Caracterización molecular de nanoportadores de fármacos mediante espectroscopía intensificada por plasmones localizados: Fluorescencia (SEF) y Raman (SERS)

Molecular characterization of drug's nanocarriers based on plasmon-enhanced spectroscopy: Fluorescence (SEF) and Raman (SERS)

Paz Sevilla^(1,2,S), Margarita Hernández⁽²⁾, Elisa Corda⁽²⁾,
José V. García-Ramos^(2,S), Concepción Domingo^(2,*,S)

1. Departamento de Química Física II, Facultad de Farmacia, Univ. Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

2. Instituto de Estructura de la Materia, IEM-CSIC, Serrano 121, 28006 Madrid, Spain.

(*) Email: cdomingo@iem.cfmac.csic.es

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Recibido / Received: 07/12/2012. Revisado / Revised: 25/01/2013. Aceptado / Accepted: 29/01/2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.46.2.111>

RESUMEN:

Se presentan algunos resultados de la aplicación conjunta de las espectroscopías SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) y SEF (*Surface Enhanced Fluorescence*) a la caracterización molecular de sistemas nanoportadores de los fármacos emodina, indometacina y ketorolaco, basados en el empleo de coloide de plata acuoso. En el caso del antitumoral emodina, el sistema “nanopartículas de plata-emodina” se ha infiltrado posteriormente en silicio poroso, caracterizándose también el nuevo sistema. El análisis de los datos SERS, SEF y de absorción UV-Vis de indometacina y ketorolaco a diferentes valores de pH nos ha permitido, además, proponer los mecanismos correspondientes a la aproximación de las respectivas moléculas a la superficie de las nanopartículas de plata en el rango de pHs estudiados.

Palabras clave: Raman, Fluorescencia, SERS, SEF, Emodina, Indometacina, Ketorolaco, Nanoportadores.

ABSTRACT:

The combined application of SERS (*Surface-Enhanced Raman Scattering*) and SEF (*Surface Enhanced Fluorescence*) to the molecular characterization of drug's nanocarriers based on silver colloids is here shown for the antitumoral drug emodin, and the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs indomethacin and ketorolac. The system “silver nanoparticles-emodin” was subsequently embedded in porous silicon and the new system also characterized. The joint analysis of the SERS, SEF and UV-Vis spectra of indomethacin and ketorolac at different pHs has also allowed to propose schemes for the approaching mechanisms of the drug molecules to the silver nanoparticles surface in the pH range studied.

Key words: Raman, Fluorescence, SERS, SEF, Emodin, Indomethacin, Ketorolac, Drug Nanocarriers.

REFERENCIAS Y ENLACES / REFERENCES AND LINKS

- [1]. “Market opportunities in nanotechnology drug delivery”, <http://www.cientifica.com/wpcontent/uploads/downloads/2012/04/NDD-White-Paper-Jan-2012.pdf> (2012)
- [2]. “Nanotechnology for drug delivery: Global market for nanocarriers”, <http://www.cientifica.com/research/market-reports/nanotechnology-for-drug-delivery-global-market-for-nanocarriers/> (2012)

- [3]. S. Singh, "Nanomedicine-nanoscale drugs and delivery systems", *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 7906-7918 (2010). [DOI](#)
- [4]. J. Salonen, L. Laitinen, A. M. Kaukonen, J. Tuura, M. Bjorkqvist, T. Heikkilä, K. Vaha-Heikkilä, J. Hirvonen, V. P. Lehto, "Mesoporous silicon microparticles for oral drug delivery: Loading and release of five model drugs", *J. Control. Release* **108**, 362-374 (2005). [DOI](#)
- [5]. C. D. Geddes, J. R. Lakowicz, "Metal-enhanced fluorescence", *J. Fluoresc.* **12**, 121-129 (2002). [DOI](#)
- [6]. R. Aroca, *Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, Hoboken, New Jersey (2006). [DOI](#)
- [7]. E. C. Le Ru, P.G. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, Elsevier, Amsterdam (2009).
- [8]. Y. Wang, B. Book-Newell, J. Irudayaraj, "Folic acid protected silver nanocarriers for targeted drug delivery", *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 751-759 (2012). [DOI](#)
- [9]. C. A. Prestidge, T. J. Barnes, C. H. Lau, C. Barnett, A. Loni, L. Canham, "Mesoporous silicon: a platform for the delivery of therapeutics", *Expert Opin. Drug Deliv.* **4**, 101-110 (2007). [DOI](#)
- [10]. J. Salonen, A. M. Kaukonen, J. Hirvonen, V.-P. Lehto, "Mesoporous silicon in drug delivery applications", *J. Pharm. Sci.* **97**, 632-653 (2008). [DOI](#)
- [11]. J.M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Linden, "Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles - opportunities & challenges", *Nanoscale* **2**, 1870-1883 (2010). [DOI](#)
- [12]. S. B. Wang, "Ordered mesoporous materials for drug delivery", *Micropor. Mesopor. Mat.* **117**, 1-9 (2009). [DOI](#)
- [13]. L. T. Canham, "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers", *Appl. Phys. Lett.* **57**, 1046-1048 (1990). [DOI](#)
- [14]. G. Recio-Sanchez, G. Dominguez-Cañizares, M. Manso, I. Preda, V. Torres-Acosta, A. Gutierrez, L. Soriano, R. J. Martin-Palma, "Surface functionalization of nanostructured porous silicon by APTS: Toward the fabrication of electrical biosensors of Bacterium Escherichia coli", *Curr. Nanosci.* **7**, 178-182 (2011). [DOI](#)
- [15]. S. Chan, S. Kwon, T. W. Koo, L. P. Lee, A. A. Berlin, "Surface-enhanced Raman scattering of small molecules from silver-coated silicon nanopores", *Adv. Mater.* **15**, 1595-1598 (2003). [DOI](#)
- [16]. H. H. Lin, J. Mock, D. Smith, T. Gao, M. J. Sailor, "Surface-enhanced Raman scattering from silver-plated porous silicon", *J. Phys. Chem. B* **108**, 11654-11659 (2004). [DOI](#)
- [17]. M. Hernandez, G. Recio, R. Martin-Palma, J. Garcia-Ramos, C. Domingo, P. Sevilla, "Surface enhanced fluorescence of anti-tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles and loaded on porous silicon", *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 1-18 (2012). [DOI](#)
- [18]. N. Leopold, 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", *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723-5727 (2003). [DOI](#)
- [19]. M. V. Canameres, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gomez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, "Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine", *Langmuir* **21**, 8546-8553 (2005). [DOI](#)
- [20]. M. V. Cañameres, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, M. Castillejo, M. Oujja, "Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties", *J. Colloid Interf. Sci.* **326**, 103-109 (2008). [DOI](#)
- [21]. P. Sevilla, J. M. Rivas, F. Garcia-Blanco, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, "Identification of the antitumoral drug emodin binding sites in bovine serum albumin by spectroscopic methods", *BBA-Proteins Proteomics* **1774**, 1359-1369 (2007). [DOI](#)
- [22]. P. Sevilla, F. Garcia-Blanco, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, "Aggregation of antitumoral drug emodin on Ag nanoparticles: SEF, SERS and fluorescence lifetime experiments", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 8342-8348 (2009). [DOI](#)
- [23]. P. Sevilla, R. De-Llanos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, "SERS+MEF of the anti tumoral drug emodin adsorbed on silver nanoparticles", *Proc. SPIE* **7577**, *Plasmonics in Biology and Medicine VII*, 757714 (2010).

- [24]. R. De-Llanos, S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, J.V. Garcia-Ramos, P. Sevilla, "Surface plasmon effects on the binding of antitumoral drug emodin to bovine serum albumin", *J. Phys. Chem. C* **115**, 12419-12429 (2011). [DOI](#)
- [25]. A. Ghatak, P. C. Mandal, M. Sarkar, "Indomethacin: A NSAID sensitive to micro heterogeneity in alcoholwater mixtures", *Chem. Phys. Lett.* **460**, 521-524 (2008). [DOI](#)
- [26]. A. C. Weedon, D. F. Wong, "The photochemistry of indomethacin", *J. Photoch. Photobiol. A* **61**, 27-33 (1991). [DOI](#)
- [27]. F. Temussi, F. Cermola, M. DellaGreca, M. R. Iesce, M. Passananti, L. Previtera, A. Zarrelli, "Determination of photostability and photodegradation products of indomethacin in aqueous media", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 678-683 (2011). [DOI](#)
- [28]. L. S. Taylor, G. Zograf, "The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy", *Pharm. Res.* **15**, 755-761 (1998). [DOI](#)
- [29]. A. Jubert, N. E. Massa, L. L. Tevez, N. B. Okulik, "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", *Vib. Spectrosc.* **37**, 161-178 (2005). [DOI](#)
- [30]. S. K. Basu, K. Kavitha, M. Rupeshkumar, "Evaluation of ketorolac tromethamine microspheres by chitosan/gelatin B complex coacervation", *Sci. Pharm.* **78**, 79-92(2010). [DOI](#)
- [31]. M. Y. Begum, M. R. Shaik, K. Abbulu, M. Sudhakar, "Ketorolac tromethamine loaded liposomes of long alkyl chain lipids: Development, characterization and in vitro performance", *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **4**, 218-225 (2012).
- [32]. P. Sevilla, M. Hernández, E. Corda, J. V. García-Ramos, C. Domingo, "Molecular spectroscopic characterization of the non-steroidal anti-inflammatory drugs indomethacin and ketorolac in solution", Poster Mo-001S in Umapathy, Edt., 23rd International Conference on Raman Spectroscopy - ICORS 2012, Bangalore, India (2012).
- [33]. C. J. Strachan, T. Rades, K. C. Gordon, J. Rantanen, "Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids", **59**, 179-192 (2007).
- [34]. B. W. Disanayaka, A. C. Weedon, "Charge-transfer fluorescence of some N-benzoylindoles", *Can. J. Chem.* **65**, 245-250 (1987). [DOI](#)

1. Introducción

Uno de los mercados más prometedores en la actualidad, tal y como puede verse en informes muy recientes [1,2] es el relacionado con la nanotecnología aplicada a la liberación local y controlada de fármacos y agentes terapéuticos. Y, consecuentemente, este es también uno de los campos de investigación científica más activo, no solamente en lo referente a diseño y búsqueda de nuevos sistemas nanoportadores (*nanocarriers*) que satisfagan los criterios de biocompatibilidad y biodegradabilidad requeridos, sino también en la interpretación químico-física de las interacciones nanoportador-fármaco, tanto en ausencia como en presencia de proteínas/péptidos, y de los procesos que tienen lugar durante el transporte del fármaco y durante su liberación local en la "diana" (*target*) deseada. Las razones de peso que mueven a los laboratorios de investigación y desarrollo – y a

los mercados – hacia tal aplicación de la nanotecnología radican, por una parte, en que los métodos tradicionales de administración oral o intravenosa de los fármacos presentan, muchas veces, una biodisponibilidad (*bioavailability*) baja allí donde se requieren, y por otra, en que las patentes propiedad de las industrias farmacéuticas tienen un tiempo relativamente corto de validez y, por lo tanto, expiran, a menos que se desarrolle una nueva forma de administración de los fármacos en cuestión que permita prorrogar la patente.

Los sistemas nanoportadores han de ser biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y estables en medio biológico, han de mantener constante su carga de fármaco/agente terapéutico y liberarla allí donde debe actuar, a ser posible, de manera controlada temporalmente. Y, además, deben ser fáciles de fabricar a gran escala y con bajo costo. Si, al mismo tiempo,

esos sistemas pueden ser detectados en su recorrido hacia las "dianas" mediante técnicas espectroscópicas con capacidad de producir imágenes, su interés resulta aún mayor.

Son varios los sistemas en la nanoescala que pueden emplearse como portadores de fármacos [3] (polímeros biodegradables, nanopartículas metálicas, liposomas, matrices inorgánicas mesoporosas como la sílice o el silicio poroso, etc.). Nosotros hemos utilizado como portadores nanopartículas de plata (AgNPs) en coloide, y nanopartículas de plata dentro de los canales de silicio poroso (PSi) y hemos trabajado con tres fármacos de diferentes características, un antitumoral, emodina (EM) sobre el que hemos trabajado anteriormente en nuestro grupo, y dos AntiInflamatorios No EsteroideoS (AINES, en inglés *NSAIDs - Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*), indometacina (IM) y ketorolaco (KT), para los que existe interés farmacológico en disponer de nuevas formas de administración que mejoren la biodisponibilidad a la vez que minimicen los efectos secundarios de las actuales. EM e IM presentan una solubilidad muy baja en agua, dependiendo del pH, mientras que KT es muy soluble en agua a cualquier pH. Los nanoportadores que hemos utilizado permiten modificar convenientemente su solubilidad, e incluso la velocidad de liberación, tal y como se ha demostrado anteriormente para el PSi carbonizado térmicamente, que retarda la liberación de fármacos muy solubles en agua mientras que acelera la liberación de los poco solubles [4].

El empleo de nanoestructuras de plata presenta dos grandes ventajas, aparte de su actividad antimicrobiana: i) el fármaco se adsorbe fácilmente sobre ellas sin necesidad de funcionalización y se transportan juntos, y ii) debido a los plasmones localizados que soportan y que son resonantemente excitados por el láser a 532 nm que es la fuente de excitación de las técnicas espectroscópicas que utilizamos, se produce una intensificación de la fluorescencia (*Surface Enhanced Fluorescence*, SEF [5]) y/o de la señal Raman (*Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS [6,7]) del correspondiente fármaco que permite mayor sensibilidad en su detección, pudiéndose incluso llegar a utilizar dichas "señales" espectroscópicas intensificadas

para obtener imágenes de distribución del sistema nanoportador-fármaco en la célula o tejido "diana"[8].

Por su parte, el PSi es uno de los materiales mesoporosos más utilizados como portadores de fármacos [9,10]. Al igual que el dióxido de silicio [11,12] es biocompatible, pero presenta una mayor biodegradabilidad, requisitos ambos imprescindibles cuando se trata de fabricar sistemas de liberación controlada de fármacos para uso in vivo. El PSi presenta otra ventaja adicional y es que su fotoluminiscencia en la región visible del espectro electromagnético descubierta por Canham en 1990 [13] puede servir como señal indicadora de la presencia del fármaco transportado, siempre y cuando éste se encuentre debidamente inmovilizado en la superficie del PSi, lo que habitualmente requiere una adecuada funcionalización de la misma [14]. El PSi puede también incorporar nanopartículas metálicas y de hecho se han propuesto nuevos sustratos SERS recubriendo el PSi con plata [15,16]. No obstante no son sustratos adecuados para SEF ya que, cuando la molécula objeto de estudio se absorbe en ellos, su fluorescencia se "apaga" (*quenching*) porque el PSi proporciona múltiples canales de desactivación no radiativos para la molécula excitada [15]. Como nuestro objetivo es utilizar SEF y SERS para caracterizar los nanoportadores, hemos diseñado un nuevo procedimiento, consistente en cargar el PSi con el sistema "nanopartículas de plata-emodina" [17], de manera que, por una parte no ha sido necesario funcionalizar el PSi y, además, hemos podido monitorizar la presencia de la emodina en los nanoporos del PSi mediante la señal SEF del fármaco.

En el caso de los antiinflamatorios IM y KT, para los que no existen datos fisicoquímicos en disolución acuosa, hemos llevado a cabo un estudio de la caracterización molecular de los respectivos sistemas "AgNPs-fármaco" fundamentalmente mediante espectroscopías SEF y SERS. Este estudio servirá de base para su uso en sistemas liberadores de los fármacos más complejos como puede ser su inclusión en micropartículas de PSi o de sílice, liposomas, etc.

Así, en este trabajo se presenta un resumen de los resultados obtenidos hasta el momento en los estudios SEF del sistema nanopartículas de

plata-emodina cargado en silicio poroso, y en los estudios SERS y SEF de los sistemas nanopartículas de plata-indometacina y nanopartículas de plata-ketorolaco en disolución acuosa.

2. Experimental

Los fármacos (Sigma Aldrich) y los disolventes (Panreac) tenían pureza analítica. Se utilizó agua Milli-Q. Los coloides de plata se prepararon siguiendo el método propuesto en la bibliografía mediante reducción de nitrato de plata con hidrocloreto de hidroxilamina [18]. Las nanoestructuras metálicas así obtenidas tienen un tamaño promedio de 50 nm y forma aproximadamente esférica [19,20]. El silicio poroso se preparó mediante ataque (*etching*) electroquímico de la superficie de una oblea de silicio. Los detalles del proceso de fabricación de la capa de PSi con poros de 60 nm de diámetro, así como del método de carga del sistema "AgNPs-emodina" en el PSi pueden encontrarse en [17]. Los espectros Raman, SERS y SEF se obtuvieron en un Microscopio Raman Renishaw In Via, dotado de láseres con emisión a 325, 442, 532 y 785 nm y ópticas adecuadas para cada rango espectral, así como de una cámara CCD. Las muestras para las medidas SERS y SEF se prepararon a partir de disoluciones $1 \times 10^{-1} \text{M}$ (IM) en DMSO y $1 \times 10^{-3} \text{M}$ (KT) en agua, y después se diluyeron con agua (coloide de plata) hasta la concentración final $1 \times 10^{-4} \text{M}$. 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, a la vez que proporciona señales SERS con buena relación señal/ruido. El porcentaje de DMSO (%v/v) siempre fue menor que 0.1%.

3. Resultados

3.a. Emodina

En la Fig. 1 se presentan los espectros de fluorescencia (excitación láser a 532 nm) de la emodina en disolución en metanol en ausencia (A) y presencia de coloide de plata (C) así como

Fig. 1: Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$) de emodina en disolución. A: en metanol; B: en agua con coloide de plata; C: en metanol con coloide de plata; D: como la muestra B, añadiendo BSA. En el recuadro interior se detalla la parte del espectro de la muestra B que corresponde al espectro SERS.

Fig. 2: Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$) de emodina correspondientes a las muestras A-D de la Fig. 1 cargadas en silicio poroso.

en disolución acuosa con coloide de plata (B) y añadiendo a la muestra B la proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*) (D). En la Fig. 2 se muestran los espectros SEF de las diferentes muestras (A-D) cargadas en PSi.

Los trabajos previamente desarrollados en nuestro grupo sobre SERS y SEF de emodina [21-24] nos permiten interpretar los resultados obtenidos. Cuando el disolvente es agua la emodina actúa como agregante de los coloides de plata, siendo posible la observación del espectro SERS (Fig. 3(b)) (los agregados de EM de distintos tamaños dan lugar a las bandas anchas que se observan en el espectro a 620, 660, 690, 750, 790 y 830 nm). Sin embargo, en las disoluciones en medio orgánico (Fig. 3(c)) no

se observa espectro SERS ya que el alcohol evita la formación de agregados de nanopartículas, aunque sí se observa aumento de la fluorescencia (efecto SEF) en presencia de coloide de plata debido a la formación de agregados de emodina. En agua, con coloide de plata y proteína BSA el factor de intensificación de la señal de fluorescencia de la EM es aún mayor, ya que es la propia proteína la que hace de espaciador, y no se observa espectro SERS. La explicación a estas observaciones radica en que la intensificación SERS afecta a las moléculas directamente “pegadas” a las AgNPs, mientras que para que haya intensificación SEF, las moléculas deben estar “un poco separadas” de las AgNPs (la fluorescencia de las moléculas directamente “pegadas” se desactiva). La presencia de BSA “aleja” las moléculas de EM de la superficie de las AgNPs y se observa SEF pero no SERS.

Cuando los diferentes sistemas A-D se cargan en PSi, con un tamaño de poro de unos 60 nm, no se observa espectro SERS, observándose únicamente el espectro SEF del monómero de la emodina (Fig. 2). Esto parece indicar que el tamaño de poro no permite la entrada de agregados de mayor tamaño, puesto que, como hemos visto en el caso de las muestras en disolución, si hubiera agregados de nanopartículas, se observaría espectro SERS. Se da por tanto un efecto de selectividad “por tamaño”. Este hecho podría ser de utilidad en el caso de que monómeros y agregados de un determinado fármaco tuvieran diferente actividad farmacéutica y/o efectos secundarios, lo cual es bastante común: cambiando el tamaño de poro del PSi empleado como nanoportador se podría seleccionar la “forma” del fármaco deseada.

En la Fig. 2 se observa que la intensificación de la fluorescencia es mayor en agua que en metanol, y mayor aun cuando hay proteína BSA, sin observarse degradación de la emodina. Las medidas de fluorescencia realizadas a diferentes tiempos después de la carga del PSi con las muestras B y C indican que los sistemas emodina-AgNPs permanecen dentro de los poros del PSi, sin degradación, al menos durante 30 días [17].

3.b. Indometacina y ketorolaco

Los fármacos NSAIDs más conocidos, de entre los pertenecientes a la familia de los ácidos fenilalcanoicos, son el ibuprofeno y el naproxeno. Otros fármacos de la misma familia, la indometacina (IM) y el ketorolaco (KT), si bien tienen propiedades analgésicas muy interesantes, pueden tener efectos secundarios severos en sus formas actuales de administración, por lo que existe un interés farmacológico creciente en diseñar nuevas formas de dosificación para ambos que permitan una liberación local y controlada de los mismos. Este interés es el que nos ha llevado a elegirlos como objetos de nuestro estudio.

El desarrollo de nuevos sistemas nano-transportadores requiere una caracterización espectroscópica completa de la indometacina y el ketorolaco en disolución acuosa, que permita conocer sus propiedades físicoquímicas y predecir su comportamiento. Si bien se tienen algunos datos básicos sobre sus espectros de absorción y fluorescencia en metanol y otros disolventes orgánicos [25,26] solo muy recientemente se ha prestado interés a la indometacina en disoluciones acuosas, en particular en lo referente a su fotoquímica [27]. Como ya se ha dicho en la introducción, la IM es prácticamente insoluble en agua por lo que se requieren técnicas de detección muy sensibles para poder estudiarla en disolución acuosa. Por otra parte son escasos los datos que existen en la bibliografía sobre espectros vibracionales infrarrojo y Raman de IM y KT [28-31] que siempre corresponden a las fases sólidas y que se han utilizado al objeto de identificación de los fármacos partiendo de una asignación somera de las bandas más intensas. Nosotros hemos obtenido y analizado los espectros de absorción UV-visible, de fluorescencia y Raman de IM y KT en disolución (acuosa para KT, en DMSO para IM) para diferentes condiciones experimentales (pH, concentración, longitud de onda de excitación, etc.), así como en presencia de coloide de nanopartículas de plata buscando las condiciones experimentales en las que se puedan obtener espectros SERS y/o SEF tanto de IM como de KT [32]. Resumimos aquí los resultados más relevantes obtenidos hasta el momento.

En las Figs. 3 y 4 se muestran los espectros Raman de IM y KT en fase sólida (a) y en disolución (b), así como los espectros SERS con coloide de plata acuoso (c,d). Como la IM es insoluble en agua a las concentraciones necesarias para obtener espectro Raman, se presenta el espectro en disolución en DMSO. El perfil espectral en disolución, muy semejante al de la IM sólida, permite afirmar que existen dímeros en disolución como ocurre en el sólido [7,28,33]. Utilizando además los datos del espectro Raman Resonante de la IM en disolución excitando a 325 nm (no mostrados aquí), es posible asignar algunas bandas a los grupos indol (I) y benzoilo (B) así como a los sustituyentes del último (C-Cl, C=O). La molécula de KT presenta un equilibrio ceto-enol, que se desplaza a la forma enólica (*en*) a $\text{pH} < \text{pK}_a$ y a la cetónica (*cet*) a $\text{pH} > \text{pK}_a$ ($\text{pK}_a \sim 4$). Utilizando también los datos del espectro Raman resonante obtenidos con excitación a 325 nm, es posible la asignación de algunas bandas a los grupos fenilo (F) y pirrolizina (P).

Los espectros SERS de la IM en coloide de plata varían con el pH, como se ilustra en la Fig. 3 para pHs menor (3(c)) y mayor (3(d)) que el pK_a (~ 4). A pH 3 se obtiene un espectro muy débil que muestra bandas de los grupos benzoilo y C-Cl, indicando que son estos grupos los más próximos a las AgNPs. A pH 6 el espectro SERS es más intenso y parece que se intensifican tanto bandas del benzoilo como del indol, lo que indica que ambos grupos están próximos a las AgNPs.

Los espectros SERS de KT (Fig. 4(d) y 4(e)) varían también dependiendo de que el pH sea menor o mayor que el pK_a . La clara intensificación en el espectro a pH 2 de la banda a 1000 cm^{-1} , característica de la respiración en el plano del anillo del fenilo indica, no solo que este grupo está cerca del metal, sino cual es la orientación relativa del mismo respecto de la superficie de plata, teniendo en cuenta las reglas de selección de superficie [6]. A pH 8 se observa una nueva banda en el espectro SERS, a 1660 cm^{-1} (*cet*) que se asocia a un grupo “ceto” cerca del metal, intensificándose las bandas asignadas a la parte pirrolizínica pero no las correspondientes al fenilo.

Fig. 3: Espectros Raman de indometacina sólida (a) y en disolución 10^{-3}M en DMSO (b). Espectros SERS de indometacina 10^{-4}M en coloide de plata a pH 3 (c) y pH 6 (d). $\lambda_{\text{laser}}=532 \text{ nm}$. Ver texto para asignación (B, C-Cl, I, C=O).

Fig. 4: Espectros Raman de ketorolaco sólido (a) y en disolución acuosa $4 \times 10^{-3}\text{M}$ a pH 2 (b) y pH 8 (c). Espectros SERS de ketorolaco 10^{-4}M en coloide de plata a pH 2 (d) y pH 8 (e). $\lambda_{\text{laser}}=532 \text{ nm}$. Ver texto para asignación (F, P, en, cet).

Los espectros de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=325 \text{ nm}$) de IM y KT en disolución acuosa (datos no mostrados aquí) presentan una emisión muy débil, con máximos a 560 y 522 nm, respectivamente. La presencia de bandas a mayores longitudes de onda con un gran desplazamiento Stokes cuya posición varía con la polaridad del disolvente se debe a la existencia de un complejo de transferencia de carga también detectado en otros N-benzoilindoles [34]. Cuando la IM está en presencia de AgNPs, su señal de fluorescencia se intensifica (efecto SEF) únicamente a $\text{pHs} < 4$. Esto indica que a esos pH hay apilamiento (*stacking*) de las moléculas de IM que actúan

Fig. 5: Esquema de la aproximación de la indometacina a la superficie de plata (.....) a pH menor (3) y mayor (6) que el pK_a . La parte de la molécula con fondo azul es responsable del espectro SERS y la de fondo amarillo del espectro SEF que se observa a pH3.

Fig. 6: Esquema de la aproximación del ketorolaco a la superficie de plata (.....) a pH menor (2) y mayor (8) que el pK_a . La parte de la molécula con fondo azul es responsable del espectro SERS que se observa a cada pH, bien sea la forma enólica (verde) o cetona (roja).

como espaciadores respecto de la superficie de Ag, observándose efecto SEF de las moléculas de IM más alejadas del metal. A $pH > 4$ no hay agregación y la mayoría de las moléculas se sitúan en la superficie de Ag, produciéndose una desactivación (*quenching*) de la señal en vez de efecto SEF. En el caso del KT en presencia de coloide de plata, los espectros de fluorescencia cambian al variar el pH (máximo a 520 ó 550 nm para $pH > pK$ ó $pH < pK$, respectivamente) y, no solamente no se observa efecto SEF para ningún pH, sino que se observa desactivación de la fluorescencia. Esta no es igual para unas bandas que para otras, lo que nos da idea de la parte molecular más cercana a la superficie de Ag a cada pH.

El análisis conjunto de los espectros Raman, SERS y SEF de IM y KT a diferentes pHs, permite proponer la forma de “aproximación” de las moléculas respectivas a las nanopartículas de plata a valores de pH menor y mayor que el pK_a , lo cual se ilustra en las Figs. 5 y 6.

En el caso de la IM a $pH < pK_a$, un apilamiento de dímeros de forma casi perpendicular a la superficie de la plata, y con el benzoilo cerca de la misma, justifica la observación de espectro SERS y SEF simultáneamente (fondo azul para la parte del dímero que da SERS y fondo amarillo para la que da SEF). A $pH > pK_a$, la no existencia de dímeros y una disposición de la molécula relativamente “acostada” explica tanto la intensificación SERS de las bandas correspondientes a los grupos benzoilo e indol,

como una disminución de la fluorescencia molecular. Los esquemas propuestos para la aproximación del KT a la plata incluyen también la forma enólica ($pH < pK$) o cetónica ($pH > pK$) de dicha molécula, de manera que la forma enólica se aproxima a la superficie del metal por el anillo fenilo, que está bastante perpendicular a la misma ya que se intensifica principalmente un modo de vibración “en el plano” del anillo, mientras que la forma cetónica se aproxima por la pirrolizina, y en ambos casos hay disminución de la señal de fluorescencia.

4. Conclusiones

Se han caracterizado mediante espectroscopía molecular (SERS, SEF y UV-vis) algunos sistemas nanoportadores de fármacos, en particular, el sistema nanopartículas de plata-emodina cargado en silicio poroso, y los sistemas nanopartículas de plata-indometacina y nanopartículas de plata-ketorolaco en disolución acuosa. Debido a la excitación resonante de los plasmones localizados que soportan las nanopartículas metálicas, tanto la señal Raman como la emisión de fluorescencia pueden ser intensificadas lo que conduce a técnicas de mayor sensibilidad (SERS y SEF, respectivamente) y, consecuentemente, a menores límites de detección. En el caso de la emodina, que no penetra por sí misma en los poros del PSi pero sí cuando está unida a nanopartículas de plata, se ha visto que el PSi actúa además de forma selectiva, de manera que, debido al tamaño de

los poros, solamente permite la penetración de monómeros y no agregados. En el caso de los sistemas transportadores de indometacina y ketorolaco aquí propuestos, los estudios llevados a cabo a diferentes pHs proporcionan información que puede ser relevante para su uso en nanomedicina y para una mejor comprensión de los procesos fisiológicos que tienen lugar cuando ambos fármacos se administran de forma oral y, por lo tanto, atraviesan zonas del intestino con diferentes pHs. Actualmente estamos estudiando las cinéticas de liberación de los fármacos desde los sistemas nanoportadores aquí caracterizados.

Agradecimientos

Los autores gradecen a G. Recio y a R.J. Martín-Palma (UAM, Madrid) la preparación de las muestras de silicio poroso. Se agradece al MINECO (proyecto FIS2010-15405), a la Comunidad de Madrid (proyecto MICROSERES II-S 2009TIC-1476) y al Grupo Investigación 950247 de la UCM, la financiación recibida para llevar a cabo este trabajo. M.H. agradece al MINECO su contrato PAT, y E.C. a la Comunidad de Madrid su contrato a través de MICROSERES II.