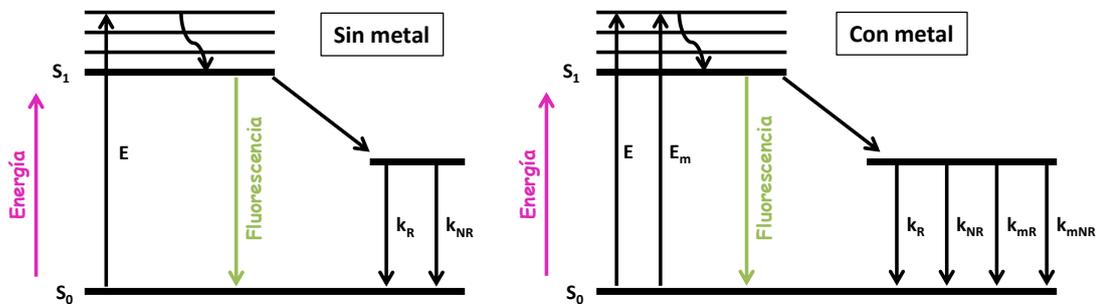


Figura 4.5. Diagrama de Jablonsky en ausencia y presencia de metal.

Aparece una nueva constante radiativa, k_{mR} . Además, hay que tener en cuenta los procesos no radiativos del metal, típicos de la amortiguación, con constante k_{mNR} . Las nuevas expresiones para ϕ_m y τ_m , el rendimiento cuántico y el tiempo de vida medio en presencia del metal, son

$$\phi_m = \frac{k_R + k_{mR}}{(k_R + k_{NR} + k_{mR} + k_{mNR})} \tag{11}$$

y

$$\tau_m = \frac{1}{(k_R + k_{NR} + k_{mR} + k_{mNR})} \tag{12}$$

La aparición de esta nueva constante radiativa hace que el rendimiento cuántico y el tiempo de vida media no varíen, necesariamente, en el mismo sentido, pudiendo conseguirse que el valor de ϕ_m aumente y que, simultáneamente, el valor de τ_m disminuya. El aumento del rendimiento cuántico del fluoróforo se traduce en una mayor intensidad de la fluorescencia, y la reducción en el tiempo de vida medio se traduce en una mayor fotoestabilidad del mismo, ya que éste permanece menos tiempo en el estado excitado y por tanto hay menos probabilidad de que haya procesos de interacción y pérdida de fluorescencia. De esta forma se amplían las posibles aplicaciones de la técnica y se permiten mayores sensibilidades. Este fenómeno se conoce como Surface Enhanced Fluorescence, SEF [166, 167], o Metal Enhanced Fluorescence, MEF [168].

Aparecen, así, dos efectos contrarios debidos al metal, por un lado la amortiguación que se rige por las constantes k_{mNR} y la amplificación, debida a las constantes k_{mR} . Dependiendo de la distancia entre la superficie del metal y el fluoróforo uno de los efectos predominará sobre el otro [169]. A cortas distancias los tiempos de vida medios disminuyen y la emisión se amortigua. Si las distancias aumentan (entre 50 y 200 Å) el tiempo de vida media disminuye pero aparece un efecto amplificador de la intensidad. A este efecto hay que añadir el aumento del campo local al que están expuestos los fluoróforos, fruto de su interacción con el LSP. Así, los efectos de las superficies metálicas en la fluorescencia de las diferentes moléculas dependen, mayoritariamente, de la distancia fluoróforo-metal, de la orientación relativa y de la naturaleza de la superficie del metal.

4.2.2. Mecanismos de intensificación del efecto MEF

El fenómeno de amplificación de fluorescencia a través de superficies y partículas metálicas se ha desarrollado a partir de los años 80, y las aplicaciones de la técnica MEF son relativamente recientes. Sus efectos son debidos, al menos, a tres mecanismos:

- i) Uno de ellos es el amortiguamiento de la transferencia de energía al metal, con una dependencia d^{-3} [170], donde d es la distancia entre el fluoróforo y la superficie del metal. Este efecto se produce por la amortiguación de las oscilaciones de los dipolos del fluoróforo por parte del metal que está próximo.

ii) El segundo mecanismo es un incremento de la intensidad de emisión debido al aumento del campo local incidente en el fluoróforo, con un incremento máximo teórico de ~ 140 [171]. Este efecto se ha observado en coloides metálicos y se denomina "*Lightening Rod effect*". El aumento se puede entender por la concentración, por parte de las partículas metálicas, del campo local lo que origina el incremento de la velocidad de excitación.

iii) El último y tercer mecanismo sería el aumento, originado por el metal, de la velocidad de decaimiento radiativo intrínseco del fluoróforo, modificando la velocidad a la cual el fluoróforo emite fotones [172-174].

4.2.3. Tipos de interacción metal-fluoróforo

Aunque las interacciones metal-fluoróforo están basadas en los mismos principios, los efectos son diferentes según sea la geometría de las superficies metálicas [175]. Para cada pareja metal-fluoróforo hay que establecer las condiciones experimentales adecuadas que, combinando la distancia y orientación, permitan una amplificación máxima de la señal, y eso es un balance difícil de encontrar. No existe una nanoestructura de resultados óptimos en todos los casos.

Los coloides metálicos, que dan excelentes resultados en SERS [176], son difíciles de utilizar en MEF debido a la dificultad en controlar la distancia entre la superficie metálica y el fluoróforo. La mayoría de los ejemplos que hay con amplificación de fluorescencia para moléculas adsorbidas en las NPs de un coloide son de sustancias que agregan [62, 161]. La formación de los agregados hace que el propio fluoróforo se apile, colocando las moléculas a la distancia en la que la amortiguación por el metal es menor que el efecto de amplificación por el LSP.

Los coloides pueden depositarse en forma de finas monocapas sobre vidrios de cuarzo constituyendo otro soporte metálico muy usado en MEF. Después de fabricar el soporte metálico nanoestructurado que permite disponer de un LSP, la distancia óptima de amplificación se puede establecer a través de monocapas de espaciadores. Este método presenta la desventaja respecto de los coloides de ser más sofisticado en su fabricación y tener menos estabilidad. La fabricación de monocapas de nanoestructuras metálicas puede hacerse a través de métodos químicos y físicos, o con nanolitografía. La película de

espaciador se puede depositar a través de cualquier método que permita controlar el espesor de la monocapa. A veces la monocapa de fluoróforo da lugar a MEF depositándose directamente sobre la superficie metálica, esto puede ser debido a la presencia de una capa de agua oxidada de 10-15 Å. También puede explicarse en términos de una reorganización molecular al depositar la monocapa, que establece una orientación preferencial del dipolo de transición que determina la eficiencia de la transferencia de energía a la superficie metálica.

Las llamadas “películas de islotes de plata” (SiFs), en inglés “silver islands films” [174], usadas como soporte metálico de LSP han dado lugar al mayor número de trabajos publicados en MEF hasta ahora y con mayor resultado de aumento de la señal. El fluoróforo puede depositarse como una capa más del sistema o permanecer en disolución.

En la actualidad se han desarrollado nuevos soportes con buen resultado en MEF como películas de nanoagujeros de oro, películas de islotes de aluminio, nanoestrellas de aluminio, núcleos metálicos con fluoróforos embebidos en un recubrimiento de dióxido de silicio, sistemas con proteínas [177] y oligómeros de DNA marcados, depositados en monocapas de polímero, 3-aminopropiltriétoxosilano (APS) o polilisina [178, 179], como monocapas cercanas a AgNPs, etc.

5. Parte experimental

5.1. Materiales

Las moléculas utilizadas en este estudio, EM, KT, IM y PX, con purzas iguales o superiores al 90, 99, 99 y 98% respectivamente, fueron obtenidas en Sigma-Aldrich. El resto de reactivos y disolventes se compraron en diferentes casas comerciales y siempre con pureza analítica.

En todos los casos se utilizó agua tridestilada suministrada por un sistema Mili-Q Integral A10 de Millipore (resistividad del agua entre 10-15 M Ω ×cm), para evitar posibles contaminantes, debido a la alta sensibilidad de la técnica SERS.

Las capas nanoestructuradas de PSi fueron suministradas por el Grupo de Materiales Fotónicos y Biofuncionales Avanzados dirigido por el Prof. Raúl José Martín-Palma de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, fruto de una colaboración enmarcada en los proyectos de investigación MICROSERES I y II de la Comunidad de Madrid. Las láminas de PSi se fabricaron mediante el grabado electroquímico de obleas de silicio dopadas con boro (tipo p) con orientación <100> y resistividad en el rango 0,01-0,02 Ω ×cm. Los contactos óhmicos de baja resistividad se formaron mediante el recubrimiento de la parte trasera de las obleas de silicio con aluminio y su posterior recocido a 400°C durante 5 minutos. El electrolito utilizado consistía en una solución 1:2 de HF (48% en peso): EtOH (98% en peso). Las obleas fueron galvanostáticamente grabadas bajo iluminación de una lámpara halógena de 100 W. La densidad de corriente del grabado fue de 80 mA/cm² durante 120 segundos, lo que originó la formación de capas de PSi de 5 a 7 μ de espesor con un tamaño medio de poro de 60 nm. Para obtener matrices de PSi con un tamaño de poro menor se aumentó la concentración de ácido fluorhídrico en el proceso de grabado usando como electrolito una solución 2:1 de HF (48% en peso): EtOH (98% en peso). Además, la densidad de corriente aplicada se redujo a 20 mA/cm².

5.2. Instrumentación

Raman, SERS y MEF

Los espectros Raman, SERS y MEF se registraron con un espectrofotómetro Raman Renishaw, modelo inVia (figura 5.1.), dotado con un microscopio Leica acoplado a una cámara de vídeo y que usa como detector una cámara CCD. El sistema posee tres láseres con sus correspondientes redes de difracción como elementos dispersantes de la luz.

- Láser de He-Cd que emite a dos longitudes de onda
 - 325 nm: potencia de salida 20 mW. Utiliza red de 3600 surcos / nm, lentes de cuarzo y filtro RO, para medidas Raman hasta 400 nm. Utiliza red de 1800 surcos / nm, lentes de vidrio y filtro de fotoluminiscencia para medidas hasta 900 nm.
 - 442 nm: potencia de salida de 80 mW. Utiliza red de difracción de 2400 surcos / nm y lentes de vidrio.
- Láser de Nd:YAG doblado.
 - 532 nm: potencia de salida 100 mW. Utiliza red de difracción de 1800 surcos / nm y lentes de vidrio.
- Láser de diodo.
 - 785 nm: potencia de salida 300 mW. Utiliza red de difracción de 1200 surcos / nm y lentes de vidrio.

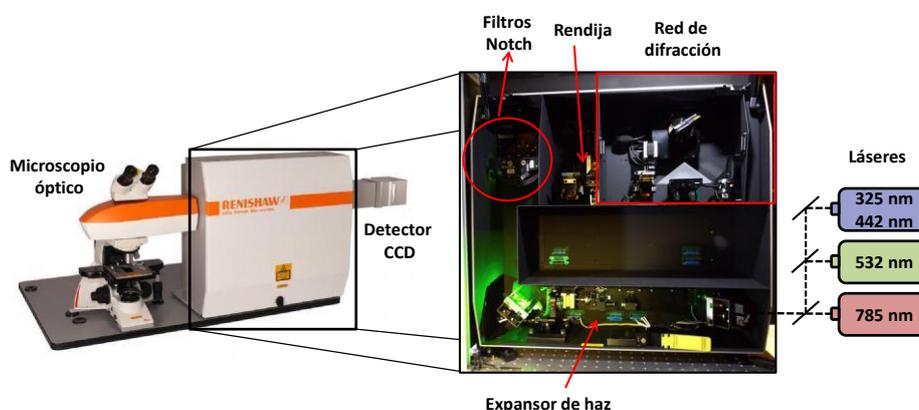


Figura 5.1. Espectrofotómetro Raman Renishaw inVia.

Espectroscopía FT-Raman

Los espectros FT-Raman se obtuvieron en un espectrómetro Bruker MultiRam, modelo RFS 100/S, con un detector de germanio refrigerado con nitrógeno líquido. El sistema va equipado con un láser de Nd:YAG que proporciona una línea de excitación a 1064 nm.

Espectroscopía FT-Infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja se registraron en un instrumento Bruker IFS66 equipado con un detector DTGS operando a temperatura ambiente.

Espectroscopía de absorción UV-Visible

Se utilizó un espectrómetro UV-VIS-3600 Shimadzu de doble haz equipado con una lámpara de deuterio y otra de wolframio y tres detectores: un PMT para la región UV-Visible y dos detectores de InGaAs y PbS para la zona del infrarrojo cercano (NIR).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías TEM fueron obtenidas con un microscopio JEOL JEM-2010 con un voltaje de aceleración de 200 kV.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM se obtuvieron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC con un microscopio Field Emisión SEM (FE-SEM), Hitachi modelo SU8000.

5.3. Síntesis de coloides metálicos

Para los diferentes experimentos se utilizaron coloides de plata, coloides de oro y sistemas “*core-shell*” formados por un núcleo metálico de plata y un recubrimiento de dióxido de silicio.

5.3.1. Coloides de plata

Los coloides de plata se sintetizaron mediante reducción química de nitrato de plata (AgNO_3). Se emplearon dos reductores distintos: hidrocloreuro de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) y citrato trisódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

El coloide de plata reducido con hidrocloreuro de hidroxilamina (AgHX) se preparó siguiendo el método de Leopold-Lendl [131]. El líquido resultante presenta un color marrón y $\text{pH} = 6,0$. La resonancia del plasmón aparece centrada a $\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$ (figura 5.2.). Las NPs resultantes son mayoritariamente esféricas y con tamaño medio de diámetro de 38 nm (figura 5.3.a).

La preparación del coloide reducido con citrato trisódico (AgCT) se llevó a cabo siguiendo el método publicado por Lee-Meisel [130]. El líquido final tiene un color blanquecino y un $\text{pH} = 6,5$. La resonancia del plasmón aparece centrada a $\lambda_{\text{max}} = 415 \text{ nm}$ (figura 5.2.). Las NPs en suspensión son mayoritariamente esféricas y presentan un diámetro medio de 50 nm (figura 5.3.b).

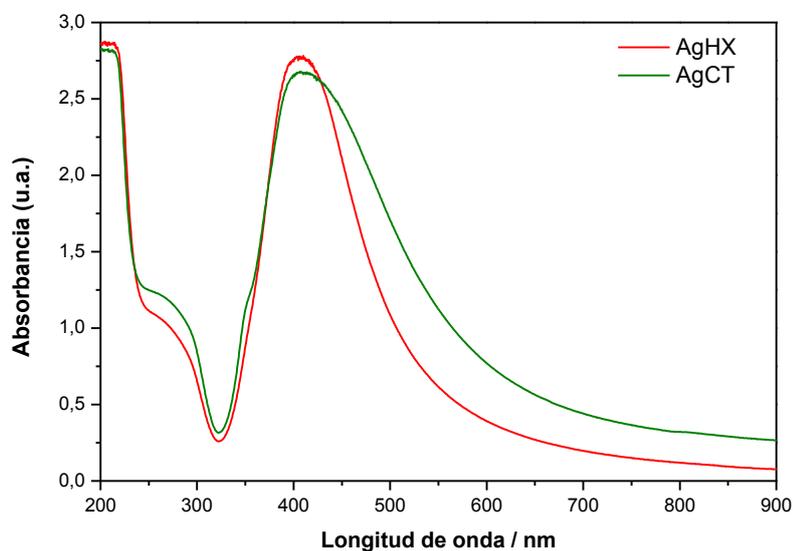


Figura 5.2. Espectros de absorción UV-Visible de los coloides de plata, AgHX y AgCT.

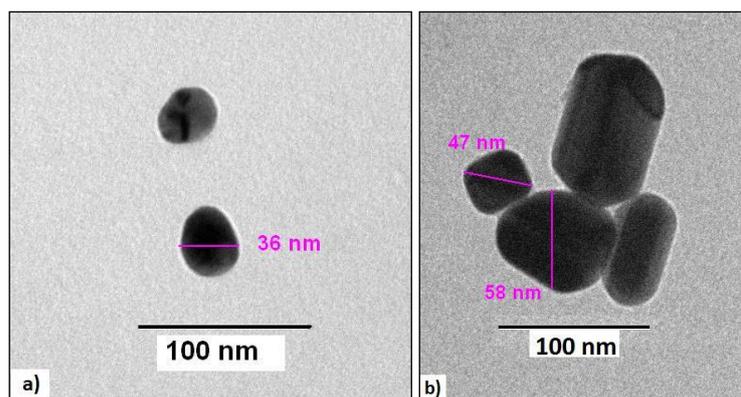


Figura 5.3. Imágenes SEM de a) coloide de plata AgHX y b) coloide de plata AgCT.

5.3.2. Coloides de oro

El coloide de oro (AuCT) se sintetizó a partir de la reducción de cloruro de oro (III) hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) con citrato trisódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), según el método de Lee y Meisel [130]. La coloración final puede variar con el tamaño de las nanopartículas obtenidas, siendo más oscura cuanto mayor sea su diámetro. El coloide final obtenido presenta NPs mayoritariamente esféricas, con diámetro medio de 15 nm y un pH = 5,5. El plasmón presenta una absorción centrada a $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$ (figura 5.4.).

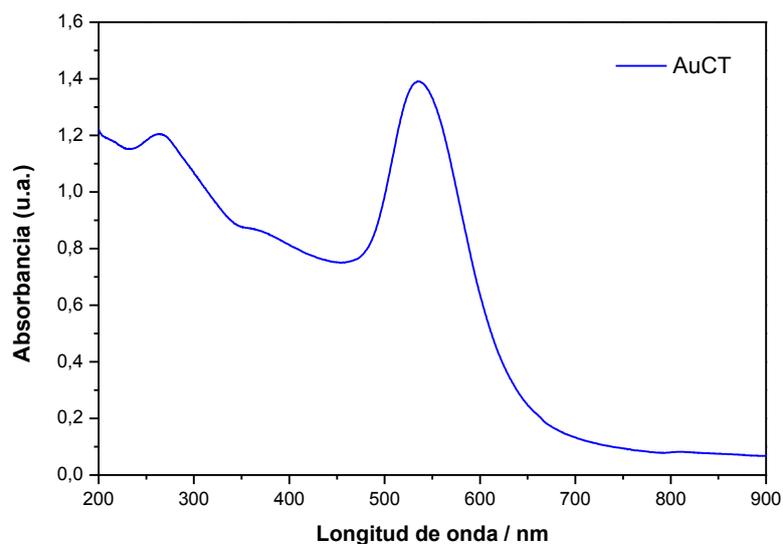


Figura 5.4. Espectro de absorción UV-Visible de coloide de oro, AuCT.

5.3.3. Sistemas “Core-Shell”

Se sintetizaron sistemas “core-shell” formados por un núcleo constituido por una AgNP esférica, sintetizada de acuerdo a lo expuesto anteriormente, y un recubrimiento de dióxido de silicio con diferentes espesores, obtenidos según diferentes procedimientos:

Método 1

Se utilizó el método de Li et al. [180] con modificaciones. Durante 15 minutos se agitaron a temperatura ambiente 400 μ l de 3-Aminopropil trietoxisilano (APTES, $C_9H_{23}NO_3Si$) 9×10^{-4} mM, y 30 ml de AgCT. Posteriormente la mezcla se calentó a 90°C y adicionaron 3,24 ml de una disolución de silicato de sodio (Na_2O_3Si) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) (2 mg de silicato de sodio + 8,5 ml de ácido sulfúrico 0,5M + 100 ml de agua tridestilada) continuando con agitación a 90°C durante una hora.

Método 2

Se utilizó el método de Aslan et al. [181] con modificaciones. En un matraz, a temperatura ambiente y durante una hora, se agitaron 5 ml de AgCT, 20 ml de isopropanol (C_3H_8O), X μ l de tetraetil ortosilicato (TEOS, $C_{16}H_{20}O_4Si$) y 0,5 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) al 30%.

La cantidad, X, de TEOS añadida se varió para obtener sistemas con distintos espesores de dióxido de silicio, siendo éste mayor al usar mayor cantidad de ortosilicato. Se utilizaron 2,5, 3,5 y 5 μ l, en sucesivas síntesis.

Tras la síntesis se usaron distintos procedimientos de lavado:

- I: disolución y posterior centrifugación con disolución $H_2O:EtOH$ (5:4) tres veces a 3500 rpm durante 30 minutos.
- II: disolución y posterior centrifugación con agua una sola vez a 4500 rpm durante 30 minutos.

5.4. Preparación de muestras

5.4.1. Muestras para espectroscopía

5.4.1.1. Emodina

Muestras para infiltrar en PSi

Las muestras de EM se prepararon a partir de una disolución madre en metanol (MeOH) de concentración 2 mM.

Las diferentes muestras utilizadas fueron:

- Muestra I (EM/Ag/MeOH): contiene el fármaco absorbido en la superficie de las AgNPs de coloide AgHX, previamente centrifugado y redispersado en MeOH. Concentración final de EM: 0,2 mM.
- Muestra II (EM/Ag/H₂O): contiene el fármaco absorbido en la superficie de las AgNPs de coloide AgHX. Concentración final de EM: 0,2 mM.
- Muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O): el fármaco va acomplejado con albúmina de suero bovina (BSA) formando el sistema BSA-EM. La proteína, BSA se disolvió en el coloide AgHX y posteriormente se añadió la EM en concentración suficiente para formar complejos 2:1 EM-BSA. Concentración final de EM: 0,02 mM.
- Muestra IV (EM/MeOH): disolución de EM en MeOH, en ausencia de NPs metálicas. Concentración final de EM: 0,2 mM.

Estas disoluciones se utilizaron para infiltrarlas en las láminas del material poroso. Las muestras de PSi se obtuvieron depositando una gota de la disolución correspondiente de EM sobre la superficie de las obleas previamente sintetizadas. La infiltración se llevó a cabo de dos formas diferentes: i) facilitando su introducción por gravedad, a presión atmosférica o ii) utilizando vacío. En todos los casos se trabajó a temperatura ambiente.

Muestras para los sistemas "core-shell"

Las disoluciones de EM en sistemas "core-shell" se prepararon añadiendo 100 μl de una disolución del fármaco ($1,7 \times 10^{-3} \text{ M}$ en MeOH) a 900 μl de la suspensión de "core-shell" correspondiente.

5.4.1.2. Ketorolaco

Todas las muestras para espectroscopía Raman se prepararon a partir de una disolución madre acuosa de KT $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ para, posteriormente, diluir a la concentración correspondiente para cada disolvente.

Los espectros SERS se obtuvieron con muestras de KT preparadas a partir de disoluciones acuosas $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ que se añadieron a AgHX hasta una concentración final de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Esta concentración supone un compromiso entre la concentración más alta que permite hacer medidas de absorbancia y fluorescencia de las disoluciones sin que se observe saturación de las correspondientes señales, y la que proporciona señales SERS con buena relación señal/ruido. En los casos necesarios se utilizó cloruro de potasio (KCl) con concentración 0,025 M como agregante.

Para la obtención de espectros de absorción UV-Visible se utilizaron disoluciones acuosas de KT con una concentración de $4 \times 10^{-3} \text{ M}$.

El pH se ajustó en todos los casos con disoluciones diluidas de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar el valor deseado.

Las medidas de FT-IR se obtuvieron con muestras de KT en estado sólido.

5.4.1.3. Indometacina

Las muestras de IM para espectroscopía Raman se prepararon a partir de una disolución madre $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ en DMSO para su posterior dilución en los diferentes disolventes hasta conseguir la concentración adecuada.

En el caso de los espectros SERS la correspondiente alícuota de disolución madre se añadió a AgHX hasta una concentración final de 1×10^{-4} M.

Para ajustar el pH se utilizaron como en el caso de KT disoluciones diluidas de HCl y NaOH hasta alcanzar el valor deseado.

5.4.1.4. Piroxicam

Las muestras de PX para espectroscopía Raman se prepararon a partir de una disolución madre 0,26 M en DMSO para su posterior dilución en los diferentes disolventes hasta conseguir la concentración adecuada.

Al igual que en casos anteriores, para la obtención de los espectros SERS la correspondiente alícuota de disolución madre se añadió a AgHX y AuCT hasta una concentración final de 1×10^{-4} M. En el caso del coloide AuCT se utilizó nitrato potásico (KNO_3) en concentración 0,025 M como agregante

Para obtener los espectros de absorción UV-Visible se utilizaron disoluciones de KT en distintos disolventes con una concentración de 1×10^{-4} M.

El pH se ajustó a partir de disoluciones diluidas de HCl y NaOH hasta el valor necesario.

5.4.2. Muestras para microscopía electrónica de transmisión

Para la adquisición de imágenes TEM de los distintos sistemas "*core-shell*", se depositó una pequeña alícuota, 5 μl , de la suspensión que los contenía sobre una rejilla de cobre y se dejó evaporar el disolvente. El número estimado de NPs/mL de coloide es 10^{10} , suponiendo geometría esférica para los nanosistemas.

5.4.3. Muestras para microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron imágenes SEM directamente de las distintas obleas de PSi, no siendo necesaria ninguna manipulación ni metalización al ser estas suficientemente conductoras.

6. Resultados y discusión

6.1. Emodina

Dado que la EM ha sido caracterizada previamente por SERS y MEF en el grupo se ha utilizado para el estudio de estos sistemas nanoportadores.

6.1.1. Silicio poroso

Para caracterizar morfológica y espectroscópicamente las láminas de PSi que nos proporcionaron (ver materiales) se utilizó microscopía SEM y fluorescencia y Raman respectivamente.

Con los parámetros adecuados de fabricación se obtuvieron capas de PSi con espesores en el orden del micrómetro (figura 6.1.) y un tamaño de poro de 30 y 60 nm (figura 6.2.).

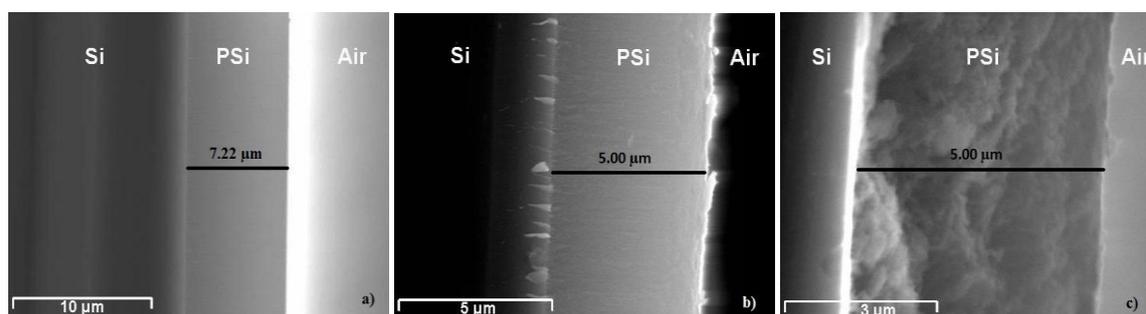


Figura 6.1. Imágenes SEM de la sección transversal de las láminas de PSi (tamaño de poro: 60 nm) cargadas con diferentes muestras de EM. a) muestra I (Em/Ag/MeOH), b) muestra II (Em/Ag/H₂O), c) muestra III (Em-BSA/Ag/H₂O).

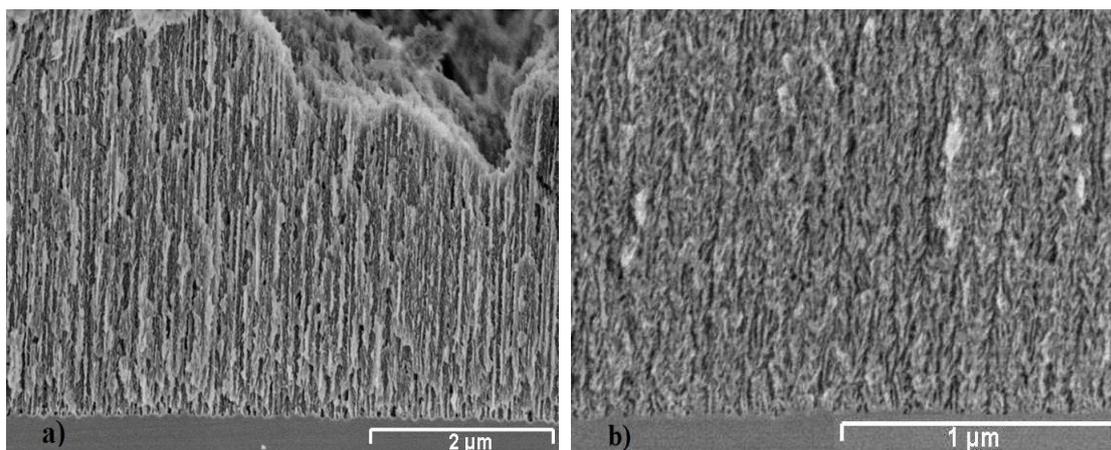


Figura 6.2. Imágenes SEM de la sección transversal de las láminas de PSi, sin carga, con diferente tamaño de poro. a) 60 nm y b) 30 nm.

Los espectros realizados en las láminas de PSi se han obtenido en el Renishaw inVia (estos espectros y todos los adquiridos en esta tesis se han obtenido a la mínima potencia que produce una señal-ruido aceptable) y se han tomado en diferentes puntos de la sección transversal de las muestras. Para la línea láser de excitación usada ($\lambda_{exc} = 532 \text{ nm}$) el diámetro del haz láser en la muestra es de $1 \mu\text{m}$, lo que nos permitió tener resultados con una resolución espacial de $1 \mu\text{m}$.

La figura 6.3. muestra los espectros Raman de una lámina de PSi, con los poros vacíos, en distintas posiciones de la sección transversal. Las diferencias que aparecen nos permitieron limitar el espacio de la oblea que ocupa el PSi y medir la anchura de la capa usando esta técnica. El Si cristalino presenta una banda estrecha y simétrica, a 520 cm^{-1} , muy característica, y otra ancha a 976 cm^{-1} , que en el PSi aparecen desplazadas a 503 cm^{-1} y 931 cm^{-1} respectivamente, cambiando, además, su forma y anchura, siendo la banda que aparece a 503 cm^{-1} más ancha en el PSi que en el Si cristalino. En el PSi aparece también otra banda más intensa a 300 cm^{-1} . La banda a 503 cm^{-1} permitió determinar el grosor de la capa de PSi en cada muestra, haciendo barridos a lo largo de toda la sección transversal de las muestras, donde se recogían espectros cada $1 \mu\text{m}$. El valor así obtenido coincide con el que muestran las imágenes SEM.

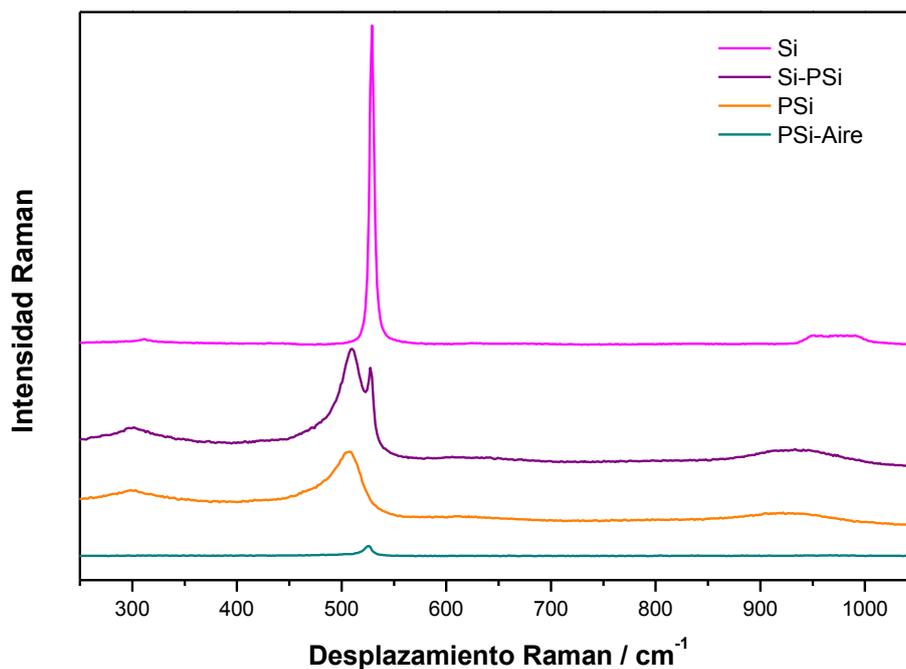


Figura 6.3. Espectros Raman en distintas posiciones de la sección transversal de una lámina de PSi sin carga en los poros: silicio cristalino (Si), interfase Si-PSi, PSi a 3 μm de la interfase Si-PSi e interfase PSi-Aire. Tamaño de poro: 60 nm. $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm.

El PSi presenta, además de espectro Raman, espectro de fluorescencia [39], que se manifiesta en una banda centrada a 756 nm, como se muestra en la figura 6.4.a. Esta banda tiene una intensidad relativa cuatro veces menor que la banda Raman que aparece a 503 cm^{-1} (marcada en la figura con un asterisco). Para estudiar la estabilidad del PSi sintetizado se obtuvieron espectros a los 30 días de su fabricación y exposición a la atmósfera. La figura 6.4.a indica que las bandas Raman del PSi permanecen sin cambios, sin embargo, la intensidad de la fotoluminiscencia decae un 37% y se produce un ligero desplazamiento hacia el azul (747 nm), indicando una oxidación de la capa de PSi debido a la exposición al aire.

Para estudiar la uniformidad de la lámina de PSi sintetizada se realizaron medidas en distintas posiciones, separadas $1\mu\text{m}$, a lo largo de la sección transversal (figura 6.4.b). Los espectros muestran similitud en intensidad y en posición en la zona de poros, lo que indica uniformidad en la composición de la capa.

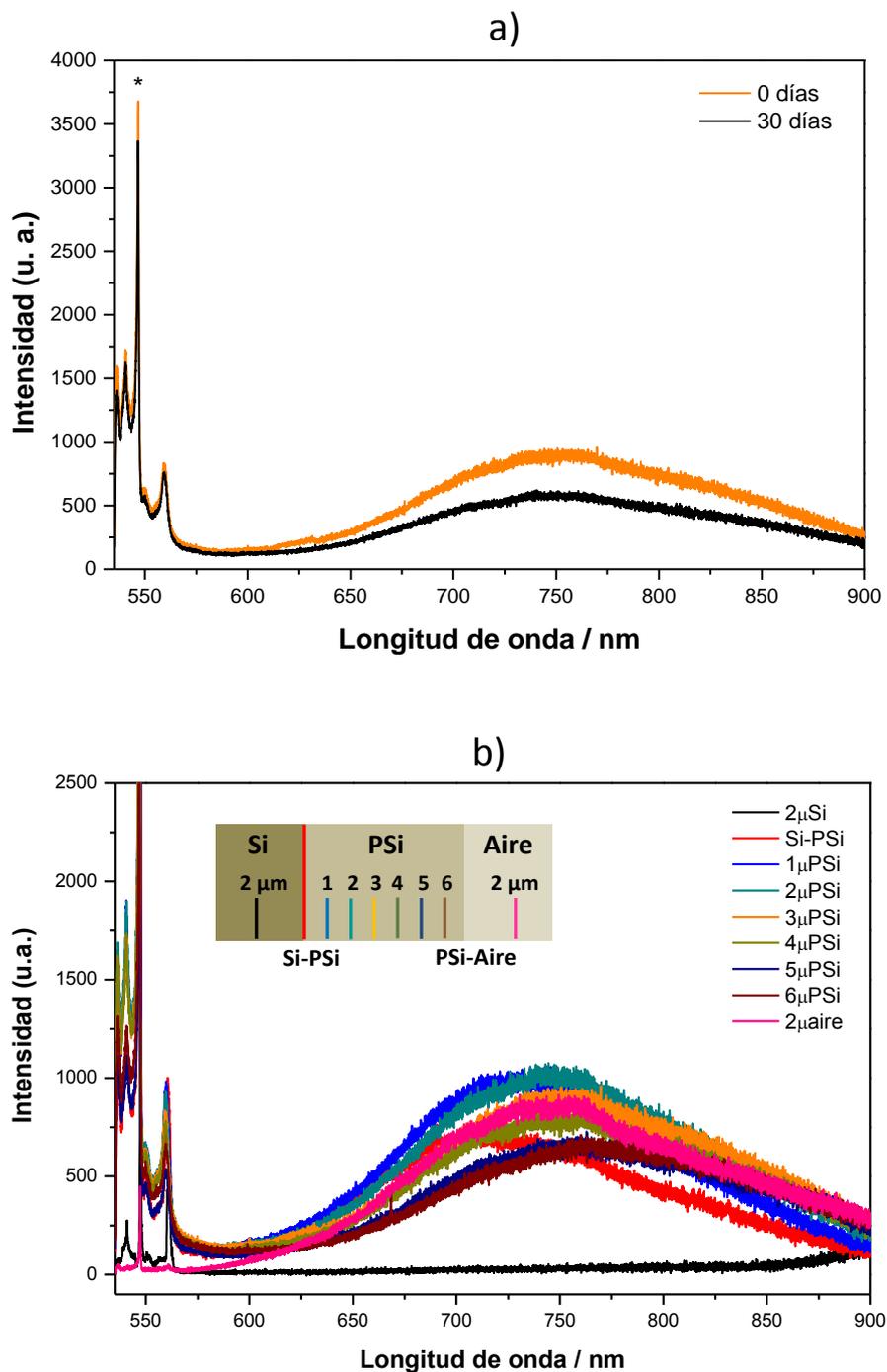


Figura 6.4. Espectros de emisión de fluorescencia de una lámina de PSi sin carga en los poros. a) Espectros realizados en el centro de la sección transversal de la lámina ($3 \mu\text{m}$ de la interfase Si-PSi) de la muestra recién preparada y transcurridos 30 días de su preparación. La banda Raman del PSi a 503 cm^{-1} está marcada con un asterisco. b) Espectros en distintos puntos situados a lo largo de la sección transversal de la muestra recién preparada. Tamaño de poro en el Psi: 60 nm . $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Una vez estudiado el material poroso se caracterizaron las distintas disoluciones del fármaco que, posteriormente, se infiltraron en el mismo. En la figura 6.5. se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las muestras de EM utilizadas: muestra I (EM/Ag/MeOH), muestra II (EM/Ag/H₂O), muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O) y muestra IV (EM/MeOH). Estos resultados se utilizaron posteriormente para compararlos con los obtenidos tras infiltrar las correspondientes disoluciones en el PSi.

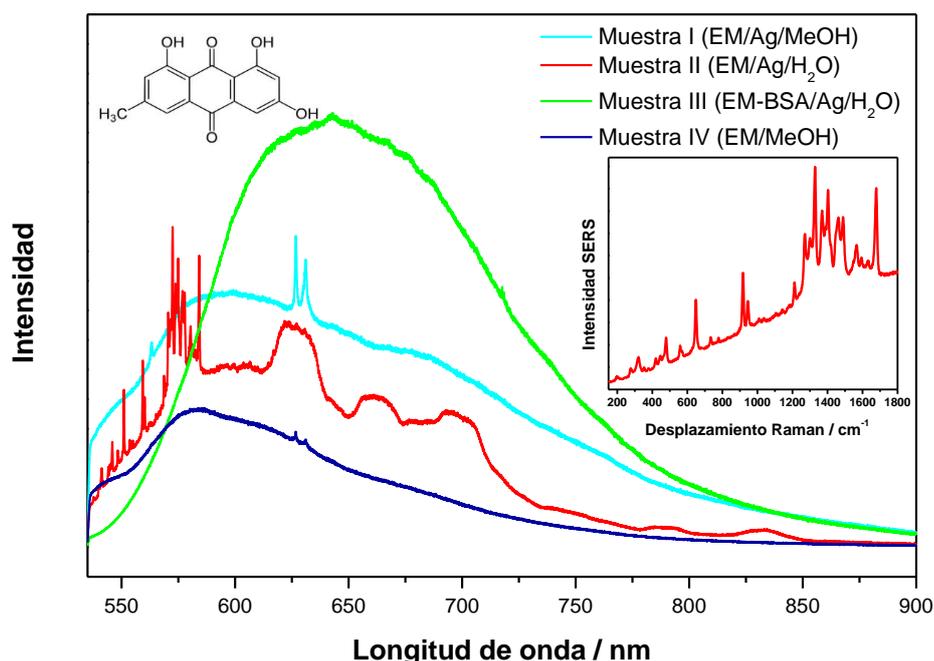


Figura 6.5. Espectros de emisión de fluorescencia de EM en disolución: muestra I (EM/Ag/MeOH), muestra II (EM/Ag/H₂O), muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O) y muestra IV (EM/MeOH). En el recuadro interior se detalla la parte del espectro de la muestra muestra II (EM/Ag/H₂O) que corresponde al espectro SERS. $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm.

Los trabajos publicados previamente en nuestro grupo para la EM [62] nos permitieron analizar estos espectros. El monómero dianiónico de la EM en disolución acuosa presenta un máximo de emisión a $\lambda_{\text{emiss}} = 732$ nm cuando $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm. Este máximo se desplaza hacia el rojo, a valores alrededor de $\lambda_{\text{emiss}} \sim 600$ nm, cuando aparecen los agregados, a pHs neutros o ácidos, y la especie de la EM es monoaniónica o neutra.

Cuando la EM se disuelve en MeOH y a concentraciones bajas se presenta como monómero, que tiene un máximo de emisión a 560 nm cuando $\lambda_{exc} = 514\text{nm}$. Al aumentar la concentración, y con la aparición de agregados, estos se caracterizan por la aparición de bandas de emisión tanto a $\lambda_{emiss} = 540\text{ nm}$ como a $\lambda_{emiss} = 575\text{ nm}$.

Cuando se utiliza coloide acuoso, muestra II (EM/Ag/H₂O), la propia EM actúa como agregante de las AgNPs y no es necesario añadir otras moléculas a la disolución que hagan este papel. La agregación de AgNPs se manifiesta en que también se observa, espectro SERS. La presencia de agregados de EM en disolución se refleja en la aparición en el espectro de bandas anchas de emisión de fluorescencia características de los mismos con máximos a 620, 660, 690, 790 y 830 nm.

En las disoluciones que contienen AgNPs en medio orgánico, muestra I (EM/Ag/MeOH), no se observa espectro SERS, ya que el alcohol evita la agregación de las AgNPs. Sin embargo, sí se observa amplificación de la intensidad de fluorescencia ya que la formación de agregados de EM hace que estos funcionen como espaciador y las moléculas situadas a una cierta distancia del metal presentan efecto MEF.

En la muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O), la intensificación de la señal de fluorescencia del fármaco (efecto MEF) es aún mayor que en el caso de la muestra I (EM/Ag/MeOH). La posición del fármaco en el complejo EM-proteína hace que éste se sitúe a una distancia óptima de la superficie del metal y es la propia proteína la que actúa de espaciador. Al formarse el complejo, con alta constante de unión, $K_{unión} = 2,8 \times 10^5\text{ M}^{-1}$ [64], la concentración de EM libre es pequeña no permitiendo la agregación de las NPs y consecuentemente no se observa espectro SERS. El máximo de emisión se desplaza hacia el rojo indicando que parte de las moléculas de EM se encuentran como monómeros, fundamentalmente las que están unidas a la proteína, y otras se encuentran como agregados, aunque la cantidad de éstos es insuficiente para que haya agregación de NPs, como se ha referido anteriormente.

Por último el espectro de la muestra IV (EM/MeOH) presenta solo las bandas de fluorescencia características de la EM en MeOH ya que al no tener NPs del metal no presenta ni efecto SERS ni efecto MEF.

Una vez caracterizadas las diferentes disoluciones de EM, se estudió su comportamiento al infiltrarlas en PSi. El análisis de la emisión de fluorescencia de la EM,

al excitarla a 532 nm, cuando se infiltraron en los poros del PSi, ya sea sola, adsorbida en la superficie de las AgNPs o acompañada con la albumina, presenta un problema principal, ya que las bandas del monómero de EM y del PSi solapan. Para resolver esta incertidumbre se realizaron espectros de emisión de fluorescencia, en la sección transversal, a 3 μm de la interfase Si-PSi, de diferentes láminas de PSi, cargadas con: a) EM disuelta en MeOH, muestra IV (EM/MeOH), b) solo con nanoestructuras de plata, AgHX, c) EM adsorbida en la superficie de AgNPs y disuelta en agua, muestra II (EM/Ag/H₂O) y d) PSi con los poros vacíos. Todas las infiltraciones se realizaron a presión atmosférica. Los resultados pueden verse en la figura 6.6.

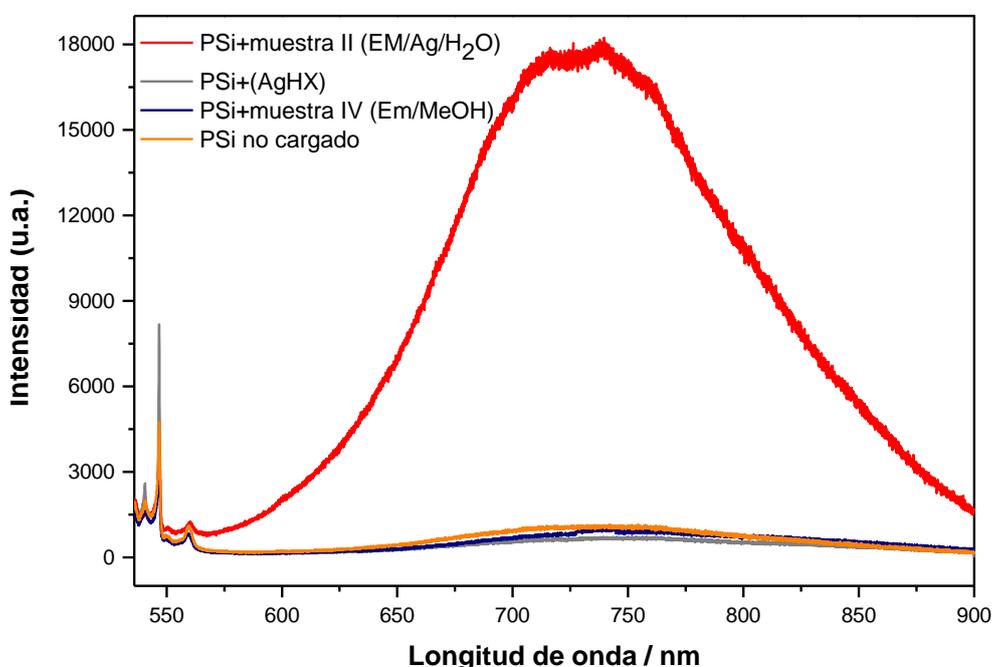


Figura 6.6. Espectros de emisión de fluorescencia a 3 μm de la interfase Si-PSi de diferentes láminas de PSi cargadas a presión atmosférica: muestra II (EM/Ag/H₂O), AgHX, muestra IV (EM/MeOH) y PSi no cargado. Tamaño de poro: 60 nm, $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{nm}$.

A la vista de esta figura puede decirse que cuando la EM y las AgNPs no están juntas, el espectro de fluorescencia obtenido no muestra diferencias apreciables con respecto al del PSi sin cargar. En muestras cargadas solo con EM, los agregados de gran

tamaño se quedan en la superficie y los de menor tamaño, que sí pueden pasar a través de los poros, no se quedan inmovilizados, por tanto, la banda observada se puede atribuir principalmente al material mesoporoso.

Las AgNPs con agregados de EM en su superficie, amplifican la señal de EM cuando las moléculas se encuentran a una cierta distancia de la superficie metálica. Matrices de PSi con un tamaño de poro menor, 30 nm, no presentan cambios en la fotoluminiscencia del PSi, a pesar de cargarse con complejos de EM-AgNPs debido a un problema de exclusión por tamaño, ya que las AgNPs tienen un diámetro mayor que el de los poros impidiendo su penetración en los mismos.

Se da, por tanto, un efecto de selectividad “por tamaño”. Este hecho podría ser de utilidad en el caso de que monómeros y grandes agregados de un determinado fármaco tuvieran diferente actividad farmacéutica y/o efectos secundarios, cambiando el tamaño de poro del PSi empleado como nanoportador se podría seleccionar la “forma” del fármaco deseada.

Una vez analizada la emisión de fluorescencia de las láminas de PSi con y sin EM se analizaron los espectros obtenidos cuando la matriz de PSi se cargó con EM proveniente de las diferentes disoluciones de las muestras preparadas. La figura 6.7. presenta los espectros obtenidos cuando las muestras se irradian a 3 μm de la interfase Si-PSi con una línea láser de 532 nm.

Se observa que cuando se introducen los complejos EM/Ag o EM-BSA/Ag, el máximo de fluorescencia se encuentra a $\lambda_{\text{emiss}} = 730$ nm, posición asignada al fármaco en disolución acuosa [62], mientras que en las muestras sin AgNPs el máximo está a $\lambda_{\text{emiss}} = 756$ nm, posición característica del PSi. En presencia de plata y a diferencia de los casos en que no la hay, la intensidad relativa de la fluorescencia respecto de la banda Raman aumenta siendo la altura máxima de la banda de fluorescencia cinco veces la de la banda Raman del PSi a 503 cm^{-1} . Por otro lado, el perfil de la banda indica, principalmente, la presencia de monómero que, en estado sólido, puede apilarse para hacer de espaciador.

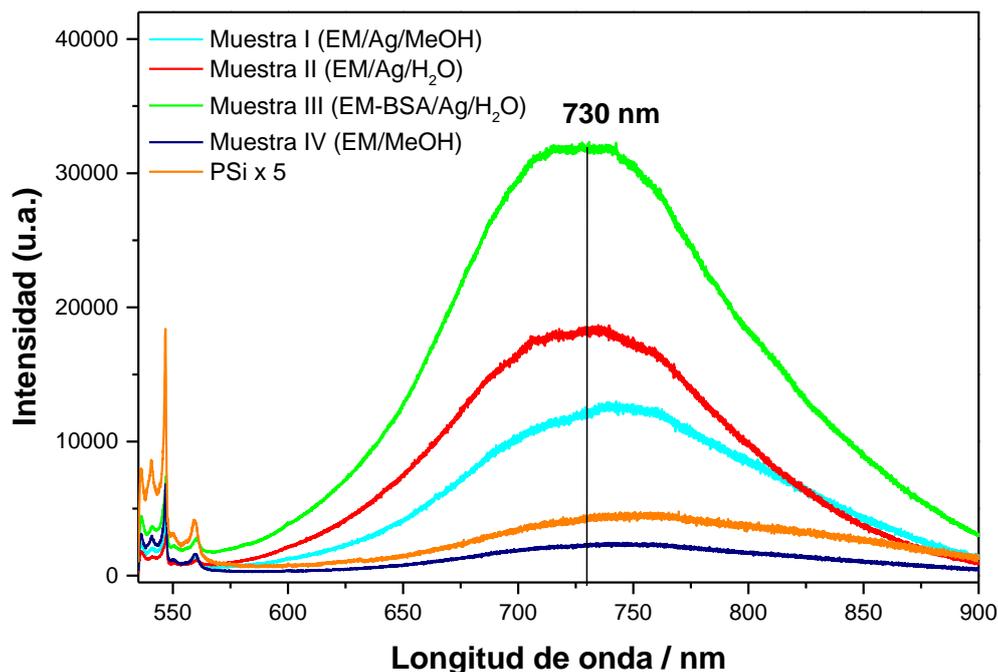


Figura 6.7. Espectros de emisión de fluorescencia a $3 \mu\text{m}$ de la interfase Si-PSi de diferentes láminas de PSi cargadas a presión atmosférica: muestra I (EM/Ag/MeOH), muestra II (EM/Ag/H₂O), muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O), muestra IV (EM/MeOH) y PSi sin cargar. Tamaño de poro: 60 nm. $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{nm}$.

Por lo tanto, las AgNPs presentan dos principales ventajas: primero, actúan como unión entre la superficie de los poros del PSi y el fármaco, permitiendo su inmovilización y, en segundo lugar, producen un aumento de la señal de fluorescencia del fármaco debido al efecto MEF, que es claramente apreciable. Este aumento de la intensidad de fluorescencia varía con el disolvente utilizado en el proceso de introducción de las NPS en la matriz y disminuye en todos los casos después de 30 días de la preparación.

En ninguna de las muestras cargadas en PSi se observó efecto SERS. Esto es debido a dos factores; el primero la alta intensidad de la fluorescencia y el segundo la ausencia de agregados de NPs, lo que permite que se produzca el efecto MEF pero evita el SERS. Solo las NPs aisladas con un tamaño más pequeño que los canales del PSi son capaces de penetrar en los poros. Sin embargo, los agregados de NPs producidos por la EM y necesarios para que se dé efecto SERS, permanecen en la superficie de las capas de PSi y

son eliminados en el proceso de lavado de las muestras que se realiza tras su preparación. Esto fue confirmado por la existencia de espectro SERS en la interfase de PSi-aire de muestras no lavadas.

El análisis de los espectros de las láminas de PSi cargadas con las muestras de EM utilizando vacío en el proceso presenta, fundamentalmente, variación en la intensidad de las bandas respecto de las láminas que se cargaron a presión atmosférica, por gravedad.

El análisis comparativo de la intensidad de la señal espectroscópica de EM para las diferentes disoluciones utilizadas en la infiltración del fármaco en los poros se realizó a través del factor de amplificación de la emisión de fluorescencia (EF). Este factor se calculó, en cada caso, como la relación entre el máximo de la señal obtenida para una muestra y su valor en la muestra IV (Em/MeOH), que es la que se ha tomado como referencia. Todos los espectros que se comparan se han tomado a la misma distancia de la interfase Si-PSi y todos los espectros se han normalizado a la banda Raman del Si cristalino.

La tabla 1. muestra los valores de los factores de amplificación, EF, para los espectros de las diferentes láminas de PSi cuando se cargaron a presión atmosférica o con vacío. Para las infiltradas a presión atmosférica se dan valores en el momento de la infiltración y transcurridos 30 días desde su fabricación para controlar la estabilidad de las muestras. Como puede verse los valores para el EF varían entre 10 y 24. El mayor aumento se obtuvo con la muestra III (Em-BSA/Ag/H₂O), donde la proteína está presente y como se ha comentado anteriormente el efecto MEF es máximo. Como la concentración de EM en esta muestra fue diez veces menor que en otras muestras (ver materiales), el EF estimado debe considerarse como el límite más bajo. No fue posible hacer experimentos de esta muestra con mayor concentración por problemas de solubilidad.

No se observa amplificación de la fluorescencia con los complejos EM-BSA/Ag cuando están cargados en condiciones de vacío. Esto podría deberse a cambios estructurales en la proteína (posible desnaturalización) debido a las condiciones de vacío utilizadas en la carga, y en consecuencia en el complejo fármaco-proteína.

El EF disminuye para las muestras en los dos disolventes, agua o alcohol, después de 30 días de la preparación, debido, fundamentalmente, a la oxidación del PSi. Los complejos EM/Ag presentan mayores aumentos de la fluorescencia cuando se cargan a

vacío que a presión atmosférica en solución de MeOH, sin embargo, muestran menor intensificación cuando están cargados en vacío que a presión atmosférica, para soluciones en H₂O. Este comportamiento puede explicarse por la diferente viscosidad de cada disolvente, que favorece una u otra condición de inmovilización.

Hay que tener en cuenta la presencia de dos fenómenos que pueden influir en la intensidad de las bandas y que pueden hacer que la intensidad de la emisión de fluorescencia no sea proporcional a la concentración. El primero de ellos es el "*inner filter effect*" (efecto interno de filtro, reabsorción), el cual se minimiza a las concentraciones a las que trabajamos. El segundo sería la transferencia de energía entre la EM y el PSi. La cuantificación cada una de estas dos contribuciones independientes es difícil y dado que afectarían a todas las muestras por igual no se han tenido en cuenta en la estimación del valor global de EF mostrado en la tabla 1.

Tabla 1. Factor de amplificación de fluorescencia, EF, de las muestras estudiadas.

		EF	
	<i>Presión atmosférica</i>	<i>Presión atmosférica, 30 días</i>	<i>Vacío</i>
Muestra I (EM/Ag/MeOH)	10	7	20
Muestra II (EM/Ag/H ₂ O)	14	5	5
Muestra III (EM-BSA/Ag/ H ₂ O)	24	5	1

Otro factor importante a analizar es la penetración de las NPs con EM en los poros de las láminas de PSi. Este análisis se llevó a cabo a partir de la caracterización de los espectros obtenidos, para las diferentes muestras, a lo largo de la sección transversal de las capas de PSi cargadas, con una resolución espacial de 1 μ m. La figura 6.8. muestra la altura de la emisión de fluorescencia a $\lambda_{\text{emiss}} = 745$ nm para todas las muestras cargadas a presión atmosférica, después de haber normalizado todos los espectros a la banda Raman del Si cristalino.

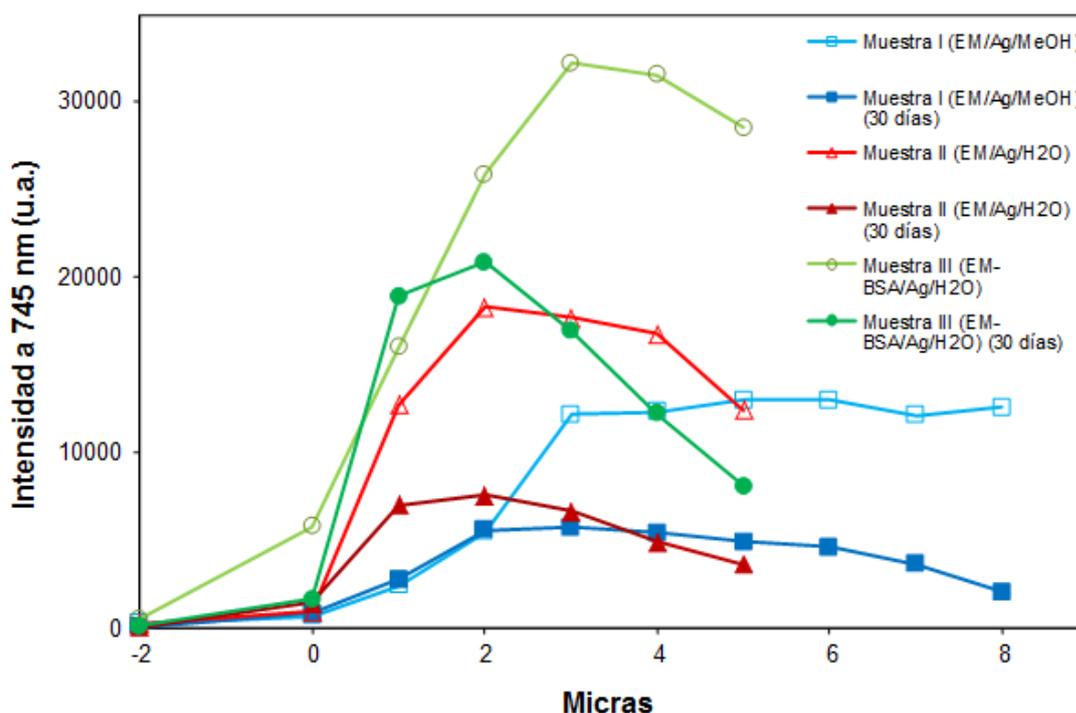


Figura 6.8. Intensidad de la emisión de fluorescencia a $\lambda_{\text{emiss}} = 745$ nm de la sección transversal, a diferentes distancias de la interfase Si-PSi (origen 0 micras), de las diferentes láminas de PSi analizadas cargadas con: muestra I (EM/Ag/MeOH), muestra II (EM/Ag/H₂O) y muestra III (EM-BSA/Ag/H₂O). Medidas realizadas en las muestras recién preparadas y 30 días después de su preparación. Tamaño de poro: 60 nm. $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm.

Como puede verse en la figura 6.8. la penetración no es la misma para todas las muestras. La preparación de la muestra tiene una gran importancia en la inmovilización de los complejos EM-Ag dentro del poro de PSi. Las muestras cargadas con los complejos de EM/Ag disueltos en MeOH muestran un comportamiento diferente a las que están cargadas con los complejos EM/Ag disueltos en H₂O. En las muestras donde el disolvente es MeOH las NPs se inmovilizan a lo largo del nanoporo de forma uniforme, sin posiciones preferenciales y la cantidad de moléculas cargadas permanece constante como se deduce de los valores similares de fluorescencia obtenidos.

En el caso de muestras cargadas con los complejos disueltos en H₂O, la infiltración de las NPs con EM no es uniforme. Hay una posición donde la intensidad es máxima y, por tanto, la acumulación de NPs es mayor. Esa posición es la que está a 2 o 3 μm de la interfase Si-PSi. La presencia de BSA en los sistemas que se infiltran no presenta ninguna característica diferente a las otras muestras acuosas infiltradas. Después de 30 días de preparación, la disminución de la intensidad máxima a $\lambda_{\text{emiss}} = 745 \text{ nm}$ es notable. En todos los casos, las zonas que están más cercanas a la interfase PSi-Aire muestran mayores cambios, debido a procesos de oxidación del PSi, que se produce en menor medida en el interior de los poros.

6.1.2. “Core-Shell”

Los “*core-shell*” sintetizados se caracterizaron por distintas técnicas para encontrar el sistema que, además de transportar la EM, produjera una mayor amplificación de la intensidad de fluorescencia del fármaco, aumentando así la sensibilidad en la detección del mismo. Esto permitirá una disminución en el límite de detección y facilitará su seguimiento por el organismo en su camino a las células enfermas.

Se realizaron imágenes TEM de todos los sistemas “*core-shell*” sintetizados, con los dos métodos de fabricación y con los dos métodos de lavado, para determinar los espesores de la capa de dióxido de silicio y verificar la uniformidad de las NPs formadas en cada caso (figura 6.9.).

Los sistemas sintetizados según el método 1 dan lugar a un recubrimiento con un espesor medio de 3 nm y las imágenes obtenidas (figura 6.9.a) indican que éste es irregular. Por el contrario, en los sistemas con recubrimiento de mayor grosor, sintetizados usando el método 2 (figura 6.9.b, c, d), se forma una capa uniforme de dióxido de silicio: 2,5 μl de TEOS producen espesor medio de 28 nm; 3,5 μl de TEOS producen espesor medio de 36 nm y 5 μl de TEOS producen espesor medio de 40 nm. En todos los casos se aprecia una disminución de espesor de la capa de dióxido de silicio a medida que se utiliza menor volumen de TEOS.

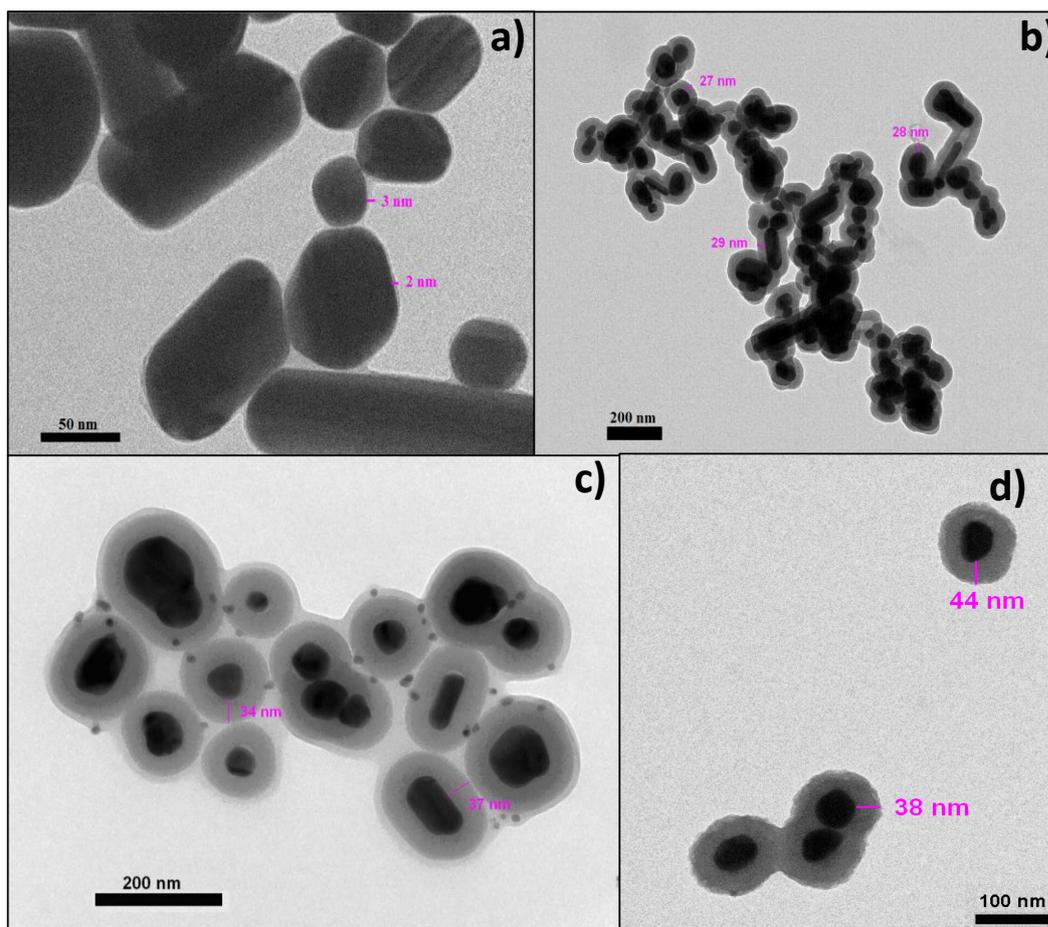


Figura 6.9. Imágenes TEM de los sistemas “*core-shell*” sintetizados obtenidos por: a) método 1 y lavados por el método II, b) método 2 con 2,5 μ l de TEOS y lavados por el método I, c) método 2 con 3,5 μ l de TEOS y lavados por el método II y d) método 2 con 5 μ l de TEOS y sin lavar.

También se utilizaron dos métodos de lavado diferentes. El método I tenía más ciclos de lavado (disolución y posterior centrifugación con H₂O:EtOH (5:4) tres veces a 3500 rpm durante 30 minutos), que el método II (disolución y posterior centrifugación con agua una sola vez a 4500 rpm durante 30 minutos).

La diferencia que pudo establecerse entre sistemas lavados y sistemas no lavados no parece residir en la estructura de los mismos, sino en el medio: las muestras sin lavar presentan un pH = 10,0 y en las lavadas éste pasa a pH = 5,0.

Los sistemas “*core-shell*” se sintetizaron a partir de coloide AgCT. El espectro UV-Visible del coloide de partida presenta un máximo a $\lambda_{\text{max}} = 407$ nm, correspondiente a la absorción del LSP de las NPs metálicas.

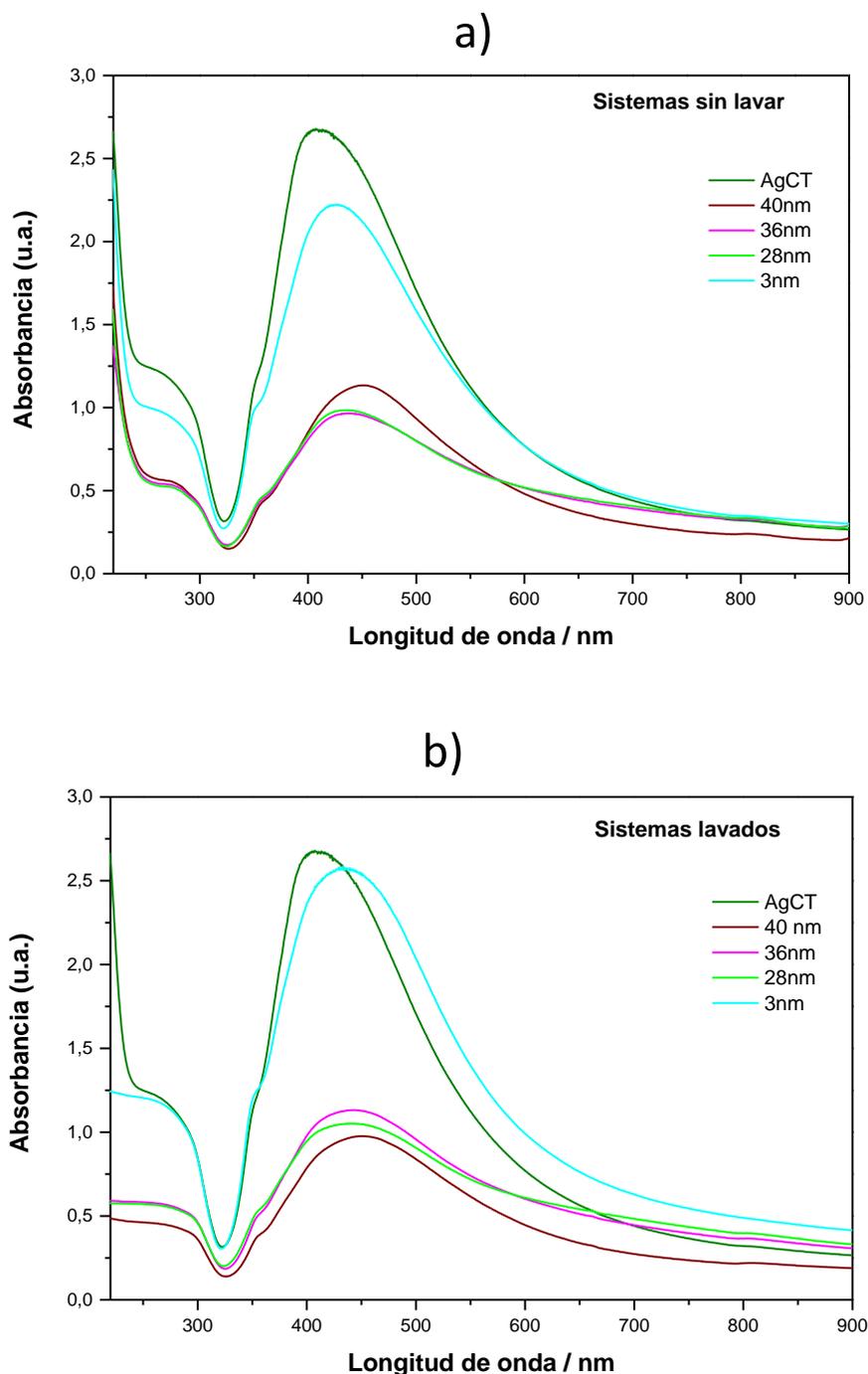


Figura 6.10. Espectros de absorción UV-Visible de los sistemas “*core-shell*” sintetizados con diferentes espesores de SiO₂, 40 nm, 36 nm, 28 nm, 3 nm y AgCT sin recubrir. a) sin lavar y b) lavados.

Este máximo (figura 6.10.) se desplaza a longitudes de onda mayores al aumentar el grosor de la capa de dióxido de silicio. La intensidad de la banda de absorción es mayor para las NPs de 3 nm de espesor que para el resto. Esta tendencia coincide con la que presentan sistemas similares en la bibliografía y es debida al aumento del índice de refracción local alrededor del núcleo de plata inducido por el recubrimiento de dióxido de silicio y a la agregación de las NPs metálicas. La tabla 2. muestra los valores de λ_{\max} de absorción para los diferentes “*core shell*” sintetizados.

Tabla 2. Longitud de onda de absorción máxima en los espectros UV-Visible de los sistemas “*core-shell*” sintetizados.

	Ag@SiO ₂ 3nm		Ag@SiO ₂ 28nm (2,5 µl TEOS)		Ag@SiO ₂ 36nm (3,5 µl TEOS)		Ag@SiO ₂ 40nm (5 µl TEOS)	
	Abs	λ_{\max} (nm)	Abs	λ_{\max} (nm)	Abs	λ_{\max} (nm)	Abs	λ_{\max} (nm)
Sin lavar	2,9	420	1,0	436	1,0	438	1,1	450
Lavadas (Método 1)		-	1,1	439	1,1	444	1,0	452
Lavadas (Método 2)	2,6	433		-	0,5	457	0,6	471

Con ambos métodos de lavado se obtuvieron resultados espectroscópicos similares y no se apreció ninguna diferencia notable, ni en el aspecto, ni en el tamaño, de las capas de dióxido de silicio.

Una vez caracterizados los sistemas “*core-shell*” sintetizados se procedió a formar el complejo con el fármaco. En los nuevos sistemas la EM se adsorbe en los poros de la capa de dióxido de silicio. La caracterización de estos nuevos sistemas se hizo mediante espectroscopía MEF de la EM.

Se realizaron medidas de fluorescencia excitando con la línea láser de 532 nm en resonancia con el LSP de las AgNPs que forman el núcleo. En la figura 6.11. se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de EM inmovilizada en los “*core-shell*” sintetizados sin proceso de lavado posterior.

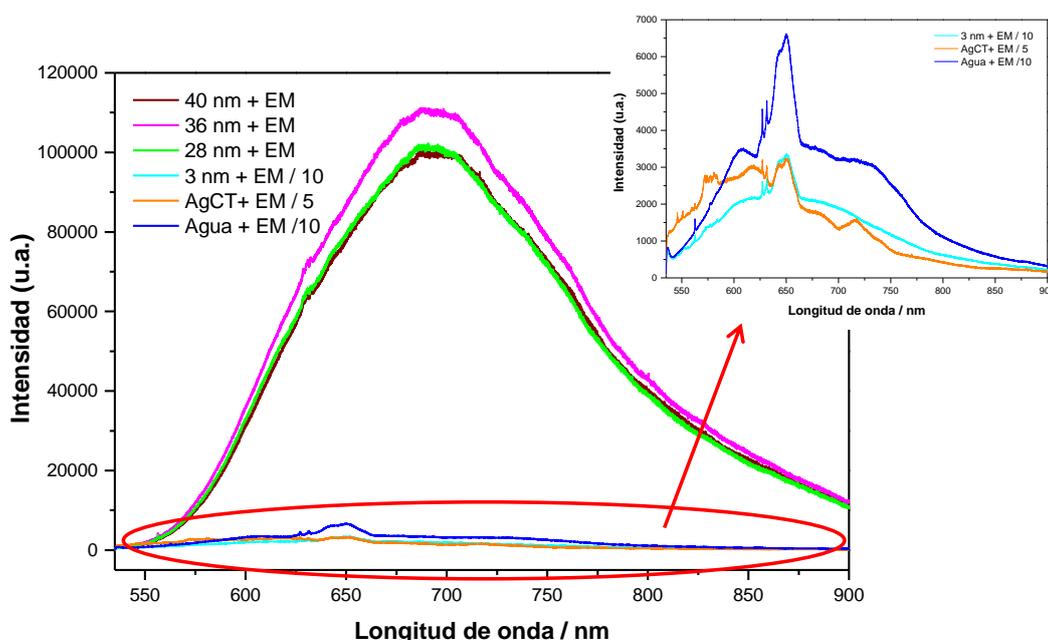


Figura 6.11. Espectros MEF de EM en los sistemas “*core-shell*” sin lavar de diferentes espesores (40 nm, 36 nm, 28 nm y 3 nm), así como en coloide AgCT. Se presenta también el espectro de fluorescencia de EM en disolución acuosa. $\lambda_{exc} = 532\text{nm}$.

Se obtuvieron espectros de EM: a) en disolución acuosa (pH = 7,0), b) utilizando coloide de plata AgCT y c) inmovilizada en los sistemas “*core-shell*”. Los sistemas a) y b) se consideran muestras de referencia y, como puede observarse en la figura 6.11., en estos casos la banda de emisión de fluorescencia de EM indica la presencia de agregados del fármaco. En el caso de que éste se encuentre adsorbido en la superficie de las NPs metálicas el “*quenching*” de la emisión de la fluorescencia es mayor que la amplificación debido a un efecto de corta distancia metal-fluoróforo. En estas condiciones de pH, cercano al pK_{a2} , hay un número considerable de monómeros y el número de moléculas agregadas no es suficiente para crear una capa de espaciador óptima para la aparición de

efecto MEF. Por otro lado, la presencia de moléculas de EM adsorbidas en la superficie de las NPs metálicas permite la amplificación de la señal Raman y por tanto efecto SERS.

El análisis de los espectros de EM utilizando “*core-shell*” indica que estos sistemas presentan diferente comportamiento. En primer lugar, salvo para el de menor espesor, la banda que se observa es la característica del monómero, como corresponde al pH del medio (pH = 10). Los sistemas con capa de sílice de 3 nm presentan una intensidad de la emisión de fluorescencia similar a la que aparece en las muestras del fármaco en presencia de coloide AgCT y se observa espectro SERS muy débil. Así, la distancia que se establece entre el metal y el fármaco no es suficiente para que haya MEF y el efecto de amortiguamiento de la fluorescencia es superior al de amplificación. Esto indica que la presencia de esta capa tan fina no modifica, considerablemente, desde un punto de vista fluorescente, el comportamiento del sistema EM-NPs y que la capa irregular de sílice facilitaría la posibilidad de que se formen agregados de fármacos en la superficie del metal o entre los grupos de nanoestructuras, a pesar del pH = 10,0, claramente básico. Habría que señalar, además, que el pH y las características fisicoquímicas de la interfase metal-disolvente son propias y diferentes a las del seno del coloide. Respecto a la desaparición de la amplificación Raman, la explicación se encuentra en la ausencia de moléculas adsorbidas en la superficie de las NPs metálicas, por la presencia de la capa de dióxido de silicio, que hace que no haya primera esfera de fármaco y, por tanto, que no haya SERS.

Por el contrario, los sistemas con capa de sílice de mayor espesor presentan un gran aumento de la fluorescencia del fármaco por ser este grosor el que establece la distancia óptima para que el “*quenching*” sea menor que la amplificación y haya, por tanto, efecto MEF. Entre los sistemas que tienen capa de sílice más gruesa se obtiene la máxima intensidad de fluorescencia con el fabricado con 3,5 μ l de TEOS, que presenta un espesor promedio de 36 nm. Los otros dos casos, de espesores medios de 28 nm y 40 nm, presentan efecto MEF pero menos que el de 36 nm. Esto confirma, tal y como indica la teoría, que la intensidad de fluorescencia no varía de forma lineal con la distancia fluoróforo-metal, sino de forma sinusoidal. En nuestro caso la distancia óptima es la de 36 nm. Respecto de la espectroscopía Raman, ninguno de los sistemas con capa gruesa de sílice presenta señales SERS. Al igual que ocurría con el sistema de capa de 3 nm, al encontrarse las moléculas separadas del metal y a una cierta distancia de la superficie de las NPs, no existe primera corona de fármaco y no se observa espectro SERS.

A continuación se analizaron los espectros de fluorescencia de las muestras después de lavadas, que pueden verse en la figura 6.12.

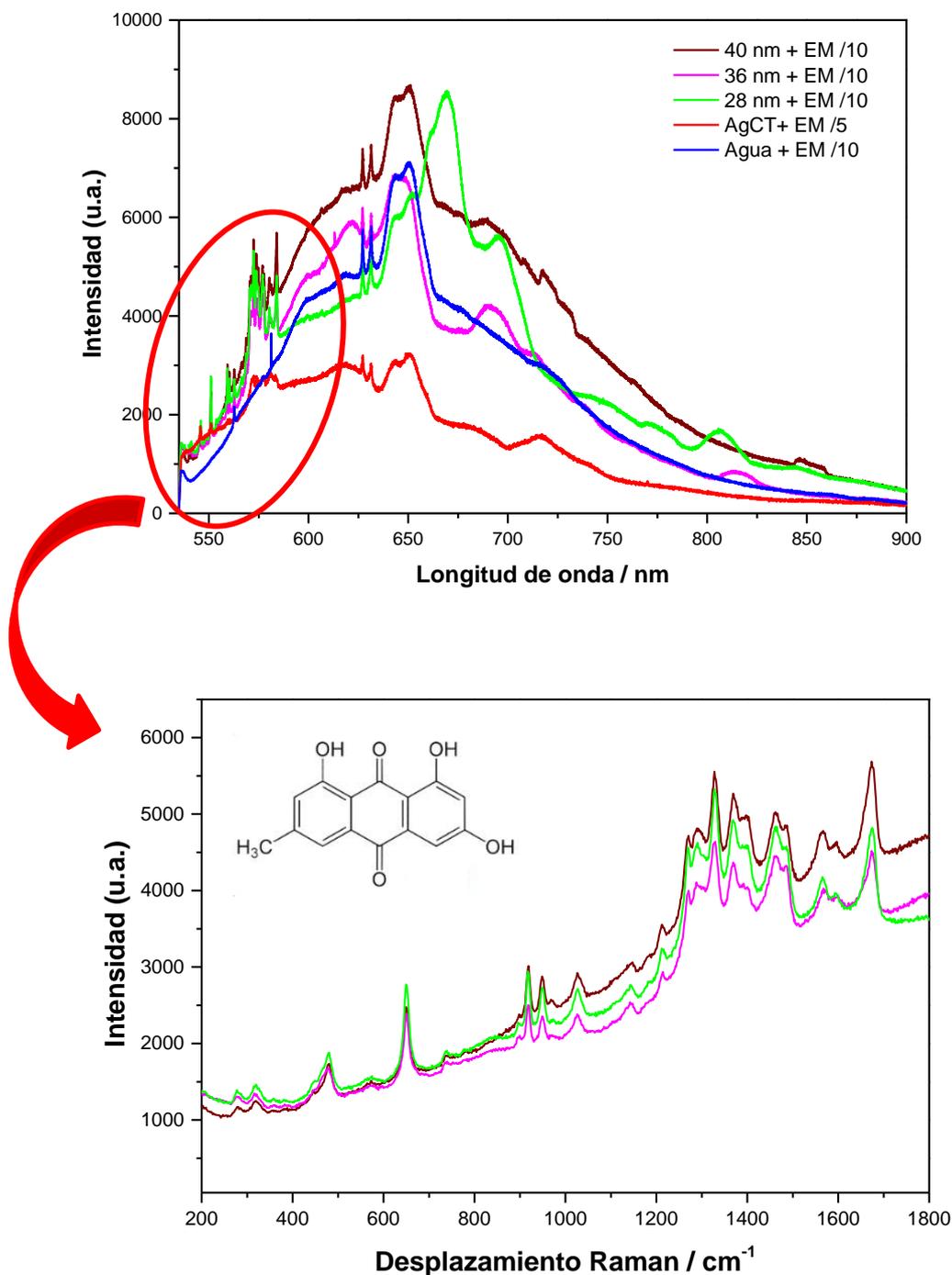


Figura 6.12. Espectros SERS y MEF de la EM en los sistemas “core-shell” lavados de diferentes espesores (40 nm, 36 nm y 28 nm), así como en coloide AgCT. Se presenta también el espectro de fluorescencia de EM en disolución acuosa. $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{nm}$.

Los resultados obtenidos en el caso de sistemas “*core-shell*” lavados son muy distintos de los que se obtienen en los mismos sistemas sin lavar. En todos los casos desaparece el gran efecto MEF y además, aparecen bandas SERS del fármaco. Las bandas de emisión de fluorescencia que aparecen son las características de agregados del fármaco y no aparece monómero de EM.

La disminución en la amplificación de la fluorescencia puede deberse a que la presencia de agregados del fármaco aumenta la distancia metal-fármaco, de modo que ya no es la distancia óptima para un aumento máximo. Recuérdese que en el párrafo anterior se veía como no son los “*core-shell*” con capa de mayor espesor los que presentan mayor efecto MEF, sino los que tienen un espesor intermedio.

La explicación a la aparición de espectro SERS puede radicar en varias causas. En primer lugar, el proceso de lavado puede provocar la desestabilización de la capa de dióxido de silicio de los “*core-shell*” haciendo que en algunas NPs o en alguna parte de su superficie, ésta quede sin recubrir y las moléculas de EM que se adsorben en esos puntos den amplificación Raman. Aunque el porcentaje de moléculas con este efecto fuese pequeño, y no se hubiese detectado en las imágenes TEM adquiridas, podría ser suficiente para ver el espectro SERS. En segundo lugar las diferencias existentes en el pH del medio (sin lavar pH = 10 y lavadas pH = 5), hace que se produzca un cambio en el estado iónico de la EM y que la especie estable (monoanionica o neutra) tenga más afinidad por la superficie de metal libre. Esto explicaría que a pH básico, en los “*core-shell*” sin lavar, donde la especie estable es la dianionica, con menos afinidad por la superficie, no se note este efecto. En tercer lugar, el pH en las proximidades de la superficie, en la llamada capa de Stern, con características fisicoquímicas propias, no es el mismo que el del medio, lo que modifica el comportamiento de las moléculas que se unen en esa zona. En cualquier caso es muy difícil aislar los diferentes efectos y atribuir una razón clara a este fenómeno.

En estos espectros SERS aparecen las bandas características de EM [62]. Por debajo de 1000 cm^{-1} las bandas que aparecen se deben a las vibraciones de tensión fuera del plano de los enlaces C-H en los anillos aromáticos. Las bandas en $1400\text{-}1320\text{ cm}^{-1}$ son atribuidas a movimientos de tensión en el plano acoplados a la tensión de los enlaces C-O. La intensidad de la banda a 649 cm^{-1} debida a la vibración de deformación fuera del plano de los O-H y la relación entre las bandas 940/920 indica la presencia de la forma monoaniónica.

6.2. Ketorolaco

La caracterización espectroscópica (SERS) de KT sobre NPs metálicas se llevó a cabo utilizando coloide de plata de hidroxilamina, AgHX. La elección del sistema nanotrasportador vino determinada por los siguientes factores: i) reducir la gran solubilidad del fármaco, para intentar que aumente su biodisponibilidad, ii) la facilidad para su síntesis. Para poder alcanzar este objetivo fue necesario llevar a cabo previamente el análisis de los espectros de vibración en ausencia de dichas NPs.

Existen en la bibliografía algunos datos básicos del KT: el espectro de absorción UV-Visible [91] y algunos espectros vibracionales, infrarrojo y Raman [182-184], correspondientes a la fase sólida.

En esta memoria se presentan los espectros de absorción UV-Visible, infrarrojo y Raman de KT, en disolución acuosa para diferentes condiciones de pH, concentración y longitud de onda de excitación así como en otros disolventes con diferentes polarizabilidades.

En la figura 6.13. se muestran los espectros FT-IR (coincidente con los reportados en la bibliografía [184]) y Raman de KT en estado sólido.

Se utilizaron todos los láseres de que disponíamos, $\lambda_{exc} = 325$ nm, 442 nm, 532 nm y 785 nm, para excitar el espectro Raman de KT en estado sólido. Excitando a 325 nm y 442 nm no se apreció ninguna señal Raman debido a la intensa señal de fluorescencia. Los espectros Raman excitados a 532 nm y 785 nm eran similares.

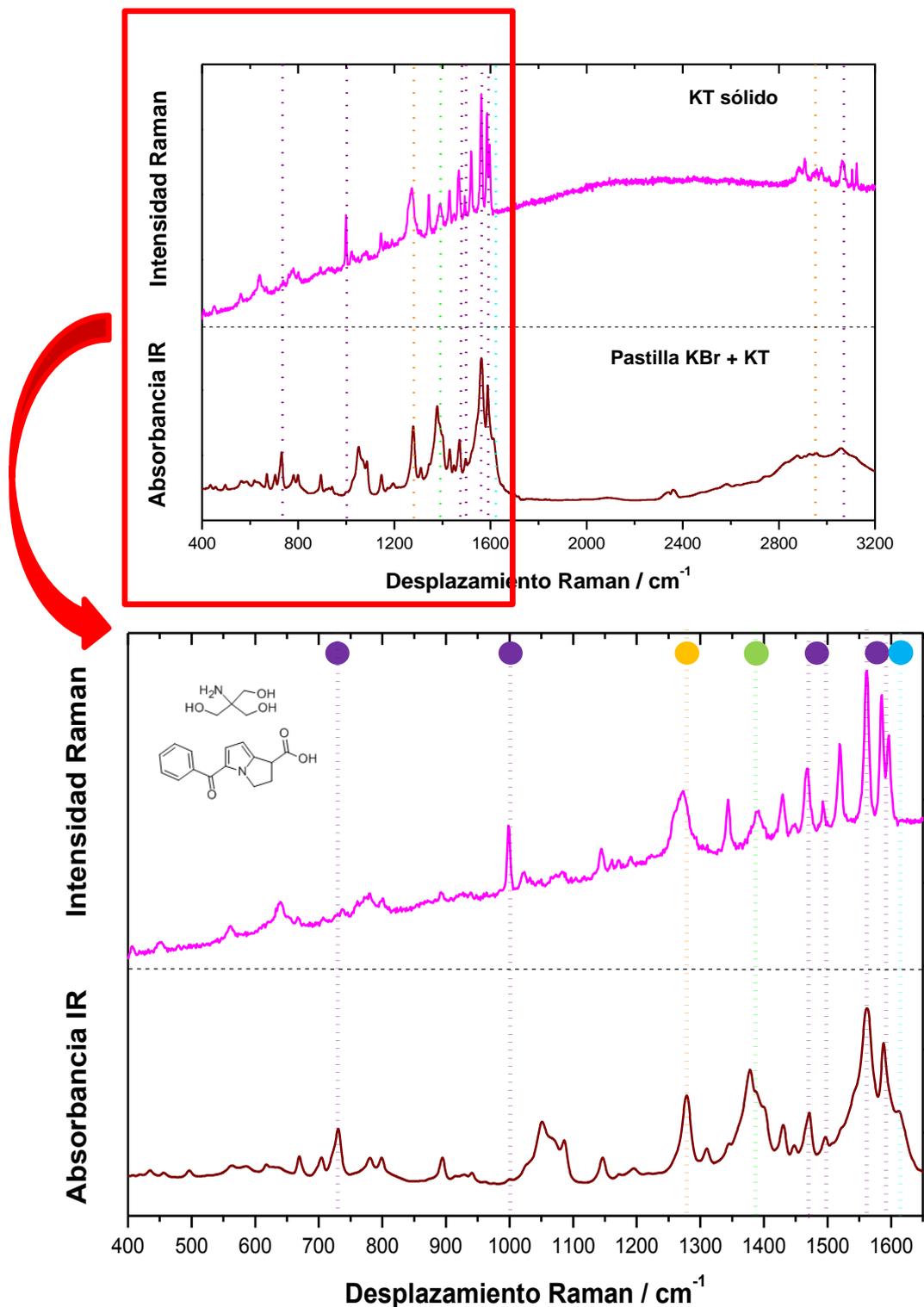


Figura 6.13. Espectros Raman y FT-IR de KT en estado sólido.

Espectro Raman: $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

El análisis de los espectros FT-IR y Raman, nos permitió asignar las bandas características [185] de los grupos moleculares de KT:

- Grupo aromático (●): Según la bibliografía consultada presenta bandas Raman en la zona de 1430-1625 cm^{-1} del espectro debidas a la tensión del enlace C=C, lo que nos permite asignar las bandas a 1467 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} , 1561 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} y 1596 cm^{-1} del espectro a este grupo.. La banda que aparece a 1000 cm^{-1} es debida a las vibraciones de deformación en el plano de los enlaces C-H, bastante intensa en Raman pero no en IR y la banda a 728 cm^{-1} , por las deformaciones fuera del plano, puede verse en IR pero no en Raman..
- Grupo carboxílico (●): tiene una banda por la tensión del C=O a 1277 cm^{-1} debido a la formación de dímeros, lo que generalmente ocurre en estado sólido y disoluciones concentradas.
- Diaril cetona (●): debido a la vibración de tensión del C=O, exhiben una banda intensa en IR en la zona de 1600-1670 cm^{-1} , a 1612 cm^{-1} en el espectro presentado, que en Raman no aparece.
- Pirrolizina (●): da lugar a bandas muy fuertes en IR y fuertes en Raman a 1380-1430 cm^{-1} debido a vibraciones de tensión en el plano de los enlaces C-C y C-H, en este trabajo se ha asignado la banda que aparece a 1390 cm^{-1} a este grupo.

Posteriormente se realizaron estudios de KT en disolución, con el fin de determinar la estructura y comportamiento de las diversas especies que aparecen en este caso. Se obtuvieron espectros Raman en disolución acuosa (SP = 0,681 [186]) a pH = 2,0, pH = 5,0 y pH = 8,0 teniendo en cuenta el pKa de la molécula y para mimetizar diversas condiciones fisiológicas. Para ayudar en la interpretación de los espectros en disolución acuosa, se utilizaron otros disolventes con distintas polarizabilidades (SP) [186], DMSO (SP = 0,830), 1-Propanol (SP = 0,658), 1,4-Dioxano (SP = 0,737).

El espectro UV-Visible de las disoluciones acuosas de KT, a pH = 2,0 y pH = 8,0 se muestra en la figura 6.14. El máximo de absorción varía ligeramente de posición debido a un equilibrio ceto-enólico (pKa = 3,5); la forma cetónica (cet), estable a pHs > pKa, presenta $\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm}$, mientras que la forma enólica (en), presente a pHs < pKa, tiene

$\lambda_{\max} = 320$ nm. Las longitudes de onda de los láseres disponibles, indicadas en la figura 6.14. con flechas, nos permitió iniciar el estudio intentando obtener espectros Raman y Raman resonante.

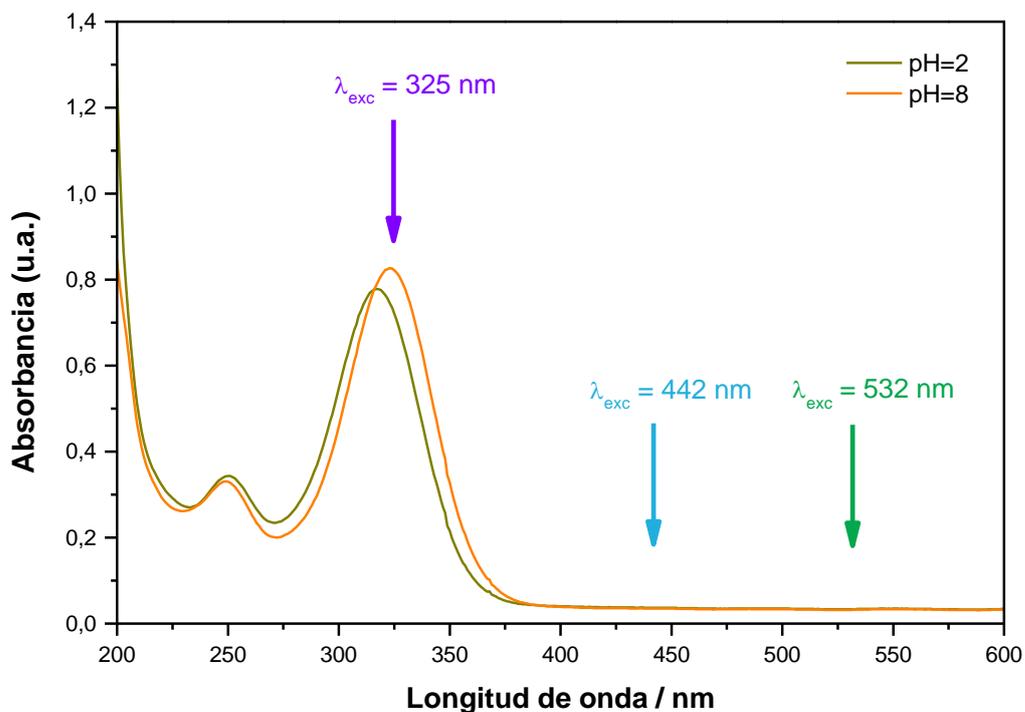


Figura 6.14. Espectros de absorción UV-Visible de KT (4×10^{-5} M) en disolución acuosa: pH = 2,0 y pH = 8,0. Las flechas indican las longitudes de onda de los láseres disponibles para excitación de los espectros Raman.

En la figura 6.15. se presentan los espectros Raman de una disolución acuosa de KT a diferentes pHs y con diferentes longitudes de onda de excitación, junto con el espectro del sólido. No se observó espectro Raman con excitación a 325 nm, condición de resonancia. Excitando a 785 nm se observa un espectro muy débil. Al utilizar como fuente de excitación los láseres de 442 nm y 532 nm se obtienen espectros con bandas más nítidas e intensas. La longitud de onda de excitación $\lambda_{exc} = 532$ nm presenta, además, la ventaja de estar en resonancia con el LSP de las AgNPs.

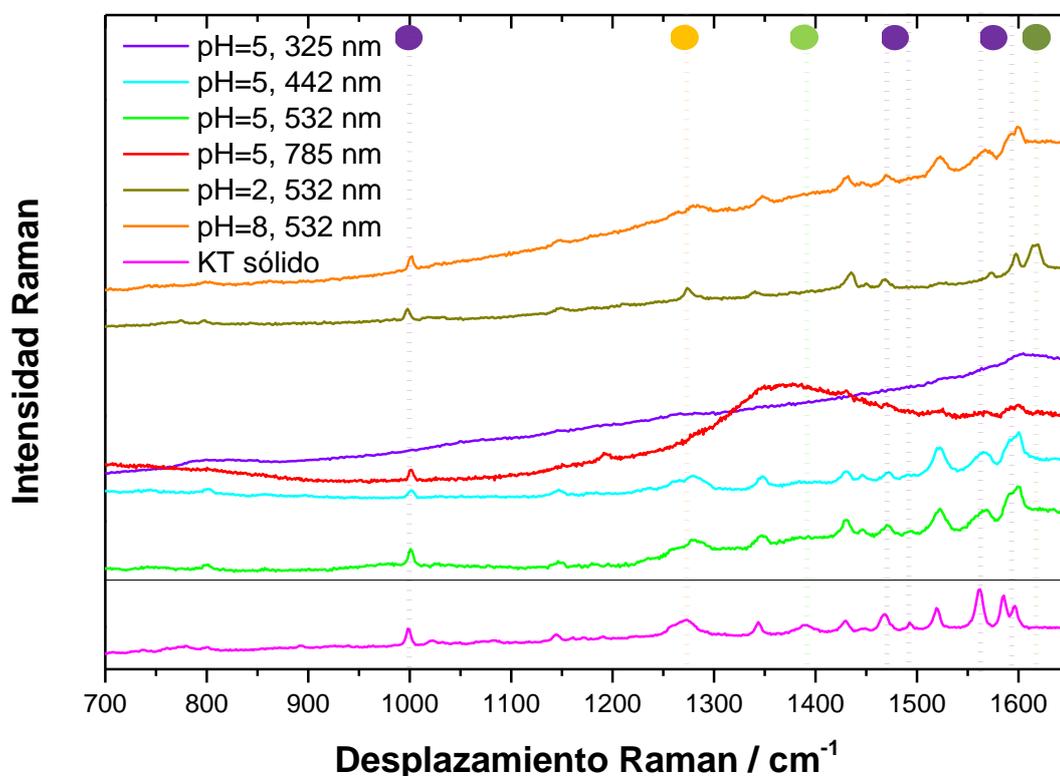


Figura 6.15. Espectros Raman de KT (4×10^{-3} M) en disolución acuosa a pH = 5,0 con: $\lambda_{\text{exc}} = 325$ nm, 442 nm, 532 nm y 785 nm. Y a pH = 2,0 y pH = 8,0 con $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm. Comparación frente al espectro Raman de KT sólido.

Los espectros obtenidos para las diferentes disoluciones no presentan grandes diferencias con el obtenido para el sólido. Cabe destacar que en el espectro a pH = 2,0, donde la molécula se encuentra en forma enólica, desaparece el doblete de la banda a 1600 cm^{-1} , debida a la vibración de tensión del enlace C=C del anillo bencénico, en presencia de un grupo C=O. También se observa una nueva banda a 1615 cm^{-1} (●) debido al aumento de la conjugación a este pH.

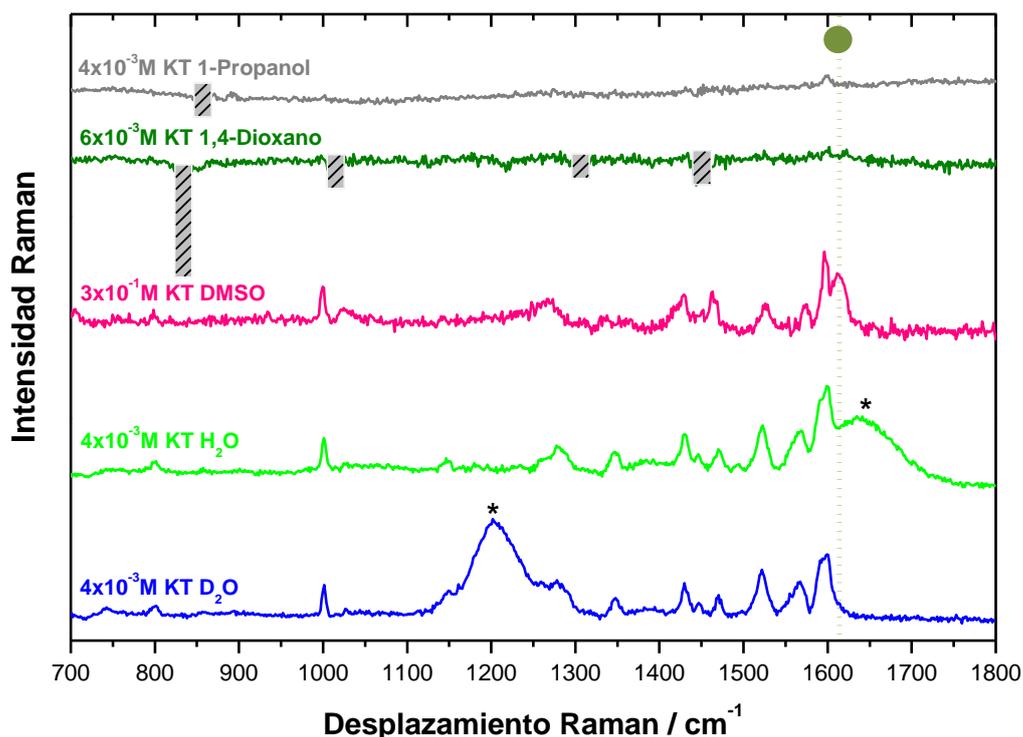


Figura 6.16. Espectros Raman de KT en distintos disolventes resultado de restar a cada uno de ellos el espectro del disolvente puro correspondiente: 1-Propanol ($4 \times 10^{-3} \text{M}$), 1,4-Dioxano ($6 \times 10^{-3} \text{M}$), DMSO ($3 \times 10^{-1} \text{M}$), H_2O ($4 \times 10^{-3} \text{M}$), D_2O ($4 \times 10^{-3} \text{M}$). $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. ▨ Artefactos debidos a la resta de los disolventes. Bandas de H_2O y D_2O marcadas con *.

La figura 6.16. muestra los espectros Raman de KT en varios disolventes obtenidos como el resultado de restar a cada uno de los espectros de la disolución el espectro del disolvente puro correspondiente, salvo en el caso del H_2O y D_2O .

Los que presentan una mejor relación señal ruido y mayor número de bandas son los correspondientes a los disolventes de mayor constante dieléctrica, el H_2O y D_2O , donde el KT es más soluble. En el caso del 1,4-Dioxano y 1-Propanol donde el KT presenta una menor solubilidad, la espectroscopía Raman no tiene sensibilidad suficiente para obtener espectros. Para H_2O , D_2O y DMSO, los espectros presentan variaciones no relevantes, lo que indica una estructura similar de KT en todos ellos. En DMSO aparece

de nuevo la banda a 1615 cm^{-1} debida al aumento de conjugación como pasa en disolución acuosa a $\text{pH} = 2,0$.

Después del estudio de los espectros Raman e IR se obtuvieron y analizaron los espectros UV-Visible y SERS de KT en coloide de plata, AgHX.

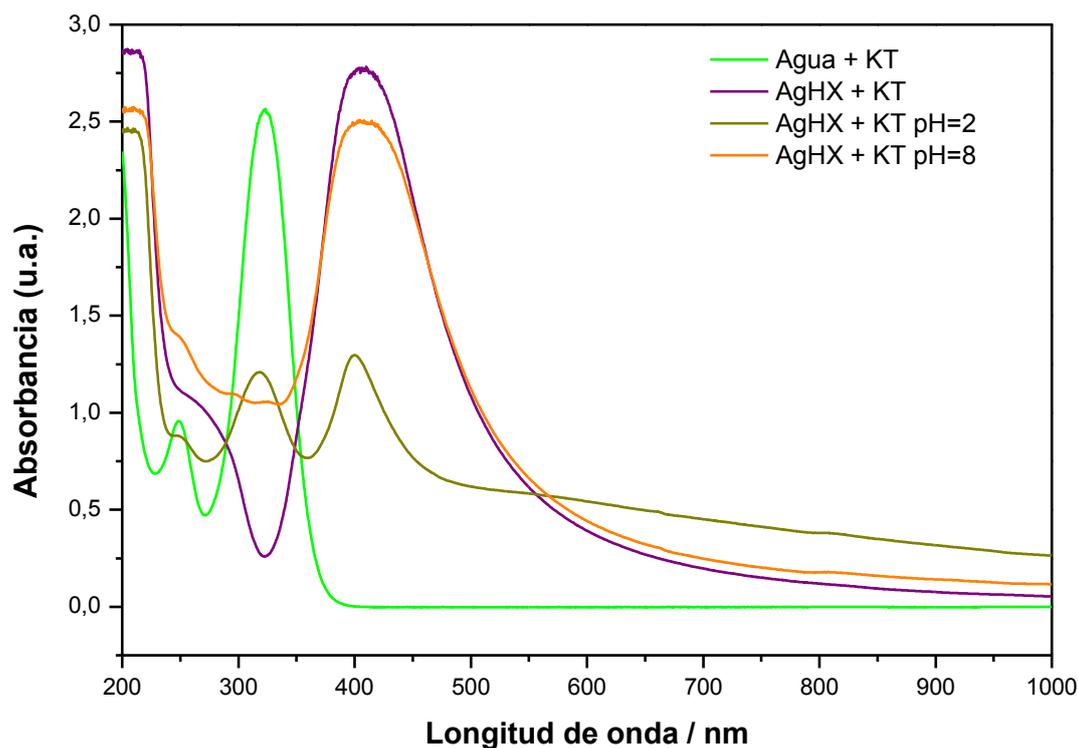


Figura 6.17. Espectros de absorción UV-Visible de KT ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) en AgHX: $\text{pH} = 5,0$, $\text{pH} = 2,0$ y $\text{pH} = 8,0$. Comparación frente al espectro de absorción de KT ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) en disolución acuosa a $\text{pH} = 7,0$.

La figura 6.17. muestra los espectros UV-Visible del coloide AgHX y de KT en disolución acuosa a $\text{pH} = 7,0$ y de las muestras utilizadas para SERS. En todas las disoluciones que tienen AgNPs aparece un máximo de absorción a $\lambda_{\text{max}} = 405\text{ nm}$ característica del LSP. La disolución acuosa de KT presenta la banda característica de absorción del fármaco a $\lambda_{\text{max}} = 325\text{ nm}$. En las disoluciones de KT en coloide AgHX aparecen los dos máximos, con intensidades relativas diferentes según el pH sea ácido o básico. A $\text{pH} = 2,0$ el coloide no es estable y la intensidad de la banda del LSP disminuye,

teniendo la misma altura que la del fármaco. Por el contrario a pH = 8,0 el coloide sí es estable y la banda de absorción del LSP es muy intensa, mucho más que la del fármaco. Hay que tener en cuenta, además, que la especie de KT adsorbida en la superficie de las NPs del metal tiene características propias porque el entorno es diferente y la especie adsorbida no tiene por qué tener el mismo comportamiento espectroscópico que en disolución.

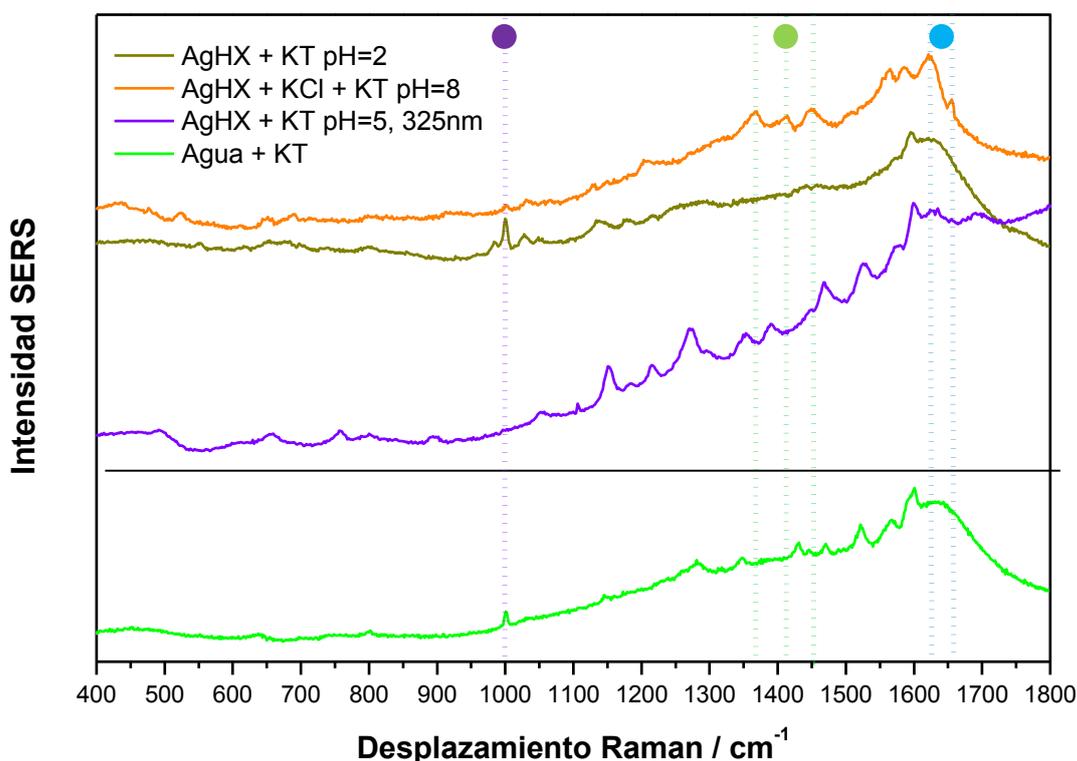


Figura 6.18. Espectros SERS de KT ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) en coloide AgHX: a pH = 2,0 (sin agregante y $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$), a pH = 8,0 (con agregante, KCl $4 \times 10^{-3} \text{M}$, y $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$) y a pH = 5,0, (sin agregante y $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$). Comparación frente al espectro Raman de KT ($4 \times 10^{-3} \text{M}$) en disolución acuosa a pH = 7,0 y $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Se obtuvieron espectros SERS a pHs = 2,0, 5,0 y 8,0, con y sin agregante y usando las líneas de excitación de 532 nm, que presenta resonancia con el LSP y 325 nm que permite obtener Raman resonante. Para pH = 2,0 solo se observa espectro sin agregante. Por el contrario a pH = 8,0 el uso de agregante facilita la aparición de HS, puntos de amplificación máxima y efecto SERS. Respecto de pH = 5,0 y usando la línea de excitación de 325 nm se obtiene SERS resonante (SERRS).

Algunos de los espectros SERS de KT obtenidos se muestran en la figura 6.18. En el caso de los espectros en AgHX, contrariamente a lo que ocurría en disolución acuosa, aparecen diferencias dependiendo del pH. La clara intensificación de la banda a 1000 cm^{-1} (●) en el espectro a pH = 2,0, característica de la respiración en el plano del anillo aromático, indica, que este grupo está cerca del metal y que, además, teniendo en cuenta las reglas de selección en SERS, dicho anillo está bastante perpendicular a la superficie. A pH = 8,0 se observan unas bandas nuevas en el espectro SERS, a 1623 y 1660 cm^{-1} (●) que se asocian a un grupo “ceto” (diaril cetona) cercano al metal, intensificándose las bandas asignadas a la parte pirrolizínica (●) pero no las correspondientes al grupo aromático.

A pH = 5,0, cercano al pKa, la molécula se encuentra en su forma cetónica, aunque también hay forma enólica en disolución. El espectro SERRS obtenido a $\lambda_{\text{exc}} = 325\text{ nm}$ es similar al espectro con $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{ nm}$ y pH = 8,0, sin embargo, destaca la amplificación que se produce de las bandas en la zona de $1300\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ características de la forma enólica.

La diferencia en intensidad de las diferentes bandas nos proporciona información acerca de la proximidad de los diferentes grupos de la molécula de KT a la superficie de la NP. El campo electromagnético cerca de la superficie del metal tiene mayor intensidad en la dirección perpendicular que en la paralela. Debido a este hecho, en SERS, las bandas Raman correspondientes a las vibraciones moleculares perpendiculares a la superficie se incrementan más que las correspondientes a las bandas paralelas. Estas reglas de selección de la superficie se pueden usar para entender, a la orientación relativa de una molécula a la superficie metálica. Mientras que a pH = 2,0 las bandas que se intensifican son las del anillo aromático, a pH = 8,0, son las bandas del grupo diaril-cetona las que presentan amplificación.

Así, el análisis conjunto de los espectros Raman y SERS de KT a diferentes pHs, permite proponer la forma de aproximación de las moléculas respectivas a la superficie de las NPs, así como su orientación relativa. Un esquema de la geometría propuesta puede verse en la figura 6.19.

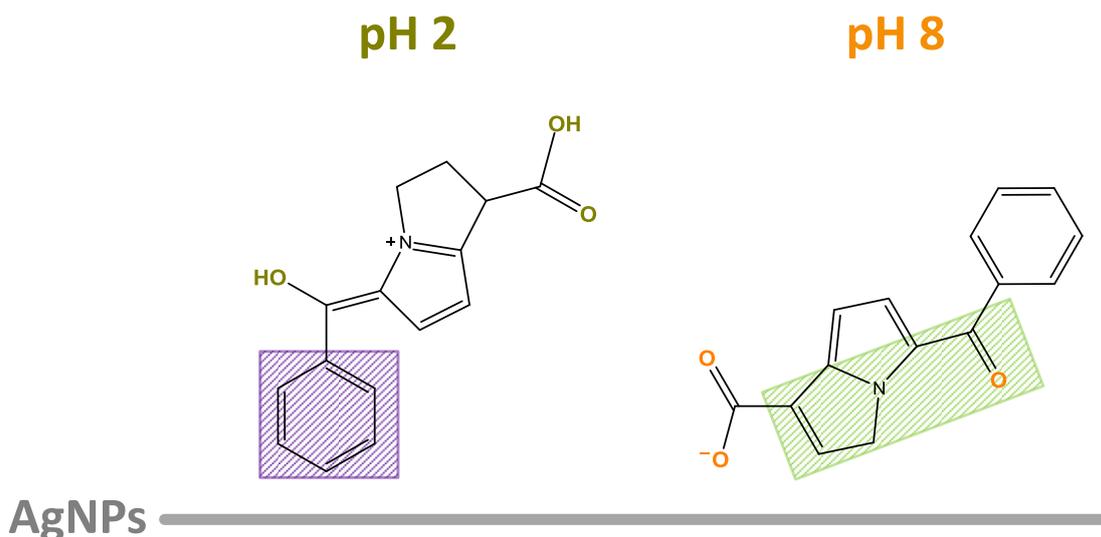


Figura 6.19. Representación de la forma de aproximación de las moléculas de KT a la superficie de las AgNPs propuesta en este trabajo, a $\text{pH} = 2,0$ y $\text{pH} = 8,0$.

Los resultados SERS presentados y discutidos en los párrafos anteriores indican que a $\text{pH} < \text{pK}_a$ la forma enólica de KT se aproxima a la superficie del metal por el anillo aromático que, además, se encuentra perpendicular a la misma ya que se intensifica principalmente un modo de vibración en el plano del anillo, mientras que a $\text{pH} > \text{pK}_a$ es el grupo pirrolizino de la forma cetónica el que se encuentra más próximo a la superficie metálica.

6.3. Indometacina

Al igual que en el caso de KT el estudio SERS de IM se llevó a cabo en coloide de plata, AgHX. En este caso el sistema nanotrasportador se eligió para aumentar la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco. La IM es prácticamente insoluble en agua por lo que se requieren técnicas de detección muy sensibles para poder estudiarla en disolución. Este sistema IM-NPs también es de fácil síntesis y no se había estudiado antes.

Como en el caso de KT, también no hay publicados espectros vibracionales infrarrojo y Raman de IM en disolución, tan solo se conocen resultados para el sólido [187-189]. De este fármaco existen datos en la bibliografía de espectros de absorción UV-Visible en metanol y otros disolventes orgánicos [190], y en disolución acuosa, en particular en lo referente a su fotoquímica [191].

Al igual que en el KT para caracterizar espectroscópicamente la IM junto con NPs se realizó un estudio previo del fármaco en estado sólido y en disolución acuosa con diferentes condiciones de pH, concentración y longitud de onda de excitación, además de utilizarse otros disolventes con diferentes polarizabilidades. Se adquirieron y analizaron espectros UV-Visible, infrarrojo y Raman de IM anteriores al estudio SERS.

Los espectros Raman y FT-IR de IM sólida se presentan en la figura 6.20. Estos espectros son característicos de la forma γ de IM [192], que forma dímeros mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxílicos de dos moléculas.

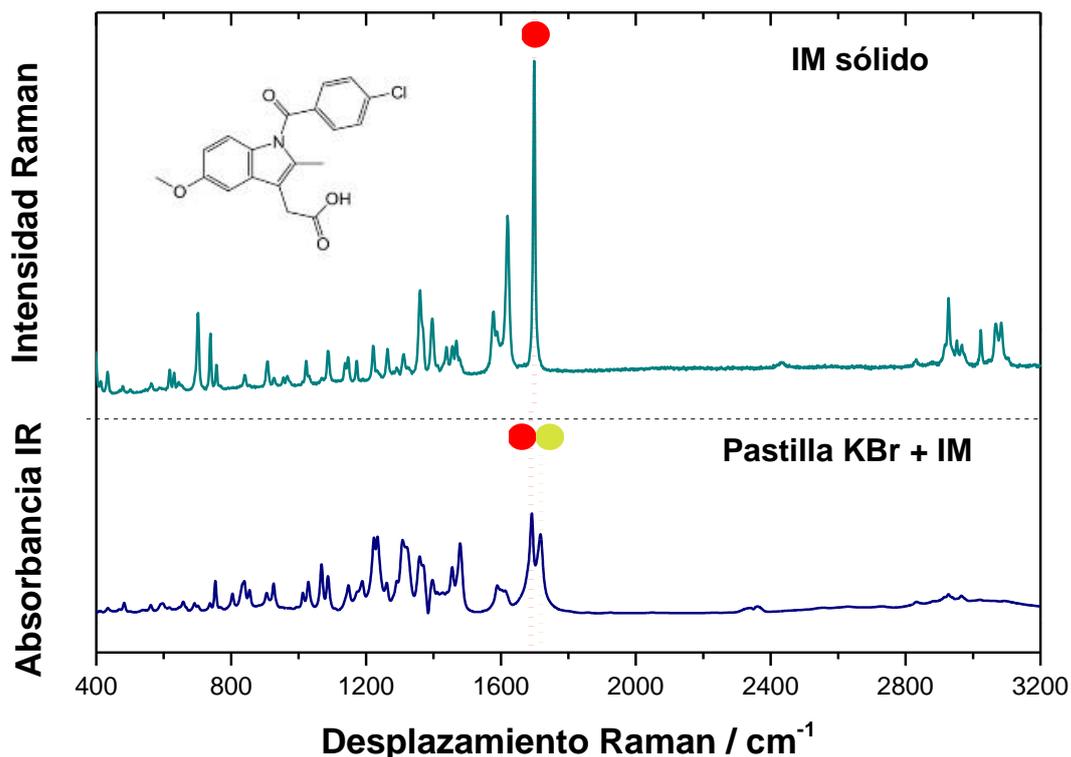


Figura 6.20. Espectros Raman y FT-IR de IM en estado sólido.

Espectro Raman: $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Las bandas más características y que diferencian las diversas formas cristalinas del fármaco son las debidas a las vibraciones de tensión del enlace C=O. En el caso de la γ -IM las bandas de vibración del C=O en el grupo benzoilo (●) aparecen a 1692 y 1698 cm^{-1} para IR y Raman respectivamente. La vibración asimétrica del enlace C=O del grupo carboxílico (●) en los dímeros cíclicos se observa a 1717 cm^{-1} en los espectros IR.

La IM presenta un $\text{pK}_a = 4,5$ por lo que se estudió el fármaco en disolución a dos pHs uno por encima y otro por debajo de este valor, para poder caracterizar espectroscópicamente las diferentes formas de la molécula. En la figura 6.21.se representan los espectros UV-Visible de IM a los dos pHs elegidos junto con las líneas laser de excitación disponibles.

La figura 6.21. indica que el espectro de absorción de IM no varía con el pH de forma apreciable y, por otro lado, que es posible observar un espectro de “resonancia Raman” de IM excitando con un láser que emita a 325 nm.

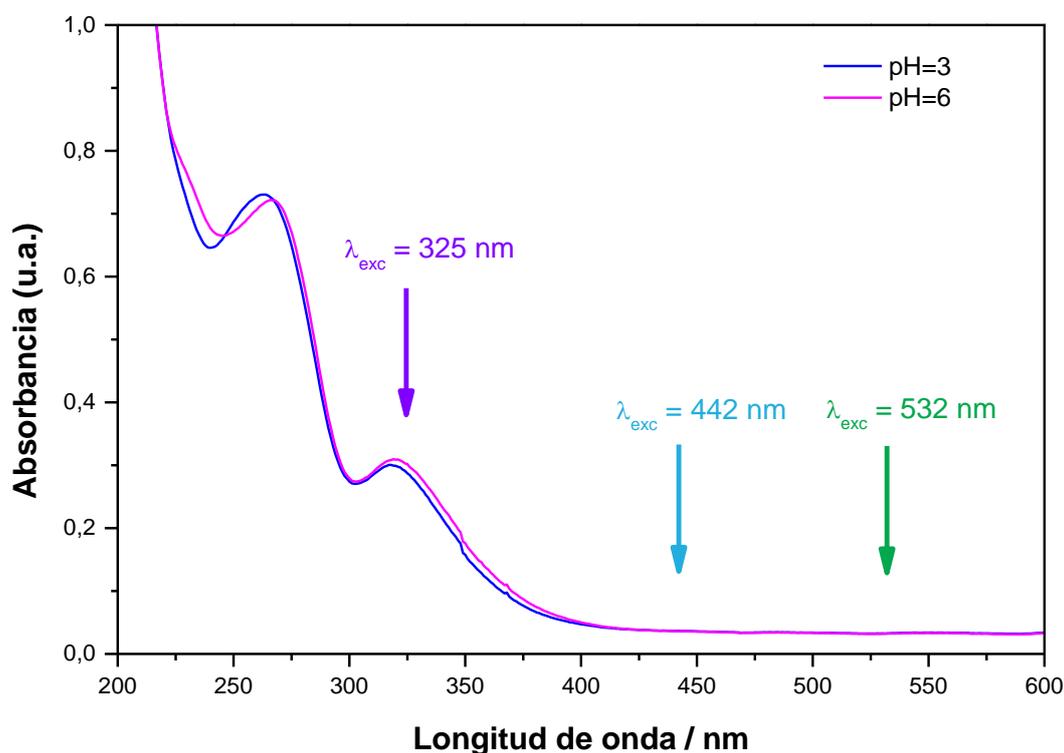


Figura 6.21. Espectros de absorción UV-Visible de IM (4×10^{-5} M) en disolución acuosa: pH = 3,0 y pH = 6,0. Las flechas indican las longitudes de onda de los láseres disponibles para excitación de los espectros Raman.

La baja solubilidad de IM en agua impide observar su espectro Raman en disolución acuosa. Por esto se utilizaron otros disolventes con diferente polarizabilidad [186], DMSO (SP = 0,830), EtOH (SP = 0,633) y acetonitrilo (SP = 0,645), para el estudio de IM en disolución. La figura 6.22. muestra el resultado obtenido de restar a cada uno de los espectros Raman de las disoluciones de IM el espectro del disolvente puro correspondiente.

El perfil espectral en disolución, similar en todos los disolventes empleados, es muy semejante al del sólido, forma γ de IM, capaz de formar dímeros, lo que permite afirmar que también existen éstos en las disoluciones [192, 193].

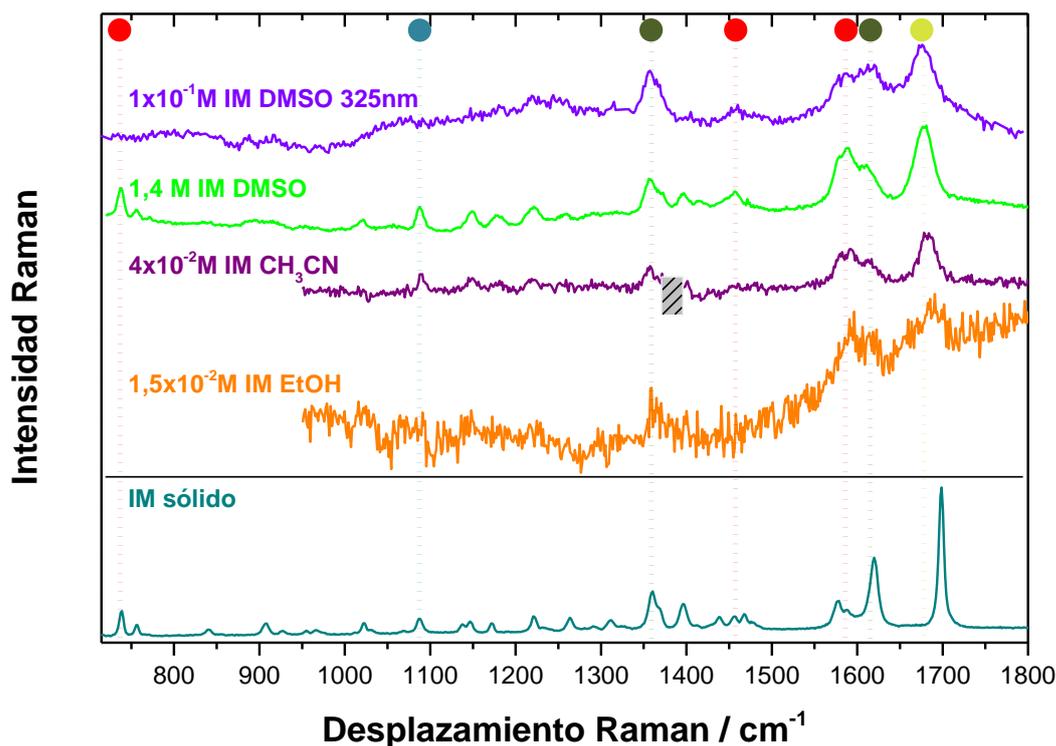


Figura 6.22. Espectros Raman de IM en distintos disolventes resultado de restar a cada uno de ellos el espectro del disolvente puro correspondiente: DMSO (1×10^{-1} M), $\lambda_{\text{exc}} = 325$ nm, DMSO (1,4 M), $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, acetonitrilo (4×10^{-2} M), $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, EtOH ($1,5 \times 10^{-2}$ M) $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm. Comparación frente al espectro Raman de IM en estado sólido. ▨ Artefactos debidos a la resta de los disolventes.

La IM presenta una banda de absorción a 325 nm por lo que al excitar a esta longitud de onda se produce resonancia. En la figura 6.22. pueden observarse, en estas condiciones, las bandas debidas a vibraciones del anillo del grupo indol (●). Una es la tensión de los enlaces C=C a 1360 cm^{-1} , y otra la del enlace C=N, a 1615 cm^{-1} .

También es posible asignar algunas bandas del grupo benzoilo (●). A 1457 cm^{-1} y 1586 cm^{-1} aparecen las bandas debidas a la vibración de tensión de los enlaces C-C del anillo aromático y a 737 cm^{-1} la correspondiente a la vibración de deformación del anillo fuera del plano. Así como las debidas a sus sustituyentes, vibración combinada del anillo con la de tensión del enlace C-Cl (●) a 1087 cm^{-1} y vibración de tensión del enlace C=O (●) a 1679 cm^{-1} .

Para caracterizar el comportamiento del fármaco adsorbido en la superficie de la AgNPs se obtuvieron espectros SERS de IM en coloide AgHX a dos pHs diferentes, pH = 3,0 y pH = 6,0, que aparecen en la figura 6.23.

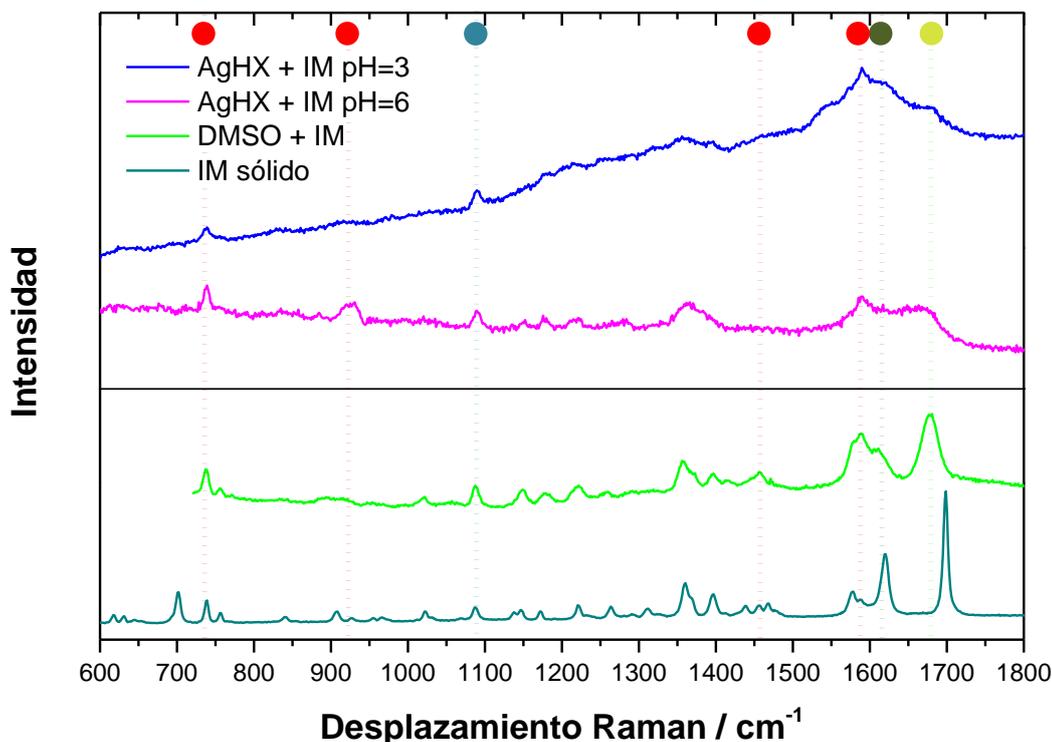


Figura 6.23. Espectros SERS de IM ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) en coloide AgHX: pH = 3,0 y pH = 6,0. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. Comparación frente a los espectros Raman de IM sólida y en disolución en DMSO (1,4 M). $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$.

Los espectros obtenidos a los dos pHs estudiados presentan diferencias, lo que indica que su adsorción sobre la superficie metálica es también diferente. A pH = 3,0 se obtiene un espectro muy débil que muestra las bandas del grupo benzoilo (●), de la vibración C-Cl (●), y de la vibración del enlace C=O (●), indicando que son estos grupos los más próximos a la superficie de las AgNPs. Las bandas correspondientes a las vibraciones del grupo indol (●) aparecen muy débiles, lo que indica que dicho grupo se encuentra más alejado de la superficie. Este espectro SERS es compatible con la formación de dímeros en la superficie de las NPs, que aparecen en la disolución en

DMSO. Desde un punto de vista estructural, a $\text{pH} < \text{pK}_a$ se produce un apilamiento de dímeros de forma casi perpendicular a la superficie de la plata y con el grupo benzoilo cerca de la misma.

A $\text{pH} = 6,0$ el espectro SERS es más intenso amplificándose tanto las bandas del benzoilo (●), como las del indol (●), lo que indica que ambos grupos están cerca de la superficie metálica. Por tanto, a diferencia de lo que ocurre a $\text{pH} = 3,0$, a $\text{pH} = 6,0 > \text{pK}_a$, puede concluirse una disposición de la molécula más paralela respecto de la superficie metálica y la no existencia de dímeros.

A partir de los resultados SERS presentados y discutidos en los párrafos anteriores es posible proponer la forma de aproximación y orientación de las moléculas de IM respecto de la superficie metálica, que se representa en la figura 6.24.

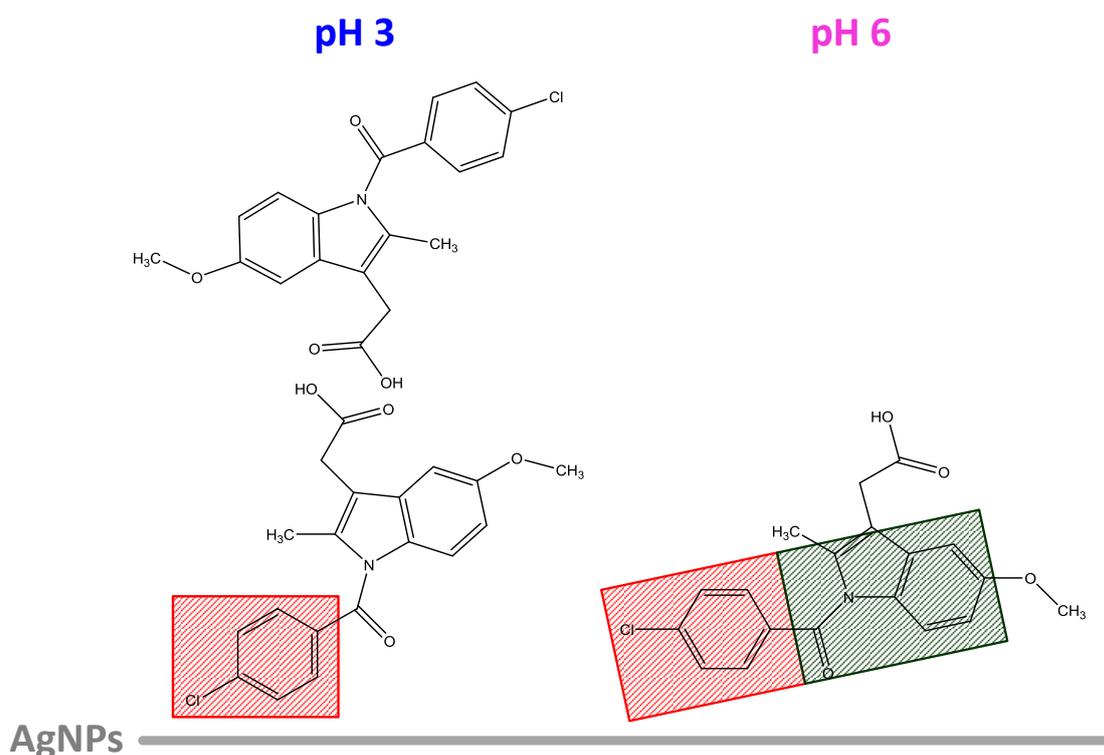


Figura 6.24. Representación de la forma de aproximación de las moléculas de IM a la superficie de las AgNPs propuesta en este trabajo, a $\text{pH} = 3,0$ y $\text{pH} = 6,0$.

6.4. Piroxicam

El PX es el fármaco más complejo de todos los estudiados en este trabajo debido a que, además de ser muy poco soluble en agua, presenta distintos conformeros en disolución (figura 6.25.). El equilibrio entre ellos depende de la polarizabilidad del disolvente, la concentración y, en el caso de disoluciones acuosas, del pH [104, 194].

Estudios previos de PX en disolución han utilizado espectroscopía UV-Visible [104, 195], fluorescencia [196, 197] y NMR [198]. También está publicado el análisis de PX en estado sólido por espectroscopía Raman [199, 200], lo cual ha sido de gran utilidad para la caracterización de las distintas formas polimórficas que presenta el fármaco en este estado. No tenemos conocimiento de la existencia de espectro Raman de PX en disolución, a parte de una breve mención al espectro Raman de una disolución acuosa de NaOH a pH = 8 que contiene PX [200].

Los sistemas nanotransportadores escogidos para estudiar el PX fueron AgNPs, (coloide AgHX), y AuNPs, (coloide AuCT). A las razones para su elección, las mismas indicadas en los apartados anteriores para KT e IM, se unió esta vez la complejidad del equilibrio conformacional de PX en disolución, lo que supone un reto. Antes de analizar los espectros SERS fue necesaria la caracterización de PX en disolución a distintos pHs y con diferentes disolventes orgánicos, DMSO, EtOH, 1-Propanol y 1,4-Dioxano. Para ello se adquirieron espectros UV-Visible y Raman del fármaco.

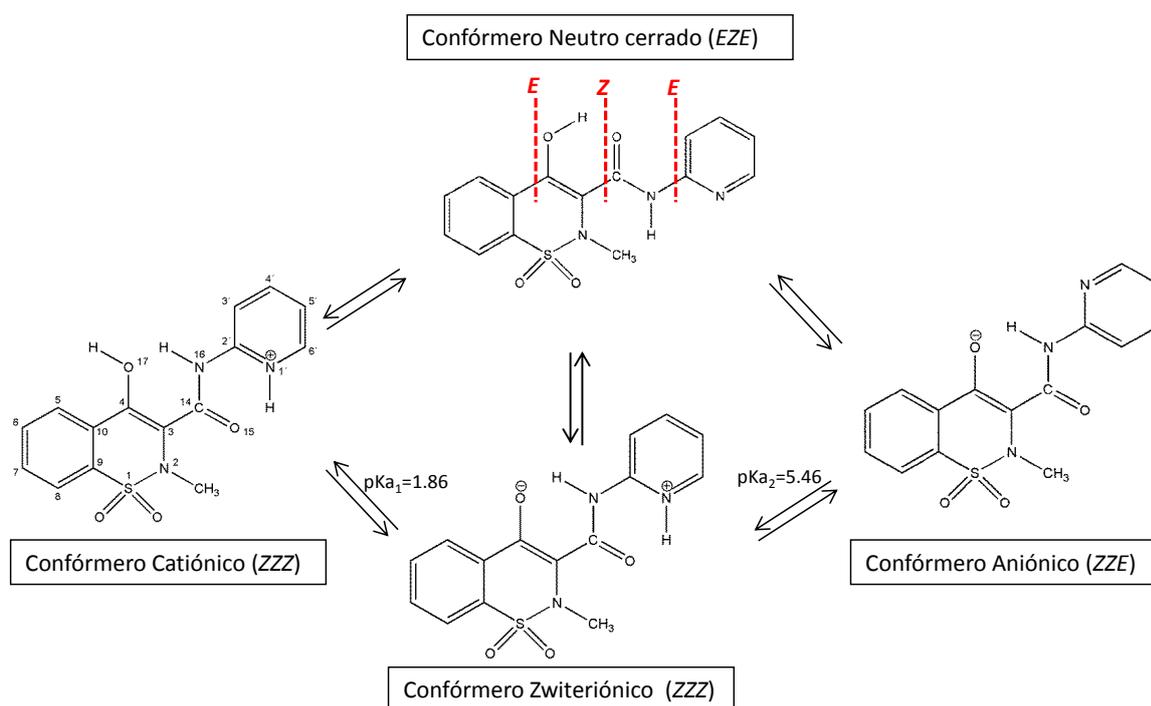


Figura 6.25. Estructura y equilibrio ácido-base de PX en disolución acuosa [103]. La conformación plana EZE [201] se refiere a los enlaces C(3)-C(14), C(14)-N(16) y N(16)-C(2').

El estudio Raman de PX sólido se realizó con diferentes líneas laser de excitación, $\lambda_{\text{exc}} = 325, 442, 532$ y 785 nm. Al excitar con $\lambda_{\text{exc}} = 325$ nm, longitud de onda de máxima absorción de PX correspondiente a la transición electrónica $S_{0 \rightarrow 1}(\pi, \pi^*)$ [196, 202], no se observa ninguna señal Raman. La gran absorción a esta longitud de onda produce emisión de fluorescencia pero no efecto Raman Resonante. Los correspondientes espectros Raman se muestran en la figura 6.26.a.

También se obtuvo el espectro Raman de PX sólido en la región $200\text{-}3500$ cm^{-1} excitando con un láser emitiendo a 1064 nm (figura 6.26.b). La muy baja intensidad que presentan las bandas en la zona de 3000 cm^{-1} en el espectro FT-Raman correspondiente, nos llevó a limitar nuestro estudio de los espectros Raman (y SERS) de PX a la zona $600\text{-}1600$ cm^{-1} de los mismos.

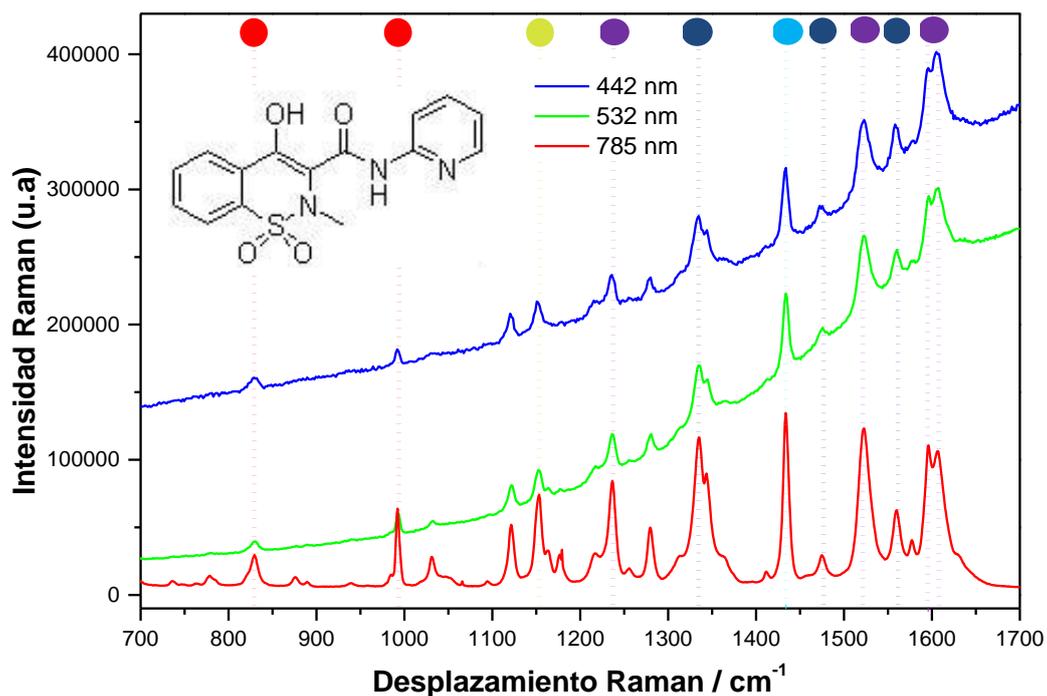


Figura 6.26.a Espectro Raman de PX en estado sólido:
 $\lambda_{\text{exc}} = 442 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$.

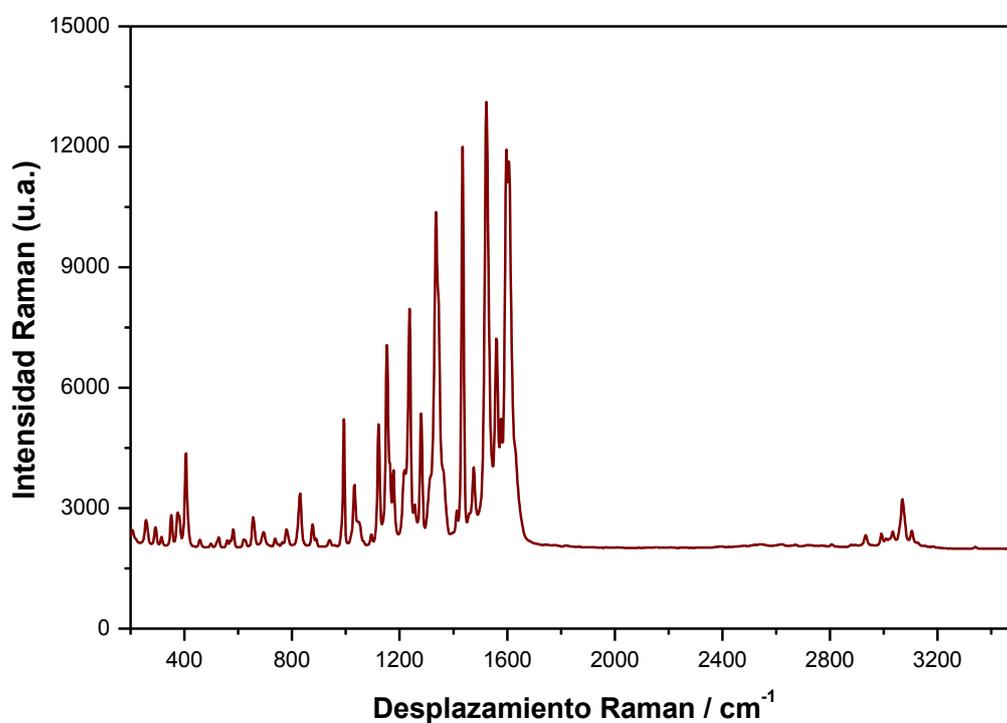


Figura 6.26.b Espectro FT-Raman de PX en estado sólido.
 $\lambda_{\text{exc}} = 1064 \text{ nm}$. Resolución espectral: 4 cm^{-1} .

Las bandas más relevantes de los espectros Raman que aparecen en la figura 6.26. son asignadas a los siguientes grupos moleculares de PX [185]:

- Piridina (●): presenta bandas debidas a la vibración de deformación del enlace C-H en el plano (994 cm^{-1} y 1335 cm^{-1}) y fuera del plano (829 cm^{-1}).
- Tiazínico (●): las bandas a 1477 cm^{-1} y 1561 cm^{-1} se pueden asignar a las vibraciones de tensión, y la que aparece a 1335 cm^{-1} a la vibración de los enlaces en el plano.
- Amida (●): presenta tres bandas; amida I, debida a la vibración de tensión del enlace C=O a 1596 cm^{-1} y 1607 cm^{-1} , amida II a 1523 cm^{-1} , debida a la vibración de deformación del enlace N-H y a la tensión del enlace C-N y, amida III a 1237 cm^{-1} debida a la vibración de tensión del enlace C-N.
- Grupo CH_3 (●): presenta una banda a 1434 cm^{-1} debida a la vibración de deformación simétrica del enlace C-H.
- Grupo SO_2 (●): tiene una banda a 1153 cm^{-1} , debida a la vibración simétrica de tensión.

Las bandas correspondientes al grupo amida permiten diferenciar la forma cristalina del sólido. Las dos formas polimórficas, α y β tienen la misma estructura intramolecular (EZE) (figura 6.25.) pero interacciones intermoleculares distintas. Éstas dan como resultado cadenas infinitas para la forma α , donde están involucrados los grupos OH del enol y el oxígeno del grupo sulfóxido, y dímeros para la forma β debidos a la interacción del oxígeno del sulfóxido con el grupo amida NH (figura 6.27.). En la forma α , la banda amida I aparece a 1615 cm^{-1} y en la forma β a 1606 cm^{-1} . En el caso de la amida II la banda correspondiente aparece a 1543 cm^{-1} en la forma α y a 1523 cm^{-1} en la forma β [199, 200]. Esta información es de gran utilidad para la interpretación de los espectros de PX en disolución. Teniendo en cuenta los espectros obtenidos en la figura 6.26. a podemos decir que el PX sólido analizado presenta la forma β .

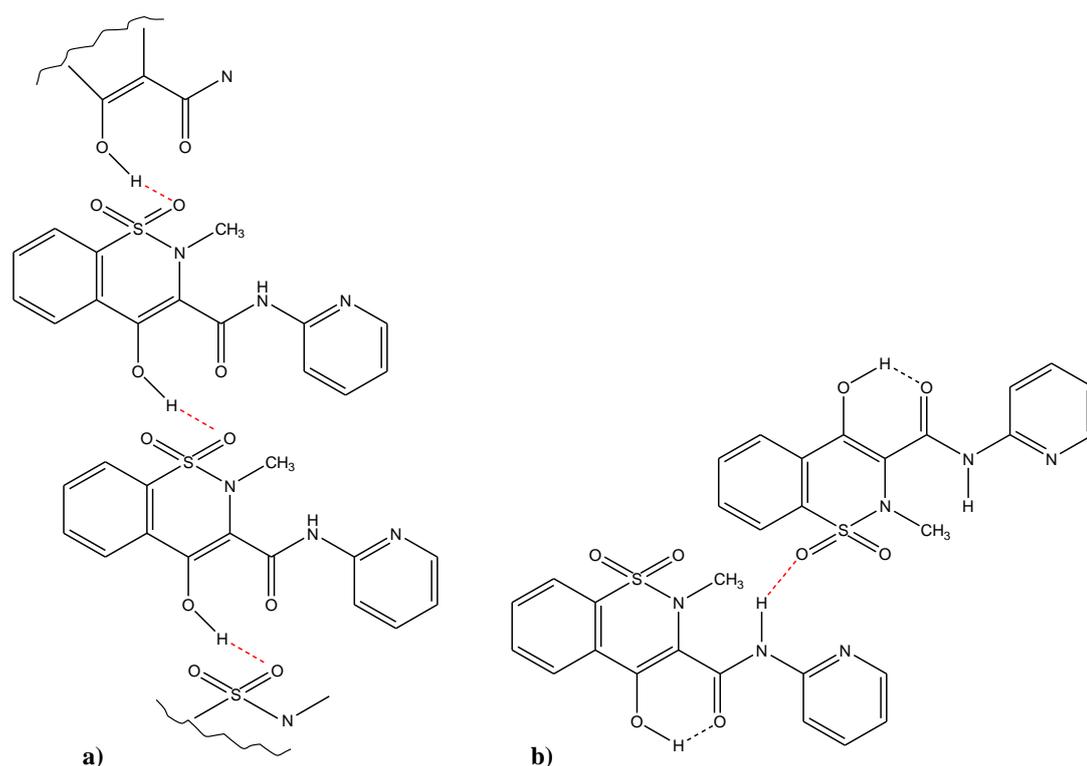


Figura 6.27. Estructuras de las formas polimórficas de PX: a) α (cadena infinita) y b) β (dímero).

Para la obtención del espectro Raman de PX en disolución es necesario tener en cuenta la baja sensibilidad de la técnica, siendo necesaria una concentración mayor que 10^{-2} M. La baja solubilidad de PX en agua imposibilita el uso de ésta como disolvente. Además, la extrema sensibilidad de PX al entorno [104] recomienda utilizar disolventes con diferente polaridad, de manera similar a los estudios realizados de PX en disolución, mediante espectroscopía UV-Visible [195] con el objetivo, también, de comparar los resultados obtenidos por las dos técnicas. Por ello y siendo el DMSO un conocido disolvente polar y aprótico “prácticamente universal” utilizamos éste, además de 1,4-Dioxano (aprótico), EtOH y 1-Propanol (los dos alcoholes débilmente polares).

En la figura 6.28. se muestra el espectro UV-Visible de PX en los distintos disolventes. Cuando el PX se encuentra disuelto en 1,4-Dioxano el espectro de absorción presenta una única banda (a 326 nm), correspondiente a la forma enol cerrada según la bibliografía [195, 203]. En el caso de la disolución de PX en DMSO aparece además un

hombro prominente a ~ 378 nm que, aunque con mucha menor intensidad, está también presente en los espectros de absorción de las disoluciones de PX en los alcoholes, y que concuerda con las predicciones teóricas del espectro de absorción de la forma zwitteriónica de PX [195].

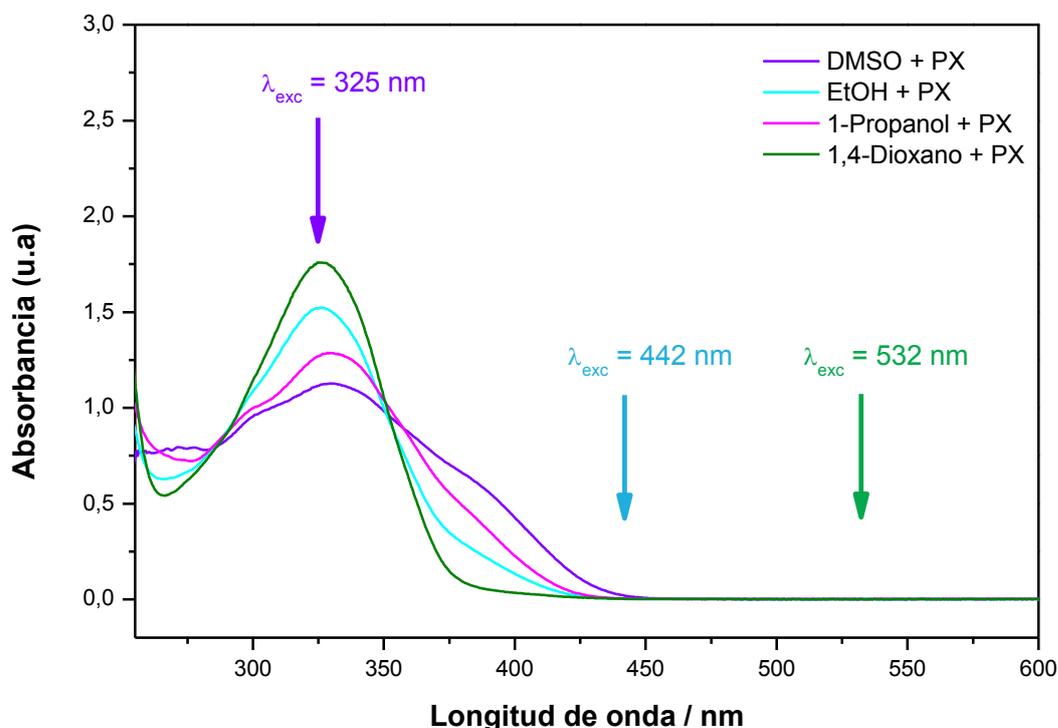


Figura 6.28. Espectros de absorción UV-Visible de PX (1×10^{-4} M) en distintos disolventes: DMSO, EtOH, 1-Propanol, 1,4-Dioxano. Las flechas indican las longitudes de onda de los láseres disponibles para excitación de los espectros Raman.

Los espectros Raman en disolución de PX se hicieron en los disolventes anteriores y a dos longitudes de onda de excitación diferentes, $\lambda_{exc} = 532$ nm y 442 nm. En la figura 6.29. se muestra el espectro diferencia entre el espectro de PX en disolución obtenido y el del correspondiente disolvente, para los distintos disolventes usados.

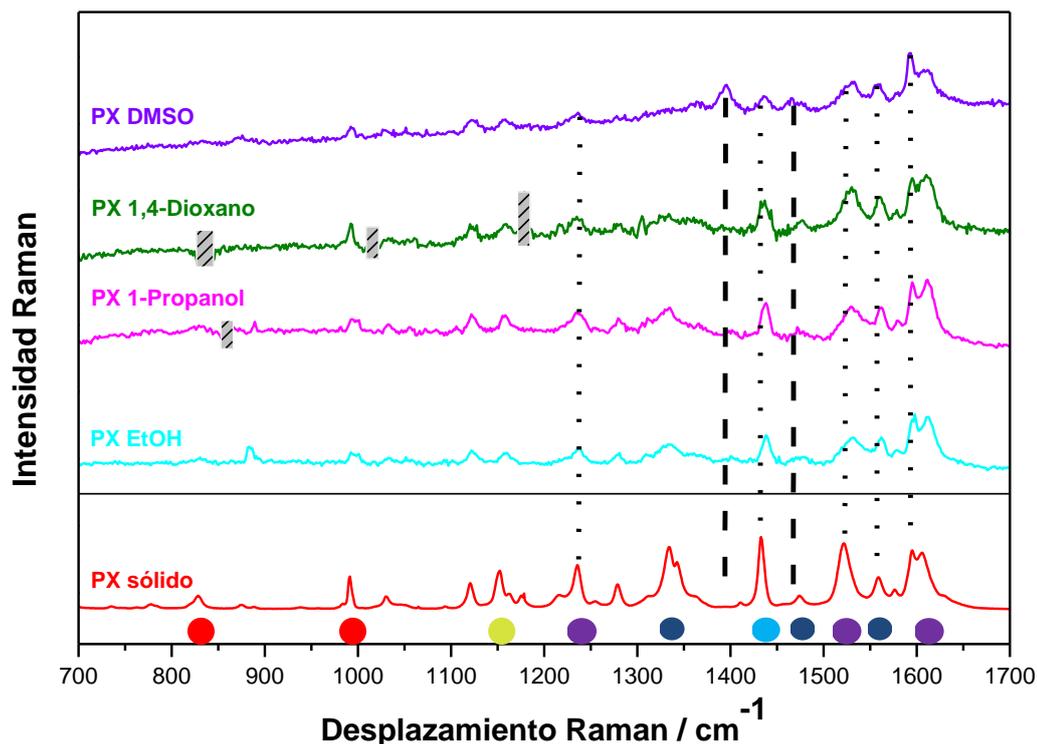


Figura 6.29. Espectros Raman de PX (1×10^{-2} M) en distintos disolventes resultado de restar a cada uno de ellos el espectro del disolvente puro correspondiente: EtOH, 1-Propanol, 1,4-Dioxano y DMSO. $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm. Espectros normalizados a la banda 1592 cm^{-1} . Comparación frente al espectro Raman de PX en estado sólido, $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm. ▨ Artefactos debidos a la resta de los disolventes, - - - bandas de la forma zwitteriónica de PX y bandas características de PX neutro.

La mayoría de las bandas Raman de PX en disolución muestran un desplazamiento mínimo con respecto a su posición en el espectro del sólido. Esto indica una interacción débil de PX con el disolvente.

La caracterización Raman del conformero pudo hacerse de acuerdo a las bandas características de PX en estado sólido que han sido publicadas previamente [199]: 1434 cm^{-1} y 1543 cm^{-1} (forma neutra enol cerrada α), 1434 cm^{-1} y 1523 cm^{-1} (forma neutra enol cerrada β) y 1400 cm^{-1} y 1465 cm^{-1} (forma zwitteriónica abierta en PX monohidrato). Así, las bandas que aparecen a 1396 cm^{-1} y 1466 cm^{-1} cuando el disolvente es el DMSO, indican que en estas condiciones predomina la forma zwitteriónica abierta.

Sin embargo, cuando el PX está disuelto en EtOH, 1-Propanol y 1,4-Dioxano, las bandas que aparecen a 1438 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} indican, principalmente, presencia de la forma neutra cerrada, aunque también se observan señales débiles, asociadas a la forma zwitteriónica ($\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ y 1470 cm^{-1}), en alcoholes.

Estos resultados se asemejan a los reportados en la bibliografía [195] obtenidos mediante espectroscopía UV-Visible donde la forma zwitteriónica de PX es la predominante en formamida (similar al DMSO) mientras que la forma enol cerrada predomina en 1,4-Dioxano y EtOH concentrado.

En la figura 6.29. también se aprecia que las bandas amida I y amida II de PX aparecen a valores intermedios entre los correspondientes a las formas cristalinas α y β . Para DMSO las bandas aparecen a 1533 cm^{-1} y 1608 cm^{-1} , en el caso de 1,4-Dioxano se sitúan a 1530 cm^{-1} y 1610 cm^{-1} , a 1530 cm^{-1} y 1612 cm^{-1} para el 1-Propanol y 1532 cm^{-1} y 1613 cm^{-1} para el EtOH. Estas diferencias provienen de los distintos entornos moleculares de PX en disolución. Mientras que las formas cristalinas α y β , estabilizadas por enlaces de hidrógeno intermoleculares, están presentes en el sólido, en disolución las interacciones entre el disolvente y las moléculas de PX controlan la estabilización del sistema, siendo interacciones por enlaces de hidrógeno en el caso de disolventes próticos e interacciones dipolo-dipolo en el caso de los apróticos.

Debido a la posibilidad de utilizar una $\lambda_{\text{exc}} = 442\text{ nm}$, como se deduce del espectro de adsorción UV-Visible obtenido, se trató de conseguir el espectro Raman pre-resonante de PX. Para ello se adquirieron espectros de PX disuelto en DMSO utilizando $\lambda_{\text{exc}} = 442\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 532\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 785\text{ nm}$, a modo de comparación. Los espectros del fármaco obtenidos como resta del de la correspondiente disolución y el del disolvente puro, DMSO en este caso, aparecen en la figura 6.30. Al excitar con 442 nm las bandas típicas de la forma zwitteriónica de PX (1396 cm^{-1} y 1466 cm^{-1}) aumentan su intensidad así como la vibración del anillo fuera del plano a 870 cm^{-1} . Las bandas atribuidas a la piridina en 992 cm^{-1} y 1355 cm^{-1} , son más débiles que las del anillo tiazínico.

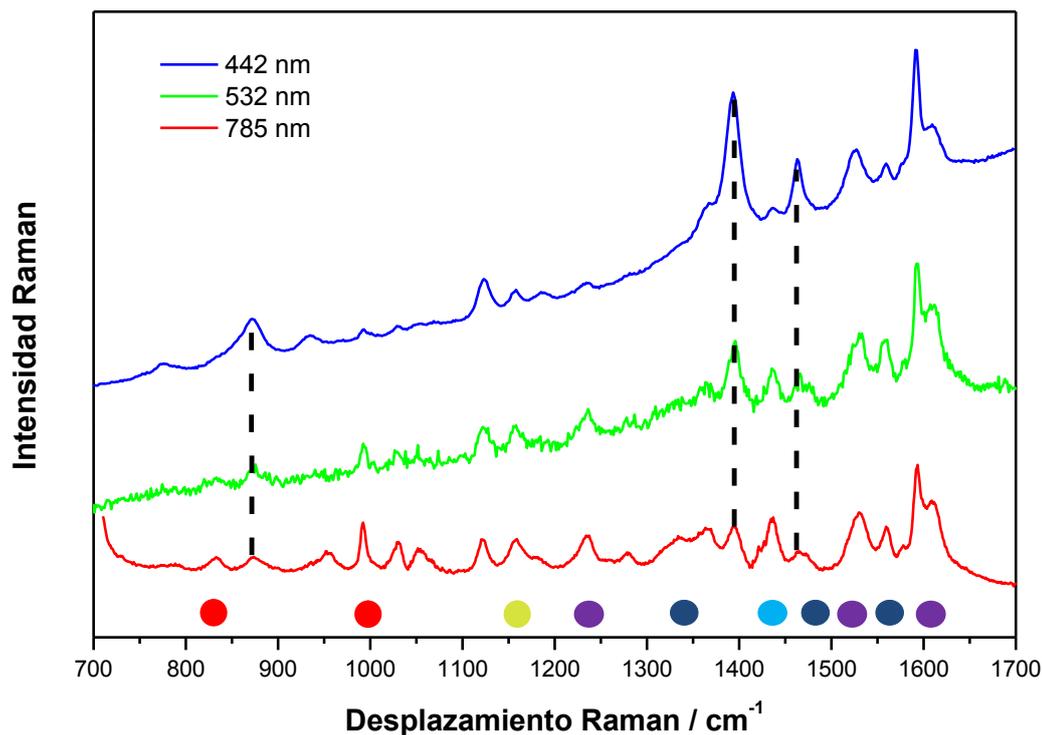


Figura 6.30. Espectro Raman pre-resonante de PX ($1 \times 10^{-1} \text{M}$) en DMSO, resultado de restar el espectro del DMSO puro: $\lambda_{\text{exc}} = 442 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$. Espectros normalizados a la banda de 1530 cm^{-1} . - - - . bandas de la forma zwitteriónica de PX amplificadas.

Para este fármaco se realizaron espectros SERS en coloide de plata, AgHX, a cuatro pHs distintos, 1,0, 2,0, 4,0 y 7,0, teniendo en cuenta los pKa de la molécula [103, 201]. Se utilizó un láser con $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, en resonancia con el LSP. El resultado puede verse en la figura 6.31., en donde todos los espectros se normalizaron a la banda del DMSO que aparece a 678 cm^{-1} .

También se obtuvieron espectros SERS utilizando un láser con $\lambda_{\text{exc}} = 442 \text{ nm}$, pero son de peor calidad que los obtenidos excitando a $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$ al estar fuera de la resonancia del LSP de las AgNPs. Así, se siguió trabajando con ésta última longitud de onda de excitación.

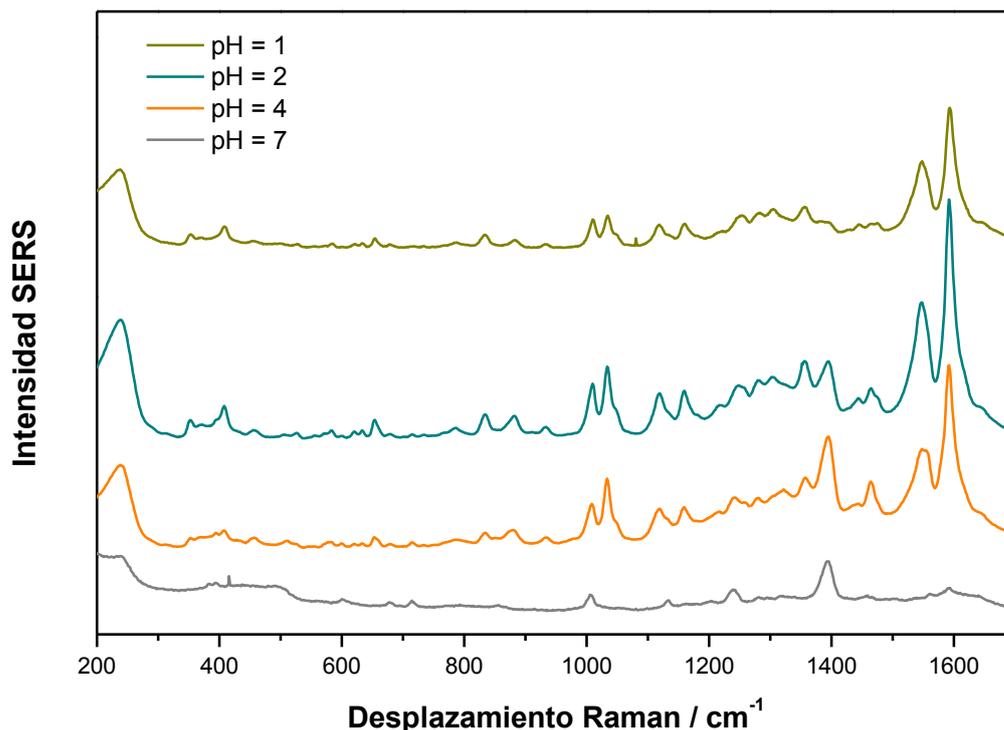


Figura 6.31. Espectros SERS de PX ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) en coloide AgHX: pH = 1,0, pH = 2,0, pH = 4,0 y pH = 7,0. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$. Espectros normalizados a la banda del DMSO a 678 cm^{-1} .

El análisis de los espectros que aparecen en la figura 6.31. muestra la aparición de dos bandas fuertes de igual intensidad $\sim 1010 \text{ cm}^{-1}$ y 1034 cm^{-1} , que se observan a pH = 1,0, 2,0, y 4,0, pero que no se observan ni en los espectros Raman en disolución, ni en el sólido, ni a pH 7,0. Estas bandas verifican la existencia del catión piridinio presente en la forma zwitteriónica y catiónica propias de pH bajos. Por el contrario, el grupo piridil presente en las formas neutra y aniónica de PX da una banda muy intensa en el rango de $990\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ y otra de media intensidad en $1040\text{-}1050 \text{ cm}^{-1}$, que aparecen a pH 7,0 y en los espectros Raman obtenidos anteriormente, ya que, tanto las disoluciones como el sólido, se encuentran a $\text{pH} \geq 6,0$.

En el espectro SERS a pH = 1,0, la intensidad relativa de las bandas en la zona de $1500\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ junto con la baja intensidad de las bandas en $1400\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$, indica, de nuevo, la presencia del conformero catiónico [204].

Los espectros obtenidos a pH = 1,0 y pH = 4,0 presentan las bandas de la forma neutra cerrada de PX (1438 cm^{-1} y 1530 cm^{-1}), cuya intensidad va disminuyendo a medida que la acidez disminuye. Simultáneamente, la intensidad de las bandas de la forma zwitteriónica (1400 cm^{-1} y 1465 cm^{-1}) va aumentando y se vuelven predominantes a pH = 7,0.

Los cambios observados en las bandas de la región $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ con respecto al espectro del sólido indican que la interacción de PX con la superficie metálica parece afectar al grupo amida y al tiazínico. Estos cambios sugieren una conjugación π diferente en los dos grupos que puede ser debida a la proximidad del grupo C=O a la superficie metálica. Simultáneamente, algunas bandas asignadas al anillo pirimidínico ($\sim 405\text{ cm}^{-1}$, 650 cm^{-1} y 1217 cm^{-1}) no muestran desplazamientos ni ninguna modificación en presencia del metal, por lo que se puede interpretar que esta parte de la molécula de PX no interacciona con las NPs metálicas.

El espectro SERS de las formas neutras de PX presenta una disminución considerable de la intensidad de la banda del grupo δCH_3 a 1430 cm^{-1} , respecto de la que se observa en el espectro Raman del sólido y de la disolución. Esto indica una orientación de la molécula del fármaco paralela a la superficie metálica que se confirma con el ligero aumento de las bandas fuera del plano de PX ($\sim 770\text{ cm}^{-1}$, 830 cm^{-1} y 940 cm^{-1}) en el espectro SERS.

A pH = 7,0, donde el PX se encuentra en la forma aniónica abierta, aparece una banda intensa a $990\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ debida al grupo piridilo, en lugar del catión piridinio. Esto se corrobora, además, porque el espectro en la zona de $1200\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ es similar al espectro Raman de la sal de sodio de PX [200]. Por otro lado, el espectro es mucho más débil y simple que los obtenidos a pHs inferiores, debido, probablemente, a su orientación respecto de la superficie del metal, distinta a la de condiciones ácidas. Las bandas principales del grupo de la piridina a 1000 cm^{-1} aumentan de intensidad, indicando que este grupo está cerca de la superficie del metal y perpendicular a la misma.

Otro factor a tener en cuenta, considerando la alta sensibilidad de la estructura de PX al entorno, es el recubrimiento parcial de la superficie del metal con iones Cl^- procedentes principalmente de las sales empleadas en la preparación de los coloides. El

recubrimiento de las NPs disminuye al aumentar el pH y esto afecta probablemente a la orientación de las moléculas del fármaco respecto de la superficie del metal.

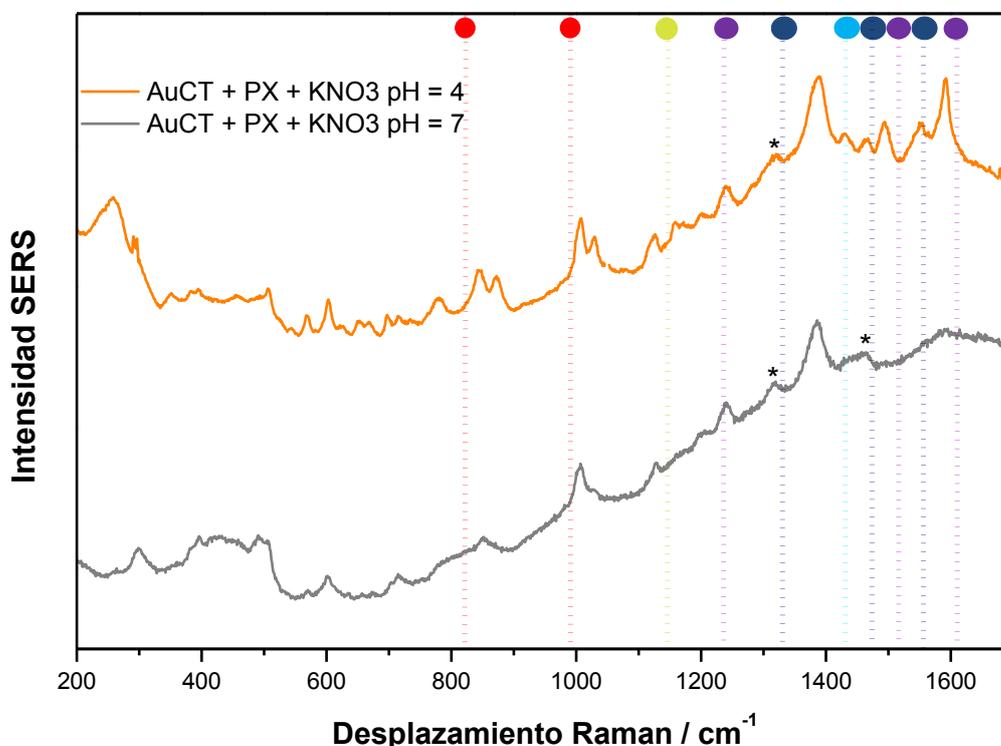
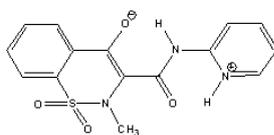


Figura 6.32. Espectros SERS de PX ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) en coloide AuCT con KNO_3 como agregante: pH = 4,0 y pH = 7,0. $\lambda_{\text{exc}} = 785 \text{ nm}$. Espectros normalizados a la banda del DMSO, 678 cm^{-1} . Contaminación marcada con *.

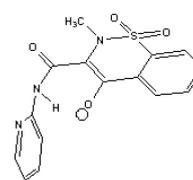
Se obtuvieron espectros SERS de PX en coloide de oro, AuCT, que aparecen en la figura 6.32. Los espectros obtenidos en este caso son similares a los obtenidos con AgHX, por lo que se deduce que la geometría de la adsorción molecular de PX sobre la superficie metálica es igual en ambos casos, así como las interacciones entre el fármaco y el metal. Sin embargo, los espectros con coloide de oro tienen menor intensidad y presentan mayor contaminación debida al reductor y a los agentes agregantes utilizados.

A partir del análisis de los espectros anterior, y teniendo en cuenta que en la forma aniónica de PX los dos grupos aromáticos no se encuentran en el mismo plano, proponemos una estructura para la adsorción de PX en la superficie del metal que puede verse esquemáticamente en la figura 6.33.

Forma zwitterionica
pH 2-4



Forma aniónica
pH 7



NPs metálicas

Figura 6.33. Representación de la forma de aproximación de las moléculas de PX a la superficie de las AgNPs y AuNPs propuesta en este trabajo, a pH =2,0 (forma zwitteriónica) y pH = 7,0 (forma aniónica).

7. Conclusiones

Las conclusiones que se obtienen de este trabajo son las siguientes:

1. Los sistemas nanotransportadores utilizados en este trabajo (NPs, PSi y sistemas “*core-shell*”) son capaces de adsorber los fármacos, EM, KT, IM y PX, en su superficie, sin necesidad de funcionalización.
2. La caracterización espectroscópica de los fármacos en el sistema transportador ha sido posible con técnicas de espectroscopías intensificadas por superficie metálica, SERS en el caso de KT, IM y PX, adsorbidos en AgNPs y AuNPs, y MEF en el caso de EM adsorbida en AgNPs y cargada en PSi, o en “*core-shell*” con núcleo de plata y recubrimiento de SiO₂.
3. En medio acuoso y a los pHs estudiados, los fármacos son estables y no hay degradación de los mismos al adsorberse en la superficie metálica. Este resultado es de gran interés y tiene mucha importancia a la hora de diseñar futuras aplicaciones.
4. Para los sistemas EM-AgNPs en PSi se ha podido discernir la señal de fluorescencia del fármaco de la del material poroso, a pesar de que las longitudes de onda de emisión son muy cercanas y las bandas correspondientes solapan. El PSi actúa de forma selectiva permitiendo la entrada del monómero de EM pero no sus agregados, para los tamaños de poro utilizados.
5. Se obtiene un mayor factor de amplificación de la fluorescencia, EF, cuando las láminas de PSi se han cargado a presión atmosférica y cuando el fármaco va unido a la proteína BSA. Pasados los primeros 30 días desde la preparación de las muestras se observa una disminución considerable de dicho factor.
6. El sistema EM-AgNPs penetra en los poros de la lámina de PSi de forma uniforme cuando el disolvente es MeOH, mientras que presenta una zona de máxima acumulación, situada a 2-3 μm de la interfase Si-PSi, cuando el disolvente es H₂O.
7. Se han sintetizado sistemas “*core-shell*” con un núcleo de AgNPs y un recubrimiento de dióxido de silicio con espesores de 3 nm, 28 nm, 36 nm y 40 nm. La EM adsorbida en su superficie presenta efecto MEF, siendo éste máximo para un espesor de capa de 36 nm. En sistemas con grosor de capa de

- 3 nm el comportamiento espectroscópico del sistema es similar al obtenido utilizando AgNPs sin recubrir.
8. Se ha llevado a cabo la caracterización espectroscópica (infrarrojo y Raman) de KT en varios disolventes con distinta polaridad, y adsorbido en AgNPs, a $\text{pH} = 2,0$ y $\text{pH} = 8,0$. No se han observado diferencias remarcables en los espectros Raman de KT en los diferentes disolventes ni a diferentes pH s, pero sí en los espectros SERS. De su análisis se puede deducir que a $\text{pH} < \text{pK}_a$, el KT en forma enólica se aproxima a la superficie de las AgNPs por el anillo aromático, mientras que a $\text{pH} > \text{pK}_a$ el grupo pirrolizínico de la forma cetónica es el más próximo a la superficie.
 9. Se ha llevado a cabo la caracterización de IM en diversos disolventes con distinta polaridad y adsorbido en AgNPs, a $\text{pH} = 3,0$ y $\text{pH} = 6,0$. Los espectros IR y Raman en disolución son similares a los de la forma cristalina γ . El análisis de los espectros SERS permite deducir que a $\text{pH} < \text{pK}_a$ hay dímeros de IM, colocados perpendicularmente a la superficie, con el grupo benzoilo cerca de la misma. En cambio, a $\text{pH} > \text{pK}_a$ la IM está como monómero y se coloca de forma plana a la superficie del metal.
 10. Se ha llevado a cabo la caracterización de PX, en diversos disolventes con distinta polaridad y adsorbido en AgNPs, a $\text{pH} = 1,0$, $\text{pH} = 2,0$, $\text{pH} = 4,0$ y $\text{pH} = 7,0$. En DMSO aparecen bandas correspondientes al confórmero zwitteriónico, mientras que en 1,4-dioxano, 1-propanol y EtOH hay presencia de la forma neutra cerrada.
 11. Los espectros SERS de PX en AuCT y AgHX son similares indicando, en ambos casos, la presencia del mismo confórmero y la misma orientación. A $\text{pH} = 1,0$ están presentes las bandas de la forma catiónica abierta y zwitteriónica, a $\text{pH} = 2,0$ y $\text{pH} = 4,0$ las bandas dominantes corresponden a la forma zwitteriónica con una orientación paralela a la superficie del metal y a $\text{pH} = 7,0$ el análisis de las bandas predominantes, aunque débiles, indica la presencia de la forma aniónica, con el anillo piridil próximo y perpendicular a la superficie metálica.

8. Bibliografia

1. Drexler, K.E., *Nanotechnology: From Feynman to funding*. Nanotechnology: Risk, Ethics and Law, ed. G. Hunt and M.D. Mehta. 2006. 25-34.
2. Drexler, K.E., *A Radical Future for Nanotechnology*. Futurist, 2013. **47**(5): p. 14-20.
3. McIntyre, R.A., *Common nano-materials and their use in real world applications*. Science Progress, 2012. **95**(1): p. 1-22.
4. Guo, K.W., *Green nanotechnology of trends in future energy: a review*. International Journal of Energy Research, 2012. **36**(1): p. 1-17.
5. Ma, L., et al., *Nanomaterials: Science and applications in the lithium-sulfur battery*. Nano Today, 2015. **10**(3): p. 315-338.
6. Iavicoli, I., et al., *Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy*. Environmental Health, 2014. **13**.
7. Moliner, M., et al., *Synthesis Design and Structure of a Multipore Zeolite with Interconnected 12-and 10-MR Channels*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(14): p. 6473-6478.
8. Silvestre, J., N. Silvestre, and J. de Brito, *Review on concrete nanotechnology*. European Journal of Environmental and Civil Engineering, 2016. **20**(4): p. 455-485.
9. Patel, S.K. and C. Argyropoulos, *Plasmonic nanoantennas: enhancing light-matter interactions at the nanoscale*. Epj Applied Metamaterials, 2015. **2**.
10. Persano, L., A. Camposeo, and D. Pisignano, *Active polymer nanofibers for photonics, electronics, energy generation and micromechanics*. Progress in Polymer Science, 2015. **43**: p. 48-95.
11. Lagzi, I., *Chemical robotics - chemotactic drug carriers*. Central European Journal of Medicine, 2013. **8**(4): p. 377-382.
12. Stojanovic, M.N., *Some Experiments and Directions in Molecular Computing and Robotics*. Israel Journal of Chemistry, 2011. **51**(1): p. 99-105.
13. Heeren, J. and O. Bruns, *Nanocrystals, a New Tool to Study Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012. **13**(2): p. 365-372.
14. Zhang, F., et al., *Structural DNA Nanotechnology: State of the Art and Future Perspective*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(32): p. 11198-11211.
15. Emerich, D.F. and C.G. Thanos, *Targeted nanoparticle-based drug delivery and diagnosis*. Journal of Drug Targeting, 2007. **15**(3): p. 163-183.
16. Ghalandaraki, N., A.M. Alizadeh, and S. Ashkani-Esfahani, *Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy*. Biomed Research International, 2014.
17. Ngwa, W., et al., *Targeted radiotherapy with gold nanoparticles: current status and future perspectives*. Nanomedicine, 2014. **9**(7): p. 1063-1082.
18. Hu, Q., et al., *Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **98**: p. 19-34.
19. Sharma, J.R., et al., *Targeted destruction of HIV-positive cells*. Journal of the International AIDS Society, 2014. **17**(4 Suppl 3): p. 19707-19707.
20. Antimisariis, S.G. and S. Mourtas, *Recent advances on anti-HIV vaginal delivery systems development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. **92**: p. 123-145.
21. *Nanotechnology in Alzheimer's disease*. Medicina-Buenos Aires, 2015. **75**(4): p. 269-269.
22. Aroca, R., *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*. 2006: John Wiley & Sons.
23. Le Ru, E.C. and P.G. Etchegoin, *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects*. 2009: Elsevier, Amsterdam.
24. Geddes, C.D. and J.R. Lakowicz, *Metal-enhanced fluorescence*. Journal of Fluorescence, 2002. **12**(2): p. 121-129.
25. Noguez, C., *Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(10): p. 3806-3819.
26. Thull, R., *Surface functionalization of materials to initiate auto-biocompatibilization in vivo*. Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik, 2001. **32**(12): p. 949-952.

27. Gonzalez, A.L., J.A. Reyes-Esqueda, and C. Noguez, *Optical properties of elongated noble metal nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(19): p. 7356-7362.
28. Salehi, M., et al., *Two-color SERS microscopy for protein co-localization in prostate tissue with primary antibody-protein A/G-gold nanocluster conjugates*. Nanoscale, 2014. **6**(4): p. 2361-2367.
29. Oldenburg, S.J., et al., *Nanoengineering of optical resonances*. Chemical Physics Letters, 1998. **288**(2-4): p. 243-247.
30. Prestidge, C.A., et al., *Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2007. **4**(2): p. 101-110.
31. Salonen, J., et al., *Mesoporous silicon in drug delivery applications*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(2): p. 632-653.
32. du Plessis, M., *A Decade of Porous Silicon as Nano-Explosive Material*. Propellants Explosives Pyrotechnics, 2014. **39**(3): p. 348-364.
33. Elnathan, R., et al., *Engineering vertically aligned semiconductor nanowire arrays for applications in the life sciences*. Nano Today, 2014. **9**(2): p. 172-196.
34. Peng, F., et al., *Silicon nanostructures for cancer diagnosis and therapy*. Nanomedicine, 2015. **10**(13): p. 2109-2123.
35. Rosenholm, J.M., C. Sahlgren, and M. Linden, *Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles - opportunities & challenges*. Nanoscale, 2010. **2**(10): p. 1870-1883.
36. Wang, S.B., *Ordered mesoporous materials for drug delivery*. Microporous and Mesoporous Materials, 2009. **117**(1-2): p. 1-9.
37. Lin, V.S.Y., *Veni, vidi, vici and then ... vanished*. Nature Materials, 2009. **8**(4): p. 252-253.
38. Park, J.-H., et al., *Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications*. Nature Materials, 2009. **8**(4): p. 331-336.
39. Canham, L.T., *Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers*. Applied Physics Letters, 1990. **57**(10): p. 1046-1048.
40. Recio-Sanchez, G., et al., *Surface Functionalization of Nanostructured Porous Silicon by APTS: Toward the Fabrication of Electrical Biosensors of Bacterium Escherichia coli*. Current Nanoscience, 2011. **7**(2): p. 178-182.
41. *International drug monitoring: the role of national centres. Report of a WHO meeting*. World Health Organization technical report series No. 498, Ginebra 1972.
42. Saedder, E.A., et al., *Number of drugs most frequently found to be independent risk factors for serious adverse reactions: a systematic literature review*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2015. **80**(4): p. 808-817.
43. Einarson, T.R., *Drug-related hospital admissions*. Annals of Pharmacotherapy, 1993. **27**(7-8): p. 832-840.
44. Lazarou, J., B.H. Pomeranz, and P.N. Corey, *Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients - A meta-analysis of prospective studies*. Jama-Journal of the American Medical Association, 1998. **279**(15): p. 1200-1205.
45. Beijer, H.J.M. and C.J. de Blaey, *Hospitalisations caused by adverse drug reactions (ADR): a meta-analysis of observational studies*. Pharmacy World & Science, 2002. **24**(2): p. 46-54.
46. Pirmohamed, M., et al., *Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18,820 patients*. British Medical Journal, 2004. **329**(7456): p. 15-19.
47. Wiffen, P., et al., *Adverse drug reactions in hospital patients: A systematic review of the prospective and retrospective studies*. Bandolier extra, 2002. **101**(4): p. 1-15.
48. Maine, E., V.J. Thomas, and J. Utterback, *Radical innovation, from the confluence of technologies: Innovation management strategies for the emerging nanobiotechnology industry*. Journal of Engineering and Technology Management, 2014. **32**: p. 1-25.

49. Modh, N., et al., *An overview of recent patents on nanosuspension*. Recent patents on drug delivery & formulation, 2014. **8**(2): p. 144-54.
50. Sudhakar, B., K. NagaJyothi, and K.V.R. Murthy, *Nanosuspensions as a Versatile Carrier based Drug Delivery System - An Overview*. Current Drug Delivery, 2014. **11**(3): p. 299-305.
51. Weissig, V., T.K. Pettinger, and N. Murdock, *Nanopharmaceuticals (part I): products on the market*. International Journal of Nanomedicine, 2014. **9**: p. 4357-4373.
52. Weissig, V. and D. Guzman-Villanueva, *Nanopharmaceuticals (part 2): products in the pipeline*. International Journal of Nanomedicine, 2015. **10**.
53. Amidon, G.L., et al., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability*. Pharmaceutical Research, 1995. **12**(3): p. 413-420.
54. Yu, L.X., et al., *Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions*. Pharmaceutical Research, 2002. **19**(7): p. 921-925.
55. Hudson, D. and A. Margaritis, *Biopolymer nanoparticle production for controlled release of biopharmaceuticals*. Critical Reviews in Biotechnology, 2014. **34**(2): p. 161-179.
56. Wang, Y.L., B.B. Newell, and J. Irudayaraj, *Folic Acid Protected Silver Nanocarriers for Targeted Drug Delivery*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2012. **8**(5): p. 751-759.
57. Sercombe, L., et al., *Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery*. Frontiers in Pharmacology, 2015. **6**.
58. Singh, S., *Nanomedicine-Nanoscale Drugs and Delivery Systems*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010. **10**(12): p. 7906-7918.
59. Baeza, A., M. Colilla, and M. Vallet-Regi, *Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2015. **12**(2): p. 319-337.
60. McCarthy, C.A., et al., *Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: a review*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2016. **13**(1): p. 93-108.
61. Sevilla, P., et al., *Identification of the antitumoral drug emodin binding sites in bovine serum albumin by spectroscopic methods*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2007. **1774**(11): p. 1359-1369.
62. Sevilla, P., et al., *Aggregation of antitumoral drug emodin on Ag nanoparticles: SEF, SERS and fluorescence lifetime experiments*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(37): p. 8342-8348.
63. Sevilla, P., et al., *SERS plus MEF of the anti tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles*, in *Plasmonics in Biology and Medicine VII*, T. VoDinh and J.R. Lakowicz, Editors. 2010.
64. De-Llanos, R., et al., *Surface Plasmon Effects on the Binding of Antitumoral Drug Emodin to Bovine Serum Albumin*. Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(25): p. 12419-12429.
65. Hernandez, M., et al., *Development of drug delivery systems based on nanostructured porous silicon loaded with the anti-tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles*, in *Nanostructured Thin Films V*, T.G. Mackay, Y.J. Jen, and R.J. MartinPalma, Editors. 2012.
66. Hernandez, M., et al., *Surface enhanced fluorescence of anti-tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles and loaded on porous silicon*. Nanoscale Research Letters, 2012. **7**.
67. Agency, E.M., *Doc. Ref. EMEA/264578/2007*.
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Piroxicam/human_referral_000109.jsp&mid=WC0b01ac05805c516f, 2007.

68. Demirezer, L.O., et al., *The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of Rumex patientia*. *Phytochemistry*, 2001. **58**(8): p. 1213-1217.
69. O'Neil, M.J.e., *The Merck Index-An Enciclopedia of Chemcials, Drugs and Biologicals, 13th edition*. Whitehouse station, N.J.: Merck and Co., Inc., 2001, p.629.
70. Zhou, X.M. and Q.H. Chen, *Biochemical study of Chinese rhubarb. XXII. Inhibitory effect of anthraquinone derivatives on Na⁺-K⁺-ATPase of the rabbit renal medulla and their diuretic action*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 1988. **23**(1): p. 17-20.
71. Huang, H.C., S.H. Chu, and P.D.L. Chao, *Vasorelaxants from chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties*. *European Journal of Pharmacology*, 1991. **198**(2-3): p. 211-213.
72. Cui, Y.T., et al., *The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (Ctenopharyngodon idellus)*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014. **38**(1): p. 74-79.
73. Huang, Q., et al., *Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb*. *Medicinal Research Reviews*, 2007. **27**(5): p. 609-630.
74. Srinivas, G., et al., *Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent*. *Medicinal Research Reviews*, 2007. **27**(5): p. 591-608.
75. Zhu, F., X.-G. Liu, and N.-C. Liang, *Effect of emodin and apigenin on invasion of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro*. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*, 2003. **22**(4): p. 358-62.
76. Zhang, L.S., et al., *Suppressed transformation and induced-differentiation of HER-2 NEU-overexpressing breast-cancer cells by emodin*. *Cancer Research*, 1995. **55**(17): p. 3890-3896.
77. Zhang, L.S., et al., *Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel*. *Clinical Cancer Research*, 1999. **5**(2): p. 343-353.
78. Jing, X.B., et al., *Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin*. *Japanese Journal of Cancer Research*, 2002. **93**(8): p. 874-882.
79. Shieh, D.E., et al., *Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells*. *Life Sciences*, 2004. **74**(18): p. 2279-2290.
80. Lee, H.Z., *Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma*. *British Journal of Pharmacology*, 2001. **134**(1): p. 11-20.
81. Su, Y.T., et al., *Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway*. *Biochemical Pharmacology*, 2005. **70**(2): p. 229-241.
82. Ko, J.C., et al., *Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells*. *Biochemical Pharmacology*, 2010. **79**(4): p. 655-664.
83. Liu, A., et al., *Antiproliferative and antimetastatic effects of emodin on human pancreatic cancer*. *Oncology Reports*, 2011. **26**(1): p. 81-89.
84. Chen, Y.C., et al., *Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production*. *Biochemical Pharmacology*, 2002. **64**(12): p. 1713-1724.
85. Chun-Guang, W., et al., *Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo*. *European Journal of Pharmacology*, 2010. **627**(1-3): p. 33-41.
86. Chang, Y.C., et al., *Emodin Induces Apoptotic Death in Murine Myelomonocytic Leukemia WEHI-3 Cells In Vitro and Enhances Phagocytosis in Leukemia Mice In Vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: p. 1-13.

87. Koyama, J., et al., *Chemopreventive effects of emodin and cassiamin B in mouse skin carcinogenesis*. *Cancer Letters*, 2002. **182**(2): p. 135-139.
88. Guzman, A., et al., *Absolute-configuration of (-)-5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo 1,2-a pyrrole-1-carboxylic acid, the active enantiomer of ketorolac*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1986. **29**(4): p. 589-591.
89. Jr., W.E.A., *IUPAC-NIST Solubility Data Series. 102. Solubility of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in Neat Organic Solvents and Organic Solvent Mixtures*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2014. **43**(2): p. 213.
90. Muchowski, J.M., et al., *Synthesis and anti-inflammatory and analgesic activity of 5-aroyl-1,2-dihydro-[3H]-pyrrolo[1,2-a]pyrrole-1-carboxylic acids and related compounds*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1985. **28**: p. 1037-1049.
91. Malode, S.J., N.P. Shetti, and S.T. Nandibewoor, *Thermodynamic Quantities for the Different Steps Involved in the Oxidation of the Drug Ketorolac by Copper(III) Periodate Complex in Aqueous Alkaline Medium: A Mechanistic Approach*. *Journal of Solution Chemistry*, 2010. **39**(3): p. 417-430.
92. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs* *Nature-New Biology*, 1971. **231**(25): p. 232-&.
93. *Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios. Medicamentos de Uso Humano. Centro de Información On Line de Medicamentos de la AEMPS-CIMA*.
94. *Department of economics and social affairs. Consolidated list of products whose consumption and/or sale have been banned, withdrawn, severely restricted or not approved by governments*. Eighth issue pharmaceuticals, United Nations, New York, 2003.
95. *Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Ref.: 2007/02, 7 de febrero de 2007. Nota informativa, Ketorolaco: cambio a medicamento de uso hospitalario*. Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Subdirección general de medicamentos de uso humano.
96. Dannenfelser, R. and S.H. Yalkowsky, *Database for aqueous solubility of nonelectrolytes*. *Computer Applications in the Biosciences*, 1989. **5**(3): p. 235-236.
97. Dannenfelser, R.M. and S.H. Yalkowsky, *Data-base of aqueous solubility for organic nonelectrolytes*. *Science of the Total Environment*, 1991. **109**: p. 625-628.
98. Jr., W.E.A., *IUPAC-NIST Solubility Data Series. 102. Solubility of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) in Neat Organic Solvents and Organic Solvent Mixtures*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2014. **43**(2): p. 104.
99. Ghatak, A., P.C. Mandal, and M. Sarkar, *Indomethacin: A NSAID sensitive to micro heterogeneity in alcohol-water mixtures*. *Chemical Physics Letters*, 2008. **460**(4-6): p. 521-524.
100. Budavari, S., *The Merck Index - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Whitehouse station, N.J.: Merck and Co., Inc., 1996: p. 852.
101. Gil, M. and A. Douhal, *Femtosecond dynamics of a non-steroidal anti-inflammatory drug (piroxicam) in solution: The involvement of twisting motion*. *Chemical Physics*, 2008. **350**(1-3): p. 179-185.
102. Paaver, U., et al., *Insight into the solubility and dissolution behavior of piroxicam anhydrate and monohydrate forms*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **431**(1-2): p. 111-119.
103. Tsai, R.S., et al., *Physicochemical and structural-properties of nonsteroidal antiinflammatory oxicams*. *Helvetica Chimica Acta*, 1993. **76**(2): p. 842-854.
104. Banerjee, R. and M. Sarkar, *Spectroscopic studies of micro environment dictated structural forms of piroxicam and meloxicam*. *Journal of Luminescence*, 2002. **99**(3): p. 255-263.

105. *Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Ref.: 2007/12, 20 de julio de 2007. Nota informativa, Piroxicam: información actualizada sobre las indicaciones de uso como medicamento de diagnóstico hospitalario.* Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española del Medicamentos y productos sanitarios. Subdirección general de medicamentos de uso humano.
106. Raman, C.V. and K.S. Krishnan, *A new type of secondary radiation.* Nature, 1928. **121**: p. 501-502.
107. Fleischmann, M., P.J. Hendra, and McQuilla, A.J., *Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode.* Chemical Physics Letters, 1974. **26**(2): p. 163-166.
108. Jeanmaire, D.L. and R.P. Vanduyne, *Surface Raman spectroelectrochemistry .1. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode.* Journal of Electroanalytical Chemistry, 1977. **84**(1): p. 1-20.
109. Albrecht, M.G. and J.A. Creighton, *Anomalous intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode.* Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(15): p. 5215-5217.
110. Moskovits, M., *Surface-enhanced spectroscopy.* Reviews of Modern Physics, 1985. **57**(3): p. 783-826.
111. Otto, A., et al., *Surface-enhanced Raman-scattering.* Journal of Physics-Condensed Matter, 1992. **4**(5): p. 1143-1212.
112. Moskovits, M., *Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective.* Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 485-496.
113. Creighton, J.A., *The effective Raman tensor for SERS scattering by molecules adsorbed at the surface of a spherical-particle.* Surface Science, 1985. **158**(1-3): p. 211-221.
114. Creighton, J.A., *The selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy.* Advances in spectroscopy, 1988. **16**: p. 37-89.
115. Sanchez-Gil, J.A., J.V. Garcia-Ramos, and E.R. Mendez, *Near-field electromagnetic wave scattering from random self-affine fractal metal surfaces: Spectral dependence of local field enhancements and their statistics in connection with surface-enhanced Raman scattering.* Physical Review B, 2000. **62**(15): p. 10515-10525.
116. Sanchez-Gil, J.A. and J.V. Garcia-Ramos, *Local and average electromagnetic enhancement in surface-enhanced Raman scattering from self-affine fractal metal substrates with nanoscale irregularities.* Chemical Physics Letters, 2003. **367**(3-4): p. 361-366.
117. Xu, H.X., et al., *Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering.* Physical Review E, 2000. **62**(3): p. 4318-4324.
118. Kall, M., H.X. Xu, and P. Johansson, *Field enhancement and molecular response in surface-enhanced Raman scattering and fluorescence spectroscopy.* Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(6-7): p. 510-514.
119. Kovacs, G.J., et al., *Distance dependence of SERS enhancement factor from Langmuir-blodgett monolayers on metal island films - evidence for the electromagnetic mechanism.* Langmuir, 1986. **2**(6): p. 689-694.
120. Murray, C.A. and D.L. Allara, *Measurement of the molecule silver separation dependence of surface enhanced Raman-scattering in multilayered structures.* Journal of Chemical Physics, 1982. **76**(3): p. 1290-1303.
121. Koglin, E., H.H. Lewinsky, and J.M. Sequaris, *The short-range sensitivity of SERS - Results for biomolecules* Surface Science, 1985. **158**(1-3): p. 370-380.
122. Moskovits, M. and J.S. Suh, *Surface geometry change in 2-naphthoic acid adsorbed on silver.* Journal of Physical Chemistry, 1988. **92**(22): p. 6327-6329.
123. Lombardi, J.R., et al., *Charge-transfer theory of surface enhanced Raman-spectroscopy - Herzberg-Teller contributions* Journal of Chemical Physics, 1986. **84**(8): p. 4174-4180.
124. Otto, A., et al., *The adatom model of SERS (Surface Enhanced Raman-Scattering) - the present status.* Surface Science, 1984. **138**(2-3): p. 319-338.

125. Le Ru, E. and P. Etchegoin, *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy and related plasmonic effects*. Elsevier, 2008.
126. Sanchez-Cortes, S. and J.V. Garcia-Ramos, *Anomalous Raman bands appearing in surface-enhanced Raman spectra*. Journal of Raman Spectroscopy, 1998. **29**(5): p. 365-371.
127. Sanchez-Cortes, S. and J.V. Garcia-Ramos, *Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: chloride and pH effects*. Surface Science, 2001. **473**(1-2): p. 133-142.
128. Creighton, J.A., C.G. Blatchford, and M.G. Albrecht, *Plasma resonance enhancement of Raman-scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II, 1979. **75**: p. 790-798.
129. Hendra, P.J., *Applications of fourier-transform Raman-spectroscopy. 2. editorial*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1991. **47**(9-10): p. 1133-1134.
130. Lee, P.C. and D. Meisel, *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. Journal of Physical Chemistry, 1982. **86**(17): p. 3391-3395.
131. Leopold, N. and B. Lendl, *A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride*. Journal of Physical Chemistry B, 2003. **107**(24): p. 5723-5727.
132. Rivas, L., et al., *Mixed silver/gold colloids: A study of their formation, morphology, and surface-enhanced Raman activity*. Langmuir, 2000. **16**(25): p. 9722-9728.
133. Suyal, G., M. Mennig, and H. Schmidt, *Synthesis of nanocomposite thin films containing Ag-Au alloy colloids for wavelength tunability*. Journal of Materials Science, 2003. **38**(8): p. 1645-1651.
134. Honma, I., T. Sano, and H. Komiyama, *Surface-enhanced Raman-scattering (SERS) for semiconductor microcrystallites observed in Ag-CdS hybrid particles*. Journal of Physical Chemistry, 1993. **97**(25): p. 6692-6695.
135. Chen, S.H. and U. Nickel, *Synthesis of hybrid metal-semiconductor ultrafine particles - Photochemical deposition of silver on a ZnO colloid surface*. Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions, 1996. **92**(9): p. 1555-1562.
136. Wang, C.Y., et al., *Surface-enhanced Raman scattering effect for Ag/TiO₂ composite particles*. Applied Surface Science, 1999. **147**(1-4): p. 52-57.
137. Liu, Y., et al., *The surface enhanced Raman scattering effects of composite nanocrystals of Ag-TiO₂*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2001. **57**(1): p. 35-39.
138. Ung, T., L.M. Liz-Marzan, and P. Mulvaney, *Controlled method for silica coating of silver colloids. Influence of coating on the rate of chemical reactions*. Langmuir, 1998. **14**(14): p. 3740-3748.
139. Ung, T., L.M. Liz-Marzan, and P. Mulvaney, *Redox catalysis using Ag@SiO₂ colloids*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(32): p. 6770-6773.
140. Carotenuto, G., G.P. Pepe, and L. Nicolais, *Preparation and characterization of nano-sized Ag/PVP composites for optical applications*. European Physical Journal B, 2000. **16**(1): p. 11-17.
141. Jin, R.C., et al., *Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1901-1903.
142. Sun, Y.G., B.T. Mayers, and Y.N. Xia, *Template-engaged replacement reaction: A one-step approach to the large-scale synthesis of metal nanostructures with hollow interiors*. Nano Letters, 2002. **2**(5): p. 481-485.

143. Sun, Y.G. and Y.N. Xia, *Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2176-2179.
144. Yamamoto, M., et al., *Synthesis and morphology of star-shaped gold nanoplates protected by poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(22): p. 5391-5393.
145. Nehl, C.L., H.W. Liao, and J.H. Hafner, *Optical properties of star-shaped gold nanoparticles*. Nano Letters, 2006. **6**(4): p. 683-688.
146. Wiley, B.J., et al., *Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice*. Nano Letters, 2007. **7**(4): p. 1032-1036.
147. Neddersen, J., G. Chumanov, and T.M. Cotton, *Laser-ablation of metals - a new method for preparing SERS active colloids*. Applied Spectroscopy, 1993. **47**(12): p. 1959-1964.
148. Semerok, A., et al., *Experimental investigations of laser ablation efficiency of pure metals with femto, pico and nanosecond pulses*. Applied Surface Science, 1999. **138**: p. 311-314.
149. Tsuji, T., et al., *Preparation of metal colloids by a laser ablation technique in solution: influence of laser wavelength on the ablation efficiency (II)*. Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry, 2001. **145**(3): p. 201-207.
150. Crawford, K.D. and K.D. Hughes, *Raman vibrational evidence for the presence of conjugated regions in individual micron diameter polystyrene particles irradiated with visible radiation*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(13): p. 2325-2328.
151. Muniz-Miranda, M., *SERS effect from silver photoreduced on to silica colloidal nanoparticles*. Journal of Raman Spectroscopy, 2002. **33**(4): p. 295-297.
152. Bjerneld, E.J., et al., *Laser-induced growth of Ag nanoparticles from aqueous solutions*. Chemphyschem, 2002. **3**(1): p. 116-119.
153. Nie, S.M. and S.R. Emery, *Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1102-1106.
154. Kneipp, K., et al., *Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Physical Review Letters, 1997. **78**(9): p. 1667-1670.
155. Michaels, A.M., M. Nirmal, and L.E. Brus, *Surface enhanced Raman spectroscopy of individual rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(43): p. 9932-9939.
156. Kneipp, K., et al., *Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy*. Chemical Reviews, 1999. **99**(10): p. 2957-+.
157. Futamata, M., F. Maruyama, and M. Ishikawa, *Adsorbed sites of individual molecules on Ag nanoparticles in single molecule sensitivity-surface-enhanced Raman scattering*. Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(35): p. 13119-13127.
158. Dou, X.M. and Y. Ozaki, *Surface-enhanced Raman scattering of biological molecules on metal colloids: Basic studies and applications to quantitative assay*. Reviews in Analytical Chemistry, 1999. **18**(4): p. 285-321.
159. Kneipp, K., et al., *Surface-enhanced Raman scattering and biophysics*. Journal of Physics-Condensed Matter, 2002. **14**(18): p. R597-R624.
160. Jarvis, R.M. and R. Goodacre, *Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(1): p. 40-47.
161. Lajos, G., et al., *Surface-enhanced fluorescence and Raman scattering study of antitumoral drug hypericin: An effect of aggregation and self-spacing depending on pH*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(33): p. 12974-12980.
162. Lajos, G., et al., *Interaction of the Photosensitizer Hypericin with Low-Density Lipoproteins and Phosphatidylcholine: A Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Fluorescence Study*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(17): p. 7147-7154.
163. Noomnarm, U. and R.M. Clegg, *Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations*. Photosynthesis Research, 2009. **101**(2-3): p. 181-194.

164. Aslan, K., et al., *Metal-enhanced fluorescence: an emerging tool in biotechnology*. Current Opinion in Biotechnology, 2005. **16**(1): p. 55-62.
165. Phillips, K.S. and Q. Cheng, *Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(5): p. 1831-1840.
166. Zhang, J., et al., *Surface-enhanced fluorescence of fluorescein-labeled oligonucleotides capped on silver nanoparticles*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(16): p. 7643-7648.
167. Yamaguchi, T., T. Kaya, and H. Takei, *Characterization of cap-shaped silver particles for surface-enhanced fluorescence effects*. Analytical Biochemistry, 2007. **364**(2): p. 171-179.
168. Zhang, Y.X., et al., *Metal-enhanced fluorescence: Surface plasmons can radiate a fluorophore's structured emission*. Applied Physics Letters, 2007. **90**(5).
169. Zhang, J., et al., *Enhanced Forster resonance energy transfer on single metal particle. 2. Dependence on donor-acceptor separation distance, particle size, and distance from metal surface*. Journal of Physical Chemistry C, 2007. **111**(32): p. 11784-11792.
170. Campion, A., et al., *Electronic-energy transfer to metal-surfaces - a test of classical image dipole theory at short distances*. Chemical Physics Letters, 1980. **73**(3): p. 447-450.
171. Kummerlen, J., et al., *Enhanced dye fluorescence over silver island films - analysis of the distance dependence*. Molecular Physics, 1993. **80**(5): p. 1031-1046.
172. Lakowicz, J.R., *Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications*. Analytical Biochemistry, 2001. **298**(1): p. 1-24.
173. Gryczynski, I., et al., *The CFS engineers the intrinsic radiative decay rate of low quantum yield fluorophores*. Journal of Fluorescence, 2002. **12**(1): p. 11-13.
174. Lakowicz, J.R., et al., *Radiative decay engineering 2. Effects of silver island films on fluorescence intensity, lifetimes, and resonance energy transfer*. Analytical Biochemistry, 2002. **301**(2): p. 261-277.
175. Ray, K., et al., *Plasmon-Controlled Fluorescence Towards High-Sensitivity Optical Sensing*, in *Optical Sensor Systems in Biotechnology*, G. Rao, Editor. 2009. p. 29-72.
176. Etchegoin, P.G. and E.C. Le Ru, *A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2008. **10**(40): p. 6079-6089.
177. Maliwal, B.P., et al., *Fluorescence properties of labeled proteins near silver colloid surfaces*. Biopolymers, 2003. **70**(4): p. 585-594.
178. Malicka, J., et al., *Fluorescence spectral properties of cyanine dye-labeled DNA oligomers on surfaces coated with silver particles*. Analytical Biochemistry, 2003. **317**(2): p. 136-146.
179. Lakowicz, J.R., J. Malicka, and I. Gryczynski, *Silver particles enhance emission of fluorescent DNA oligomers*. Biotechniques, 2003. **34**(1): p. 62-+.
180. Li, J.F., et al., *Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy*. Nature, 2010. **464**(7287): p. 392-395.
181. Aslan, K., et al., *Metal enhanced fluorescence solution-based sensing platform 2: Fluorescent core-shell Ag@SiO₂ nanoballs*. Journal of Fluorescence, 2007. **17**(2): p. 127-131.
182. Basu, S.K., K. Kavitha, and M. Rupeshkumar, *Evaluation of ketorolac tromethamine microspheres by chitosan/gelatin B complex coacervation*. Scientia pharmaceutica, 2010. **78**(1): p. 79-92.
183. Begum, M.Y., et al., *Ketorolac Tromethamine Loaded Liposomes of Long Alkyl Chain Lipids: Development, Characterization and In Vitro Performance*. International Journal of Pharm Tech research, 2012. **4**(1): p. 218-225.

184. De, P.K. and K. Biswas, *Physico-chemical characterization of acrylate pseudolatex films and in-vitro release profile of ketorolac tromethamine from the films*. Der Pharmacia Sinica, 2013. **4**(1): p. 47-55.
185. Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts* 2004: John Wiley & Sons.
186. Catalan, J., *Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP, a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium*. Journal of Physical Chemistry B, 2009. **113**(17): p. 5951-5960.
187. Taylor, L.S. and G. Zografi, *The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy*. Pharmaceutical research, 1998. **15**(5): p. 755-761.
188. Jubert, A., et al., *Vibrational and theoretical studies of the non-steroidal anti-inflammatory drugs Niflumic [2-3 ((3-trifluoromethyl) phenylamino)-3-pyridinecarboxylic acid]; Diclofenac [[2-(2, 6-dichlorophenyl) amino]-benzeneacetic acid] and Indometacin acids [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid]*. Vibrational spectroscopy, 2005. **37**(2): p. 161-178.
189. Strachan, C.J., T. Rades, and K.C. Gordon, *A theoretical and spectroscopic study of γ -crystalline and amorphous indometacin*. Journal of pharmacy and pharmacology, 2007. **59**(2): p. 261-269.
190. Ghatak, A., P.C. Mandal, and M. Sarkar, *Indomethacin: A NSAID sensitive to micro heterogeneity in alcohol-water mixtures*. Chemical Physics Letters, 2008. **460**(4): p. 521-524.
191. Temussi, F., et al., *Determination of photostability and photodegradation products of indomethacin in aqueous media*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011. **56**(4): p. 678-683.
192. Taylor, L.S. and G. Zografi, *Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions*. Pharmaceutical Research, 1997. **14**(12): p. 1691-1698.
193. Strachan, C.J., T. Rades, and K.C. Gordon, *A theoretical and spectroscopic study of gamma-crystalline and amorphous indometacin*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2007. **59**(2): p. 261-269.
194. Chakraborty, H. and M. Sarkar, *Interaction of piroxicam with micelles: Effect of hydrophobic chain length on structural switchover*. Biophysical Chemistry, 2005. **117**(1): p. 79-85.
195. Franco-Perez, M., et al., *UV-Visible Properties of Oxicams in Solution: A TD-DFT and Experimental Study*. International Journal of Quantum Chemistry, 2012. **112**(22): p. 3637-3645.
196. Yoon, M.J., et al., *Solvent dependence of absorption and fluorescence-spectra of piroxicam- a possible intramolecular proton-transfer in the excited-state*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 1988. **9**(3): p. 171-175.
197. de Souza, K.F., et al., *A theoretical and spectroscopic study of conformational structures of piroxicam*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **75**(2): p. 901-907.
198. Geckle, J.M., D.M. Rescek, and E.B. Whipple, *Zwitterionic piroxicam in polar solution*. Magnetic Resonance in Chemistry, 1989. **27**(2): p. 150-154.
199. Redenti, E., et al., *Raman and solid state C-13-NMR investigation of the structure of the 1 : 1 amorphous piroxicam :beta-cyclodextrin inclusion compound*. Biospectroscopy, 1999. **5**(4): p. 243-251.
200. Taddei, P., A. Torreggiani, and R. Simoni, *Influence of environment on piroxicam polymorphism: Vibrational spectroscopic study*. Biopolymers, 2001. **62**(1): p. 68-78.

201. Takacsnovak, K., et al., *Microscopic protonation deprotonation equilibria of the antiinflammatory agent piroxicam*. Helvetica Chimica Acta, 1995. **78**(3): p. 553-562.
202. Banerjee, R., H. Chakraborty, and M. Sarkar, *Photophysical studies of oxicam group of NSAIDs: piroxicam, meloxicam and tenoxicam*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003. **59**(6): p. 1213-1222.
203. Andrade, S.M. and S.M.B. Costa, *Hydrogen bonding effects in the photophysics of a drug, Piroxicam, in homogeneous media and dioxane-water mixtures*. Physical Chemistry Chemical Physics, 1999. **1**(18): p. 4213-4218.
204. Rozou, S., A. Voulgari, and E. Antoniadou-Vyza, *The effect of pH dependent molecular conformation and dimerization phenomena of piroxicam on the drug: cyclodextrin complex stoichiometry and its chromatographic behaviour: A new specific HPLC method for piroxicam:cyclodextrin formulations*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **21**(5): p. 661-669.
205. Hernandez, M., et al., *SERS of the anti-inflammatory drug piroxicam adsorbed on the surface of silver or gold colloids as nanocarrier model*. Journal of Raman Spectroscopy, 2015.

9. Anexo

Tabla 3. Asignación de las principales bandas Raman del β PX sólido y de las bandas SERS en coloide AgHX a diferentes pHs [205].

Asignación	Raman β Piroxicam (sólido)	SERS (Ag) pH = 1,0	SERS (Ag) pH = 2,0	SERS (Ag) pH = 4,0	SERS (Ag) pH = 7,0
Amida I ^a	1606				
v Anillo tiazínico ^a	1596				
		1594	1592	1592	1594
v Anillo tiazínico ^a	1577				
v Anillo tiazínico ^a	1560				1562
		1548	1547	1548	
Amida II ^a	1523				
ZW banda marcadora-1 ^a			1465	1465	
δ CH ₃	1434	1445	1444	1444	
ZW banda marcadora -2 ^a		1383	1396	1394	1393
		1356	1356	1358	
δ Anillo tiazínico ^b	1335				
		1305	1305	1303	
	1279	1282	1281	1281	
ν_{as} SO ₂ ^b	1256	1253	1248	1257	
Amida III ^c	1237			1243	1239
Anillo piridínico ^d	1217	1218	1218	1215	
ν_s SO ₂ ^b	1153	1161	1159	1160	1162
	1121	1119	1119	1119	1133
Piridinio banda marcadora -1c	1031	1035	1034	1034	
Piridinio banda marcadora -1 ^c		1010	1010	1008	
Piridil banda marcadora					1005
	992				
	940	936	933	934	856
γ	876	882	883	882	
	829	833	833	833	
	779	788	786	785	
	730	734	733		
		718	716	714	714
					678
Anillo piridínico ^d	653	654	653	653	
		633	633	634	
	623	622	620		
					600
	580	585	583	583	
	458	456	456	457	
Anillo piridínico ^d	404	408	408	408	

v: tensión, s: simétrica, as: asimétrica, δ : enlace en el plano, γ : enlace fuera del plano.

a) Redenti, E., et al. Biospectroscopy, 1999. 5(4): p. 243-251

b) Imai, Y. and Kamada, J-i. Spectrochim. Acta A, 2005 61: p. 711

c) Socrates, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts* 2004: John Wiley & Sons.

d) Zuo, C. and Jagodzinski, P. W. Journal of Physical Chemistry B, 2005. 109(5): p. 1788-1793

