

Estudio vibracional y determinación de sildenafil mediante Espectroscopia Raman Amplificada
por Efecto de Superficie (SERS)

Sergio Miguel Santamaria Parra

Trabajo de Grado para Optar el Título de Químico

Director

John Jairo Castillo León

Doctor en Química

Codirector

Ciro Eduardo Rozo Correa

Magíster en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A Dios, por ser la guía en cada paso de este camino y darme sabiduría y fortaleza para superar cada desafío. A mi abuela, por ser el pilar más importante en mi vida, por demostrarme siempre su apoyo incondicional y por brindarme sus consejos y compañía. A mi madre, por su amor, tiempo y paciencia, por confiar en mí y acompañarme en cada camino. Y finalmente, a mis colegas y amigos, por hacer de esta etapa una experiencia agradable y enriquecedora.

Agradecimientos

A mi familia por el apoyo recibido durante mi formación como profesional, y por su paciencia y acompañamiento a lo largo de este camino.

Al Dr. John Jairo Castillo León y al MSc. Ciro Eduardo Rozo Correa, por brindarme sus conocimientos, enseñanzas y por su paciencia y disposición en cada momento.

A la Universidad Industrial de Santander (UIS), en especial a la Escuela de Química, por brindarme el apoyo académico y económico para culminar mi carrera profesional.

Al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la UIS y al Grupo de Investigaciones Ambientales para el Desarrollo Sostenible de la Universidad Santo Tomas (USTA), por facilitarme el espacio, los equipos y todos los instrumentos y herramientas necesarias para terminar mi investigación.

Extiendo un agradecimiento especial a cada uno de los docentes que hicieron parte de mi formación, por compartir su conocimiento y por hacer parte de la ardua tarea de enseñar e instruir.

Por último, agradezco a mis colegas y compañeros que me han acompañado desde el inicio y a los que conocí en el transcurso de la carrera.

Tabla de contenido

Introducción.....	12
1. Objetivos.....	17
1.1 Objetivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2. Estado del arte.....	18
3. Marco teórico.....	23
3.1 Sildenafil (Viagra).....	23
3.2 Espectroscopía Raman.....	27
3.2.1 Espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie (SERS)	32
3.3 Teoría funcional de la densidad (DFT)	36
4. Metodología.....	42
4.1 Etapa 1: Determinación de espectros Raman y SERS del sildenafil	42
4.1.1 Análisis estructural de la geometría optimizada del sildenafil mediante DFT	42
4.1.2 Simulación de espectros teóricos Raman y SERS del sildenafil	42
4.1.3 Adquisición de espectros experimentales Raman y SERS del sildenafil	43
4.2 Etapa 2: Análisis vibracional de los espectros Raman y SERS del sildenafil	44
4.3 Etapa 3: Evaluación del potencial del método SERS para la detección de sildenafil	45
4.4 Etapa 4: Determinación de sildenafil en un multivitamínico mediante SERS	46
5. Resultados y discusiones	47
5.1 Determinación de espectros Raman y SERS del sildenafil	47
5.1.1 Análisis estructural de la geometría optimizada del sildenafil mediante DFT	47

5.2 Análisis vibracional de los espectros Raman y SERS del sildenafil.....	54
5.2.1 Comparación del espectro Raman experimental y teórico del sildenafil	54
5.2.2 Comparación del espectro SERS experimental y teórico del sildenafil	57
5.3 Evaluación del potencial analítico del método SERS para la detección de sildenafil	65
5.4 Determinación de sildenafil en un multivitamínico mediante SERS	69
6. Conclusiones	71
Referencias Bibliográficas.....	74
Apéndices	79

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Datos para la preparación de las soluciones de sildenafil a diferentes concentraciones (6 a 100 μM).	45
Tabla 2. Longitudes de enlace de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X	49
Tabla 3. Ángulos de enlace de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X	50
Tabla 4. Ángulos diedros de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X	50
Tabla 5. Asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en el espectro Raman del sildenafil	56
Tabla 6. Asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en el espectro SERS del sildenafil	63

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura del sildenafil $C_{22}H_{30}N_6O_4S$	26
Figura 2. Diagrama de los procesos de dispersión Rayleigh y Raman.	29
Figura 3. Geometría optimizada de la molécula de sildenafil.	47
Figura 4. Mapa de potencial electrostático molecular (MEP) de la molécula de sildenafil.....	52
Figura 5. Espectro Raman experimental de una tableta de sildenafil de 100mg (línea azul) y espectro Raman calculado del sildenafil utilizando el método B3LYP/6-31G(d) (línea roja).....	54
Figura 6. Espectro SERS experimental del sildenafil (azul) y espectros SERS teóricos del complejo SDF–Au ₆ en los distintos sitios de interacción de la molécula: O ₂ (verde), O ₃ (violeta), O ₅ (rojo), N ₁₁ (amarillo) y N ₁₀ (rosado).....	58
Figura 7. Espectro SERS experimental del sildenafil (azul) y espectros SERS teóricos del complejo SDF–Au ₁₀ en los distintos sitios de interacción de la molécula: O ₂ (verde), O ₃ (violeta), O ₅ (rojo), N ₁₁ (amarillo) y N ₁₀ (rosado).....	59
Figura 8. Comparación del espectro Raman (azul) y SERS (rojo) experimental del sildenafil ...	61
Figura 9. Mapa de potencial electrostático molecular (MEP) del complejo SDF–Au ₆ en el sitio de interacción O ₅	64
Figura 10. A) Espectros SERS del sildenafil a diferentes concentraciones y B) Gráfico de barras de la intensidad SERS en función de la concentración de sildenafil	65
Figura 11. Gráficos de dispersión de la intensidad SERS en función de la concentración.	67
Figura 12. Gráficos de dispersión que relacionan la intensidad SERS de las señales ubicadas en 1232 y 1581cm ⁻¹ en función del logaritmo en base 10 de la concentración.	68
Figura 13. Espectros SERS de los tres sistemas analizados.	70

Lista de apéndices**Pág.**

Apéndice A. Geometrías optimizadas de los diez confórmers de SDF obtenidas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d).....	79
---	----

Glosario

AuNPS: Nanopartículas de oro

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico

DFT: Teoría funcional de la densidad

DRX: Difracción de Rayos X

ED: Disfunción erétil

GC: Cromatografía de gases

GGA: Aproximación de gradiente generalizado

HF: Aproximación Hartree-Fock

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

IR: Espectroscopia infrarroja

LDA: Aproximación de densidad local

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MEP: Mapa de potencial electrostático molecular

MS: Espectrometría de masas

MV: Multivitamínico

PDE5: Fosfodiesterasa tipo 5

SDF: Sildenafil

SERS: Espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie

RESUMEN

Título: Estudio vibracional y determinación de sildenafil mediante Espectroscopia Raman

Amplificada por Efecto de Superficie (SERS)*

Autor: Sergio Miguel Santamaría Parra**

Palabras clave: Sildenafil, Espectroscopia Raman Amplificada por Efecto de Superficie, Teoría funcional de la densidad, Nanopartículas de oro, Multivitamínico

Descripción:

El sildenafil (SDF) es uno de los fármacos más reportados en la adulteración de medicamentos y suplementos comercializados ilegalmente como potenciadores sexuales naturales. Esta problemática no solo ha generado serias preocupaciones de salud pública, sino también ha evidenciado la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos rápidos, sensibles y eficientes para la detección del SDF en matrices complejas. En este trabajo se presenta un estudio acerca de las propiedades estructurales y vibracionales del SDF y se establece un procedimiento analítico para su determinación mediante la técnica SERS y métodos de la DFT. La optimización de la geometría del SDF y la simulación de sus espectros Raman y SERS se realizó mediante el funcional B3LYP, empleando el conjunto de base 6–31G(d) para la molécula aislada y el conjunto mixto (6–31G(d)/Lanl2dz) para los modelos SDF-Au₆ y SDF-Au₁₀. Los resultados obtenidos evidenciaron un alto grado de concordancia entre los datos experimentales y los cálculos teóricos, lo que permitió validar el buen desempeño del método computacional para la descripción de la estructura vibracional del SDF. Asimismo, el análisis del MEP y la comparación de los espectros SERS, permitió establecer que la interacción del SDF con la superficie de nanopilares de oro (AuNPs) ocurre principalmente a través del átomo de oxígeno (O₅) del grupo carbonilo. Adicionalmente, durante la evaluación del método SERS, se encontró que la banda ubicada en 1232 cm⁻¹ exhibió la mejor correlación lineal entre la intensidad de señal y el logaritmo de la concentración ($R^2 = 0,9714$), consolidándose como un marcador analítico confiable para el análisis de SDF en el rango de 6-100 µM. Además, el método SERS permitió identificar las bandas características del SDF en el extracto de multivitamínico fortificado, lo que demuestra la gran capacidad y potencial del método para la detección de SDF en matrices complejas.

*Trabajo de grado

Facultad de Ciencias. Escuela de Química. **Director: John Jairo Castillo León. Doctor en Química. **Codirector:** Ciro Eduardo Roza Correa. Magíster en Química.

ABSTRACT

Title: Vibrational Study and Determination of Sildenafil by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)*

Author: Sergio Miguel Santamaría Parra**

Key Words: Sildenafil, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, Density Functional Theory, Gold Nanoparticles, Multivitamin

Description:

Sildenafil (SDF) is one of the drugs most frequently reported in the adulteration of medicines and dietary supplements illegally marketed as natural sexual enhancers. This issue has not only raised serious public health concerns but has also highlighted the need to develop new rapid, sensitive, and efficient analytical methods for the detection of SDF in complex matrices. In this work, a study of the structural and vibrational properties of SDF is presented, and an analytical procedure for its determination using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and density functional theory (DFT) methods is established. The geometry optimization of SDF and the simulation of its Raman and SERS spectra were performed using the B3LYP functional, employing the 6–31G(d) basis set for the isolated molecule and the mixed 6–31G(d)/LanL2DZ basis set for the SDF-Au₆ and SDF-Au₁₀ models. The obtained results showed a high degree of agreement between the experimental data and the theoretical calculations, thereby validating the good performance of the computational method for describing the vibrational structure of SDF. Likewise, the molecular electrostatic potential (MEP) analysis and the comparison of the SERS spectra revealed that the interaction of SDF with the surface of gold nanopillars (AuNPs) occurs predominantly through the oxygen atom (O₅) of the carbonyl group. Additionally, during the evaluation of the SERS method, the band located at 1232 cm⁻¹ exhibited the best linear correlation between the signal intensity and the logarithm of the concentration ($R^2 = 0.9714$), establishing it as a reliable analytical marker for the analysis of SDF within the concentration range of 6–100 μM. Furthermore, the SERS method allowed the identification of the characteristic bands of SDF in the fortified multivitamin extract, demonstrating the great capability and potential of the method for detecting SDF in complex matrices.

*Degree Work

Science Faculty. School of Chemistry. **Supervisor: John Jairo Castillo León, Ph.D. in Chemistry. **Co-supervisor:** Ciro Eduardo Rozo Correa, M.Sc. in Chemistry.

Introducción

El sildenafil (SDF), conocido comercialmente como Viagra (citrato de sildenafil), es un inhibidor selectivo de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) ampliamente utilizado para el tratamiento de la disfunción eréctil (ED) y la hipertensión arterial pulmonar (PAH) (McCabe et al., 2016). En la actualidad, el SDF es uno de los fármacos más populares y utilizados a nivel mundial para el tratamiento de la ED, debido a su alta eficacia, rápida acción y fácil administración (Goldstein et al., 2018). No obstante, durante los últimos años múltiples investigaciones han reportado el uso inapropiado y no regulado de SDF en medicamentos falsificados y suplementos adulterados, los cuales se comercializan de forma ilegal como productos de origen natural para mejorar el desempeño sexual (INVIMA, 2017). Esta problemática ha generado serias preocupaciones de salud pública debido a los potenciales riesgos y amenazas que representa el consumo de este tipo de productos con composiciones y concentraciones desconocidas. Por esta razón, existe un creciente interés en el desarrollo y la implementación de nuevos métodos analíticos que además de ser rápidos, sensibles y eficientes, puedan ser aplicados in situ para la detección del SDF en productos farmacéuticos y suplementarios (Lin et al., 2019).

Usualmente, los análisis de SDF han sido realizados mediante una gran variedad de técnicas analíticas avanzadas de cromatografía, si bien técnicas como GC, HPLC y sus acoplamientos con espectrometría de masas ofrecen una alta sensibilidad y precisión, suelen requerir instrumentación costosa, preparación extensa de muestras, personal especializado y tiempos de análisis relativamente largos (Castillo et al., 2025). Debido a estas desventajas y limitaciones, durante los últimos años se ha evidenciado un crecimiento continuo en el desarrollo y la implementación de nuevas estrategias analíticas basadas en métodos de espectroscopía

vibracional como la Espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie (SERS). Esta técnica se ha consolidado como una alternativa atractiva y prometedora para el análisis y detección de fármacos y biomoléculas debido a su excelente desempeño en términos de velocidad, sensibilidad y eficiencia (Zhao et al., 2017). Asimismo, la técnica SERS se ha destacado por ofrecer múltiples ventajas como una alta especificidad, rápida detección, análisis no destructivo, mínima preparación de la muestra y capacidad para el análisis in situ mediante instrumentos portátiles, lo que la convierten en una herramienta ideal para el análisis de trazas y aplicaciones de control de calidad (Castillo et al., 2025)

En principio, SERS es una técnica analítica derivada de la espectroscopía Raman tradicional, cuyos fundamentos básicos se basan en el fenómeno de dispersión inelástica de la luz monocromática que proporciona información acerca de la estructura vibracional de las moléculas. Esta técnica permite determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de un analito en una muestra a partir de la identificación de los patrones de dispersión característicos de cada molécula, conocidos como huellas dactilares (Smith y Dent, 2019). No obstante, la dispersión Raman es un proceso inherentemente débil, por lo que suele considerarse una técnica de baja sensibilidad y limitada capacidad de detección. Para abordar esta limitación, la técnica SERS utiliza sustratos metálicos nanoestructurados, generalmente de oro o plata, para producir una amplificación en la intensidad de las señales Raman de las moléculas adsorbidas o cercanas a su superficie, logrando incluso factores de mejora del orden de 10^6 a 10^{15} (Le Ru et al., 2009). Este efecto de amplificación se atribuye principalmente a los efectos de mejora electromagnética producidos por los plasmones superficiales localizados de los átomos del metal y a los efectos de mejora química generados por la transferencia de carga entre la molécula y la superficie. Estos efectos de mejora generan una intensificación de las señales Raman, lo que incrementa notablemente la sensibilidad

de la técnica y permiten la detección de analitos a concentraciones muy bajas (Smith y Dent, 2019).

Pese a que la técnica SERS ofrece una alternativa rápida, sensible y eficiente, aún persisten dificultades relacionadas con la correcta interpretación de los espectros y la asignación precisa de modos vibracionales a cada una de las señales (Castillo et al., 2025). Para superar esta limitación, diversos estudios han implementado un enfoque teórico-experimental que utiliza métodos de química computacional, generalmente de la DFT, para complementar los resultados experimentales mediante la simulación de espectros vibracionales (Branderburg, 2018). Estos métodos han demostrado un notable desempeño para la optimización de las geometrías moleculares y el cálculo de las frecuencias vibracionales, lo que ha permitido mejorar significativamente la interpretación y asignación de las bandas en los espectros Raman y SERS. Asimismo, los métodos DFT también han permitido emular sistemas SERS mediante la simulación de complejos formados por la molécula de interés y un clúster metálico, lo que ha proporcionado información detallada acerca de la interacción de la molécula con la superficie metálica y ha ayudado a dilucidar los mecanismos de mejora responsables de la amplificación de las señales Raman (Guo et al., 2023).

En este trabajo se presenta un estudio detallado acerca de las propiedades estructurales y vibracionales del SDF para su detección y caracterización mediante la técnica SERS y métodos de la DFT. En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de la geometría del SDF utilizando el método computacional B3LYP/6–31G(d), lo que facilitó la identificación del conformero más estable o de menor energía. Posteriormente, se midieron diferentes parámetros estructurales de la geometría optimizada del SDF y los resultados se compararon con los datos experimentales reportados en la literatura. Luego, se calculó el espectro Raman del SDF usando el mismo nivel

de teoría, para así llevar a cabo la asignación de los modos vibracionales a cada de una de las señales observadas en el espectro Raman experimental. Después, con base a la estructura optimizada del SDF, se construyó un mapa de potencial electrostático molecular (MEP) para identificar los sitios de interacción más probables de la molécula con la superficie metálica. Esta información permitió modelar la interacción del SDF con las AuNPs en condiciones SERS, en donde se empleó como modelo dos complejos con clústeres de oro de diferente tamaño (SDF-Au₆ y SDF-Au₁₀), los cuales fueron optimizados usando el conjunto de bases mixto 6-31G(d) y Lanl2dz. Una vez optimizados los complejos, se obtuvieron los espectros SERS teóricos del SDF simulando la adsorción de la molécula con los clústeres de oro en los diferentes sitios de interacción, cuyos resultados permitieron formular un modelo de adsorción entre el SDF y la superficie de AuNPs. Por otro lado, durante la evaluación del método SERS, se adquirieron los espectros SERS experimentales del SDF en un rango de concentraciones de 6 a 100 μ M, en donde el análisis espectral permitió identificar la señal más apropiada y adecuada para el análisis cualitativo y cuantitativo de SDF. Y, por último, en este estudio se llevó a cabo la determinación de SDF en un multivitamínico comercial mediante SERS, lo que permitió evidenciar el potencial del método SERS para la identificación y detección cualitativa de SDF en matrices complejas, incluso en presencia de sustancias y compuestos interferentes.

La novedad de este trabajo radica en el uso combinado del método SERS con AuNPs y simulaciones de la DFT para estudiar las propiedades estructurales y vibracionales del SDF, así como también proporcionar información que permita comprender de forma detallada el proceso de adsorción o interacción del SDF con la superficie de AuNPs. Esto con el objetivo de establecer un procedimiento analítico preciso y confiable para la determinación y detección de SDF en matrices complejas, como muestras comerciales de fármacos y suplementos. Si bien estudios

previos han empleado el método SERS para determinar la presencia de SDF en diferentes productos comerciales (Zhao et al., 2017; Lin et al., 2019), solo unos pocos han implementado el enfoque combinado SERS-DFT para proporcionar una comprensión detallada acerca de las propiedades estructurales y vibracionales de la molécula, y la formulación de modelos de adsorción que permiten comprender la interacción entre el SDF y sustratos nanoestructurados. La implementación de este enfoque no solo mejora la comprensión del comportamiento vibracional del SDF bajo condiciones Raman y SERS, sino que también favorece el desarrollo y fabricación sistemas de detección y controles de calidad más rápidos y eficientes para la detección de SDF en muestras complejas.

Nuestros hallazgos ofrecen una alternativa rápida, sensible y eficiente para el análisis in situ de SDF en productos adulterados, convirtiendo la técnica SERS en una herramienta prometedora para su uso en controles de calidad y vigilancia dentro de la industria farmacéutica y de suplementos. El procedimiento analítico propuesto en este trabajo puede extenderse a otros fármacos o compuestos ilícitos presentes en productos falsificados, lo que apoya las iniciativas de salud pública propuestas por las instituciones gubernamentales de control y vigilancia de alimentos y medicamentos.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

- Estudiar las propiedades vibracionales del sildenafil y establecer un procedimiento para su determinación mediante Espectroscopia Raman Amplificada por Efecto de Superficie (SERS).

1.2 Objetivos específicos

- Determinar los espectros Raman y SERS del sildenafil mediante espectroscopia Raman y métodos de la DFT.
- Caracterizar los modos vibracionales del sildenafil en los espectros Raman y SERS con el objetivo de definir las señales características para su identificación y detección.
- Evaluar el potencial analítico del método SERS para la detección de sildenafil en matrices complejas.
- Determinar la presencia de sildenafil en un multivitamínico comercial mediante el método SERS.

2. Estado del arte

Durante los últimos años, el sildenafil, uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil, ha despertado un creciente interés en la comunidad científica debido a su presencia y comercialización ilegal en diversos tipos de productos farmacéuticos y suplementarios, como medicamentos falsificados y suplementos adulterados. Por esta razón, los investigadores han estado en la búsqueda de nuevos métodos analíticos para su detección que permitan garantizar la seguridad y la salud de los consumidores. Por lo general, los análisis de sildenafil han sido realizados mediante una gran variedad de técnicas analíticas avanzadas, entre las cuales se destacan la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Estas técnicas han sido empleadas para determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de sildenafil en distintos tipos de matrices, como productos alimenticios, suplementos dietéticos y fluidos biológicos.

Uno de los primeros estudios enfocados en la determinación de sildenafil fue realizado en el año 1997 por el grupo de investigación Clínica Temprana de la empresa farmacéutica Pfizer en Reino Unido. En este estudio, se desarrolló un sistema de preparación de muestras de plasma sanguíneo para la determinación simultánea de sildenafil y su metabolito desmetilado (UK-103,320) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este sistema, conocido como enriquecimiento automatizado secuencial de trazas de dializados (ASTED), fue aplicado para el análisis de múltiples muestras de plasma enriquecidas con 1.00, 5.00, 50.0 y 200 ng/ml de sildenafil y UK-103,320. Los resultados del análisis permitieron evidenciar una elevada selectividad del método ASTED-HPLC para la detección de sildenafil y UK-103,320 en un rango de concentraciones de 1 a 250ng/mL, obteniendo un porcentaje de inexactitud global entre 3,6 y

8,4%. Sin embargo, este sistema de preparación de muestras fue proceso complejo y requirió tiempos de análisis prologados (Cooper et al., 1997).

Desde entonces, se han realizado diversos estudios orientados al análisis y detección del sildenafil en diferentes matrices, utilizando distintas técnicas analíticas de cromatografía. En el año 2003, Tracqui y Ludes desarrollaron un procedimiento rápido y sencillo para la determinación de sildenafil en distintos tipos de fluidos biológicos utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Este método fue evaluado utilizando muestras de saliva, sangre y orina extraídas de un voluntario masculino de 38 años que ingirió una tableta de 25mg de sildenafil. Los resultados obtenidos mostraron un alto nivel de especificidad y una excelente sensibilidad del método para la detección de este compuesto, alcanzando un límite de detección (LOD) de 0.2 ng/mL y un límite de cuantificación (LOQ) de 0.5ng/mL en los tres tipos de fluidos (Tracqui y Ludes, 2003).

Años más tarde, en 2009, un grupo de investigadores del Centro Nacional de Envenenamiento de la Universidad de Ciencias de Malasia, desarrollaron un ensayo para la identificación de sildenafil y sus análogos (tadalafil y vardenafil) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). En sus experimentos analizaron un total de 25 muestras de productos alimenticios y preparaciones herbales diferentes, de las cuales 11 muestras revelaron la presencia de sildenafil y tadalafil en su composición. Este método demostró ser notablemente rápido y sencillo, logrando una separación cromatográfica en solo 6 minutos sin necesidad de realizar una previa purificación de la muestra antes del análisis. Además, los resultados evidenciaron una elevada sensibilidad de la técnica GC-MS para el análisis de estos fármacos, al obtener un límite de detección de 0.4, 1.7 y 1.3ng para el sildenafil, tadalafil y

varденафил, respectivamente (Man et al., 2009).

Continuando con investigaciones acerca del análisis de sildenafil en diferentes tipos de matrices, en el año 2016, Mokhtar et al. diseñaron un procedimiento basado en el método de cromatografía de gases con espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-QQQMS) para la determinación de sildenafil y otros cinco inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) (dimetilsildenafil, homosildenafil, tiosildenafil, tiodimetilsildenafil y tiohomosildenafil) en suplementos dietéticos. En este trabajo, primero se realizó un estudio preliminar para evaluar el desempeño del método GC-QQQMS en términos de velocidad, sensibilidad y precisión, utilizando dos técnicas de ionización diferentes: ionización electrónica (EI) y ionización química (CI). Y después, se implementó esta metodología para identificar la presencia de sildenafil y sus derivados en cinco suplementos dietéticos obtenidos a través de internet en Singapur. Por un lado, en el estudio preliminar se consiguió realizar una rápida separación cromatográfica de cada uno de los seis inhibidores con un tiempo de retención menor a 11 minutos usando ambas técnicas de ionización. Asimismo, se logró obtener un límite de detección (LOD) entre 0.03 y 1.50 µg/g, un límite inferior de cuantificación (LLOQ) entre 0.10 y 5.00 µg/g, y una precisión con una desviación estándar media inferior al 15%. Por otro lado, los resultados de las pruebas realizadas a los cinco suplementos indicaron que tres de las cinco muestras analizadas contenían sildenafil como componente activo, mientras que las muestras cuatro y cinco tenían tiosildenafil y tiodimetilsildenafil, respectivamente. Estos resultados permitieron evidenciar un idóneo rendimiento del método GC-QQQMS para el análisis de sildenafil y sus derivados en este tipo de matrices (Mokhtar et al., 2016).

Aunque los métodos de cromatografía y espectrometría de masas han demostrado un gran

nivel de sensibilidad y precisión, diversos estudios e investigaciones han recalcado la importancia y necesidad de avanzar en el diseño y desarrollo de nuevos métodos analíticos que además de ser rápidos, económicos y eficientes, puedan ser aplicados in situ para el análisis y detección de fármacos y biomoléculas. En este sentido, la espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie (SERS) se ha destacado como una herramienta analítica atractiva y prometedora debido a su excelente capacidad para determinar selectivamente un analito en una muestra compleja con un alto nivel de sensibilidad, velocidad y precisión. Todas estas cualidades excepcionales han impulsado el crecimiento continuo de una gran cantidad de investigaciones científicas en diversas áreas de ciencia como la química analítica, bioquímica, medicina, biotecnología, ciencias forenses, entre otras; cuyos resultados han contribuido a la optimización de una amplia gama de sistemas de detección y dispositivos de análisis ideales para una gran variedad de aplicaciones en el campo de la biomedicina y la industria farmacéutica (Le Ru y Etchegoin, 2009).

Hasta el momento se han reportado muy pocas publicaciones con respecto a la identificación y el análisis de sildenafil usando el método SERS. Uno de los primeros trabajos más completos acerca de esto fue realizado en el año 2017 por un grupo de investigadores del Instituto Tecnológico de Harbin en China. En este trabajo, se desarrolló un procedimiento rápido y sencillo basado en el método SERS para la determinación de sildenafil en líquidos nutraceúticos utilizando un sustrato coloidal de nanopartículas de plata (AgNPs) enriquecido con una sal mineral de yoduro de potasio (KI). Durante este estudio, primero se llevó a cabo la asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales obtenidas en el espectro Raman y SERS del sildenafil usando los resultados generados del cálculo de las frecuencias vibracionales de la molécula del sildenafil en fase gaseosa mediante el método computacional B3LYP y el conjunto de base 6-31G (d,p). Posteriormente, se realizaron un conjunto de experimentos preliminares para evaluar la

sensibilidad y reproducibilidad del método SERS en el análisis de sildenafil. Para ello, se utilizó una serie de soluciones acuosas de sildenafil con concentraciones entre 10 y $1\mu\text{g/mL}$, cuyos resultados permitieron evidenciar un límite de detección de $1\mu\text{g/mL}$ y una desviación estándar media en la repetibilidad del método de 3,77%. Este mismo procedimiento fue utilizado para determinar la presencia de sildenafil en un líquido nutracéutico (Shengwujian Oral liquid) contaminado con $1\mu\text{g/mL}$ de este fármaco, logrando detectar la señal Raman característica del sildenafil ubicada a 1233 cm^{-1} , demostrando así el gran potencial del método SERS para la detección in situ y en tiempo real de sildenafil en líquidos nutracéuticos (Hang et al., 2017).

Para el año 2019, Lin y un grupo de investigadores chinos evaluaron el desempeño del método SERS para la determinación de sildenafil en bebidas alcohólicas utilizando una suspensión coloidal de nanopartículas de oro (AuNPs), conocida como Opto Trace Raman 202 (OTR 202). Este método fue evaluado y aplicado a 11 muestras de un cóctel enriquecido con sildenafil en un rango de concentraciones de 10 a $0,1\text{mg/L}$. Los resultados obtenidos del análisis permitieron evidenciar una excelente correlación lineal entre las intensidades de los picos característicos del sildenafil (1235 , 1401 , 1530 y 1584 cm^{-1}) y su concentración, logrando obtener un coeficiente de determinación (R^2) promedio de 0,9845 y un límite de detección de $0,1\text{mg/L}$. En general, el método SERS con mejora de OTR 202 mostró ser una herramienta analítica rápida, precisa y sensible para la determinación cuantitativa de sildenafil en cócteles, demostrando a su vez un gran potencial para la detección de sildenafil en otro tipo de bebidas alcohólicas (Lin et al., 2019).

3. Marco teórico

3.1 Sildenafil (Viagra)

El sildenafil, también conocido comercialmente como Viagra (citrato de sildenafil), es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la disfunción eréctil (ED). La disfunción eréctil es un trastorno sexual masculino que se define como la incapacidad de alcanzar y/o mantener una erección del pene suficientemente rígida para llevar a cabo una relación sexual satisfactoria (McCabe et al., 2016). Las causas de este trastorno suelen atribuirse a problemas neurológicos, factores psicológicos y en la mayoría de los casos enfermedades cardiovasculares. Diversas investigaciones han evidenciado una estrecha relación entre la disfunción eréctil y problemas de salud como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, la obesidad, la depresión, la ansiedad, entre otros (Goldstein et al., 2018).

La erección es un proceso neurovascular complejo que se describe mediante una serie de etapas coordinadas. La primera etapa de la erección consiste en la estimulación sexual, la cual puede ser provocada por factores físicos y/o psicológicos. Esta estimulación provoca la activación del sistema nervioso central y produce impulsos eléctricos en el cerebro que viajan a través de la médula espinal hacia los nervios cavernosos del pene para promover la liberación de neurotransmisores de óxido nítrico (NO) en los cuerpos cavernosos. El óxido nítrico activa la enzima guanilato ciclasa que cataliza la producción de guanosín monofosfato cíclico (cGMP), una molécula encargada de la regulación del flujo sanguíneo hacia los cuerpos cavernosos del pene. El aumento de la concentración de cGMP produce la vasodilación de las arterias internas del pene mediante la relajación del músculo liso, lo que provoca un aumento del flujo sanguíneo hacia los

cuerpos cavernosos que hace que el tejido eréctil del pene se expanda y comprima las arterias internas encargadas del drenaje de la sangre, lo que facilita la acumulación de sangre en los cuerpos cavernosos y permite no solo alcanzar sino también mantener la erección. Finalmente, cuando ocurre la eyaculación o la estimulación sexual disminuye, los niveles de cGMP descienden debido a la acción de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), encargada de catalizar la reacción de descomposición del cGMP. La disminución de la concentración de cGMP en el cuerpo cavernoso genera la contracción del músculo liso de las arterias, lo que reduce el flujo de entrada de sangre y aumenta el flujo de salida, provocando que el pene regrese a su estado normal (Li et al., 2010).

Los primeros tratamientos para la disfunción eréctil fueron introducidos en la década de 1970, los cuales consistían principalmente en asesoramientos psicológicos y procedimientos quirúrgicos como implantes de pene, revascularización del pene, prótesis de silicona y dispositivos de constricción por vacío. Posteriormente, en el año 1983, el Dr. Giles Brindley desarrolló un método novedoso basado en inyecciones intracarvenosas de compuestos farmacológicos que provocaban la erección del pene mediante la relajación del músculo liso de las arterias, tales como la fenoxibenzamina, la timoxamina, el verapamilo, la papaverina, entre otros (Goldstein, 2012). Este gran avance fue considerado el punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos médicos más seguros, eficaces y accesibles para el tratamiento de la disfunción eréctil. Años más tarde, en 1989, el grupo de investigación y desarrollo cardiovascular de empresa farmacéutica Pfizer, reportó el descubrimiento de un fármaco vasodilatador que inhibía selectivamente la enzima PDE5. Este compuesto fue llamado inicialmente UK-92,480 y tiempo después sería conocido como citrato de sildenafil. En principio, el objetivo inicial de los investigadores estaba centrado en la creación de un tratamiento para la angina de pecho que produjese la vasodilatación

de las arterias coronarias mediante la inhibición de la enzima PDE5. Sin embargo, los resultados de las pruebas preclínicas realizadas a pacientes masculinos con dosis controladas de sildenafil, mostraron un efecto clínicamente despreciable sobre el problema de la angina. No obstante, algunos de los pacientes que recibieron dosis de 50 y 75mg, informaron haber experimentado erecciones espontáneas como efecto secundario (Goldstein et al., 2018). Este descubrimiento inesperado marcaría el inicio de una nueva era en el campo de la medicina sexual, que conduciría al desarrollo del primer tratamiento oral, seguro y efectivo contra la disfunción eréctil.

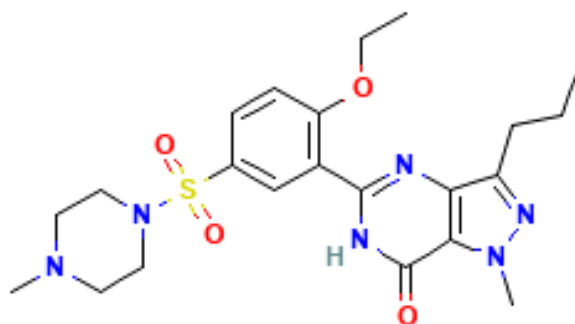
Para que el sildenafil fuese aprobado legalmente, se requirieron alrededor de ocho años de investigaciones y una gran cantidad de pruebas y estudios clínicos que permitieron respaldar y garantizar la efectividad y seguridad del fármaco. De este modo, en el año 1998, tanto la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE.UU. como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), autorizaron el uso y la comercialización del sildenafil (Viagra) como tratamiento oral para la disfunción eréctil (Goldstein et al., 2018). La aceptación del Viagra en la sociedad fue un proceso progresivo que necesito de grandes esfuerzos de investigación académica y profesional para concientizar a los médicos y pacientes sobre este problema de salud pública. Las preocupaciones iniciales que existían por los supuestos efectos secundarios cardiovasculares fueron desapareciendo con el tiempo a causa de la extensa evidencia recolectada en múltiples estudios clínicos que desvinculan la relación del consumo de sildenafil con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Pese a ello, actualmente los médicos no recomiendan que aquellos pacientes con antecedentes cardiovasculares utilicen sildenafil debido al potencial riesgo de interacción con los fármacos usados para el tratamiento de estas enfermedades, los cuales en su mayoría están compuestos de donantes de óxido nítrico o nitratos que al reaccionar con sildenafil

pueden provocar efectos adversos sobre la salud (Goldstein et al., 2018).

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el sildenafil se describe químicamente como 1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etoxifenil]sulfonil]-4-metilpiperazina y presenta la siguiente estructura química:

Figura 1

Estructura del sildenafil $C_{22}H_{30}N_6O_4S$.



Nota. Adaptado de National Center for Biotechnology Information, 2024.

La estructura del sildenafil contiene varios grupos funcionales importantes, dentro de los cuales se destacan: un sistema de dos anillos fusionados denominado pirazolopirimidinona, un anillo de piperazina, un grupo sulfonilo ($-SO_2-$) y un grupo 4-etoxifenilo (Castillo, 2024). Este fármaco provoca la inhibición selectiva de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) para promover el aumento de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) en los cuerpos cavernosos del pene, lo que produce la vasodilación de las arterias internas e incrementa el flujo sanguíneo hacia los cuerpos cavernosos, logrando así alcanzar y mantener la erección (Goldstein et al., 2018). A diferencia de otros tratamientos para la disfunción eréctil, el sildenafil solo es efectivo con una previa estimulación sexual que promueva la liberación de NO en los cuerpos cavernosos. Este

medicamento es comercializado usualmente en tabletas de color azul en forma de diamante con concentraciones de 25, 50 y 100mg. Los efectos secundarios más comunes por el uso de sildenafil son cefalea, sofocos, alteraciones visuales, congestión nasal, mialgia, náuseas, enrojecimiento facial, mareos, entre otros (U.S. Food and Drug Administration, 2017). En la mayoría de países, este medicamento solo puede ser adquirido con la autorización de un profesional mediante una prescripción médica, dado que el consumo inapropiado y no regulado puede poner en riesgo la salud de los consumidores. Durante la última década, se ha reportado un gran incremento en la producción y comercialización ilegal de sildenafil en diversos productos farmacéuticos y suplementarios que incumplen con los estándares de calidad y seguridad establecidos por las instituciones de control. En el año 2017, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), informó el hallazgo de diversos productos fraudulentos promocionados como potenciadores sexuales naturales, los cuales no contaban con el respectivo registro sanitario Invima y, además, contenían sustancias no declaradas en su etiqueta como sildenafil y tadalafil. La comercialización de este tipo de productos en Colombia es ilegal, y por esta razón, el INVIMA publica frecuentemente informes de seguridad y alertas sanitarias con el objetivo de advertir a la comunidad sobre los peligros y riesgos a la salud asociados al consumo de estos productos (INVIMA, 2017).

3.2 Espectroscopía Raman

La Espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica usada en química analítica para estudiar la estructura vibracional de las moléculas mediante el análisis de la radiación dispersada. Esta técnica permite determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de un analito en una muestra a partir de la identificación de los patrones de dispersión característicos en un espectro,

conocidos como huellas dactilares. La espectroscopía Raman se basa en el fenómeno de dispersión inelástica de luz, más conocido como dispersión Raman. Este fenómeno fue propuesto inicialmente en el año 1923 por A. Smekal y fue observado por primera vez en un laboratorio por C.V. Raman y K.S. Krishnan en 1928 (Smith y Dent, 2019).

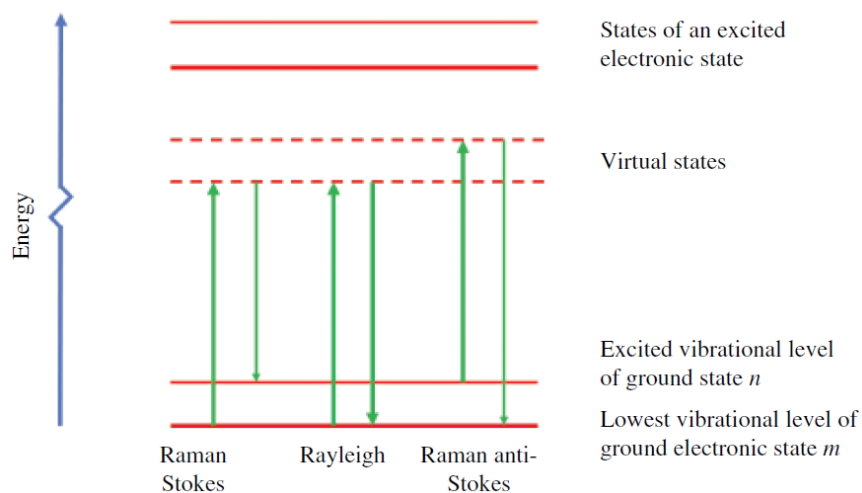
Durante el proceso de dispersión de la luz, los fotones interactúan con la molécula provocando la polarización de la nube de electrones alrededor de los núcleos que crea un estado inestable, denominado estado virtual. En este estado, la molécula perdura un lapso de tiempo muy corto y el fotón incidente vuelve a irradiarse rápidamente mediante dos tipos de dispersión: dispersión elástica y dispersión inelástica. La dispersión elástica, más conocida como dispersión de Rayleigh, se produce cuando la nube de electrones polarizada regresa a su posición inicial y los fotones se dispersan con la misma frecuencia de los fotones incidentes. La dispersión de Rayleigh es el tipo de dispersión más común y dominante, sin embargo, esta no proporciona información acerca de la estructura vibracional de las moléculas. Por otro lado, en la dispersión inelástica o dispersión Raman, los fotones son dispersados con una frecuencia diferente a la frecuencia de los fotones incidentes. Esto sucede debido a que durante el proceso de dispersión no solo se polariza la nube de electrones, sino que también se produce un movimiento nuclear que provoca la transferencia de energía del fotón incidente a la molécula o de la molécula al fotón dispersado. Esta diferencia de energía entre el fotón incidente y el fotón dispersado, conocida como corrimiento Raman, es la que nos brinda información sobre los estados vibracionales de las moléculas. En general, la dispersión Raman es un proceso inherentemente débil en comparación con la dispersión Rayleigh, debido a que solo 1 de cada 10^6 - 10^8 fotones que se dispersan son dispersados de manera inelástica, y por esta razón, la espectroscopía Raman suele considerarse

una técnica de baja sensibilidad y limitada capacidad de detección (Smith y Dent, 2019).

De acuerdo con la forma en la que ocurre la transferencia de la energía entre la molécula y el fotón, la dispersión Raman se divide en dos tipos: Raman Stokes y Raman anti-Stokes. La dispersión Stokes se produce cuando la energía se transfiere del fotón incidente a la molécula, por lo que el fotón dispersado presenta una menor energía con respecto a la energía del fotón incidente. Por otra parte, en la dispersión anti-Stokes la molécula transfiere la energía al fotón dispersado, y, por lo tanto, el fotón dispersado tiene una mayor energía con respecto al fotón incidente. La figura 2 ilustra un diagrama de energía que describe los procesos de dispersión Rayleigh y Raman, donde “ m ” es el nivel vibracional más bajo del estado electrónico fundamental y “ n ” es un nivel vibracional excitado del estado fundamental (Smith y Dent, 2019).

Figura 2

Diagrama de los procesos de dispersión Rayleigh y Raman.



Nota. Adaptado de Smith, E., y Dent, G. (2019).

En la dispersión Stokes, las moléculas que encuentran en el estado vibracional fundamental

m pueden absorber energía del fotón incidente para ser transferidas a un estado vibracional excitado de mayor energía n . En cambio, en la dispersión anti-Stokes, debido a la energía térmica algunas moléculas pueden encontrarse inicialmente en un estado vibracional excitado n y transferir parte de su energía al fotón dispersado para ser promovidas al estado fundamental de menor energía m . Por lo general, la dispersión Stokes es un proceso más dominante en comparación con la dispersión anti-Stokes debido a que a temperatura ambiente la mayoría de las moléculas se encuentran en el estado fundamental m . No obstante, según la ecuación de Boltzmann, el aumento de la temperatura del sistema provoca un incremento de la población de las moléculas en los estados excitados, de modo que la probabilidad de que ocurra la dispersión anti-Stokes también aumenta.

Al igual que la espectroscopía Raman, la espectroscopía infrarroja (IR) es una técnica que proporciona información acerca de la estructura vibracional de las moléculas. Sin embargo, la principal diferencia entre ambas técnicas radica en el fenómeno físico implicado y en la fuente de radiación utilizada para provocar la transición vibracional. Por un lado, la espectroscopía infrarroja se basa en el fenómeno de absorción de la luz y emplea una fuente de luz infrarroja en un rango de frecuencias específico para producir la transición directa desde el estado fundamental a los diferentes estados vibracionales excitados. Para ello, es necesario que la energía de los fotones incidentes coincida con la diferencia de energía entre el estado fundamental y los estados excitados. Por el contrario, la espectroscopía Raman se fundamenta en el fenómeno de dispersión de la luz y utiliza una fuente de radiación monocromática, generalmente un láser, para promover la transición vibracional de manera indirecta mediante los procesos de dispersión Stokes y anti-Stokes. En este caso, la energía de los estados vibracionales se determina como la diferencia de

energía entre el fotón incidente y el fotón dispersado. Por lo tanto, a diferencia de la espectroscopia infrarroja, en la espectroscopia Raman no es necesario que los fotones incidentes coincidan con la diferencia de energía entre el estado fundamental y los estados vibracionales excitados (Smith y Dent, 2019).

La espectroscopía IR y Raman suelen ser consideradas técnicas complementarias ya que al utilizarlas de manera conjunta permiten caracterizar de manera completa y detallada todos los modos vibracionales de una molécula, tanto vibraciones simétricas como asimétricas. Los modos vibracionales son las diferentes formas en las que los átomos de una molécula pueden vibrar. El número total de modos vibracionales de una molécula depende directamente del número de átomos N y los grados de libertad vibracionales. Para las moléculas no lineales el número total de grados de libertad vibracionales, y, por lo tanto, el número de modos vibracionales es igual a $3N - 6$, mientras que para las moléculas lineales es $3N - 5$. Los modos vibracionales pueden dividirse en dos tipos: vibraciones de tensión y vibraciones de flexión. En primer lugar, las vibraciones de tensión se caracterizan por un alargamiento y acortamiento de distancia interatómica del enlace entre dos átomos. Existen dos modos vibracionales de tensión: estiramiento simétrico (ν_s) y estiramiento asimétrico (ν_{as}). Por otra parte, las vibraciones de flexión son aquellas vibraciones que implican un cambio en el ángulo formado entre dos enlaces. En este caso, existen cuatro modos vibracionales de flexión: tijereteo (s), balanceo (ρ), aleteo (ω) y de torsión (τ), los cuales se diferencian entre sí por la dirección y simetría del movimiento vibratorio. Los modos de tijereteo y balanceo ocurren en el mismo plano que contiene los átomos implicados en la vibración, en cambio los modos de aleteo y de torsión tienen lugar fuera del plano. Así mismo, los modos de tijereteo y aleteo presentan movimiento simétrico, mientras que los modos de balanceo y de torsión

exhiben un movimiento asimétrico.

Comúnmente, cuando se comparan los espectros IR y Raman de una molécula suelen observarse patrones muy diferentes debido a que no todos los modos de vibración presentan la misma sensibilidad a cada una de las técnicas. En algunos casos, puede ser que un modo vibracional sea más intenso y activo en el espectro IR que en el espectro Raman, o viceversa, aunque también es posible que sea activo en ambos espectros. La actividad de un modo vibracional depende principalmente de la naturaleza y simetría de la vibración. Existe una regla básica para diferenciar la actividad de un modo vibracional basada en los cambios del momento dipolar y la polarizabilidad de la molécula. Por un lado, los modos vibracionales que producen un cambio en el momento dipolar de la molécula suelen ser más activos en IR, mientras que aquellos que provocan un cambio en la polarizabilidad son más activos en Raman. Por lo general, las vibraciones asimétricas inducen cambios en el momento dipolar, y, por lo tanto, suelen ser más intensas en IR. En cambio, las vibraciones simétricas tienden a producir cambios en la polarizabilidad, y, por ende, son más activas en Raman (Smith y Dent, 2019).

3.2.1 Espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie (SERS)

Durante las últimas décadas, los investigadores han desarrollado una gran variedad de métodos enfocados en mejorar la sensibilidad y selectividad de la espectroscopía Raman. Uno de los métodos más destacados y utilizados es la espectroscopía Raman Amplificada por Efecto de Superficie, más conocido por sus siglas en inglés, como SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el SERS es un fenómeno que provoca un incremento en la intensidad de las señales de dispersión

Raman de moléculas que se encuentran a distancias nanométricas de un sustrato metálico, como por ejemplo una superficie rugosa, una suspensión coloidal y/o una solución de nanopartículas. Por lo general, esta técnica utiliza una superficie metálica rugosa, normalmente de oro (Au) o plata (Ag), sobre la cual se deposita la muestra de interés para así mejorar significativamente la intensidad de las señales Raman en varios ordenes de magnitud, que pueden variar desde 10^6 a 10^{15} (Smith y Dent, 2019).

Este fenómeno fue observado por primera vez en el año 1974 por Martin Fleischman, Patrick J. Hendra y A. James McQuillan, mientras estudiaban reacciones de oxidación-reducción de la piridina con un electrodo de plata rugoso. En sus investigaciones reportaron un fuerte incremento en la intensidad de las señales Raman de la piridina adsorbida al electrodo, obteniendo factores de mejora incluso del orden de 10^6 . En principio, los investigadores consideraban que este efecto se debía principalmente a que la rugosidad del electrodo producía un aumento de su área superficial, y, por lo tanto, permitía la adsorción de más moléculas de piridina sobre su superficie, lo que causaba una mayor intensidad de la dispersión Raman. Sin embargo, investigaciones posteriores evidenciaron que el factor de mejora asociado a la rugosidad del electrodo era menor que un factor de 10^1 , por lo que se dedujo que el incremento de la dispersión Raman se debía a algo más que al aumento del área superficial (Smith y Dent, 2019).

Desde el descubrimiento de este fenómeno, los científicos han propuesto una gran variedad de teorías para tratar de explicar el efecto de mejora del SERS. En la actualidad, aún persiste el debate acerca del principio básico que causa este efecto, por lo que su explicación continúa siendo un campo de investigación activo. Sin embargo, existe un consenso alrededor de dos teorías

diferentes que explican el efecto de mejora de manera lógica y razonable, las cuales están respaldadas por una extensa cantidad de estudios e investigaciones científicas. Una de estas teorías está sustentada en la teoría electromagnética, mientras que la otra se fundamenta en la teoría química. Por un lado, la teoría electromagnética establece que el efecto SERS es provocado por la interacción de las moléculas del analito con las oscilaciones colectivas de los electrones en la superficie del metal, denominadas plasmones de superficie. En esta teoría, la radiación electromagnética interactúa con los electrones libres de la superficie metal para inducir la excitación de los plasmones de superficie. Para ello, es necesario que la frecuencia del láser incidente coincida con la frecuencia de oscilación del plasmón, es decir, que ocurra el fenómeno de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR). De este modo, la excitación de los plasmones genera un extremado incremento del campo eléctrico local en ciertos puntos o regiones de la superficie, más conocidos como puntos calientes, los cuales se forman en los espacios entre las partículas muy próximas entre sí. Como resultado, las moléculas que se encuentran adsorbidas o cercanas a la superficie experimentan campos eléctricos intensos que producen la polarización de su nube de electrones, y, en consecuencia, exhiben una mayor dispersión Raman (Smith y Dent, 2019).

Por otra parte, la teoría química plantea que el aumento de la dispersión Raman es provocado por la formación de un enlace químico entre el analito y la superficie metálica. En este caso, las moléculas del analito crean un complejo superficial con los átomos del metal que genera un cambio en la polarizabilidad de las moléculas en la superficie, dando como resultado una amplificación de las señales Raman. La naturaleza y la intensidad del enlace químico formado depende directamente del analito y de la superficie utilizada, por lo que el factor de mejora química

es diferente para cada tipo de sustancia. El principio básico que fundamenta el mecanismo de mejora química consiste en un proceso de transferencia de carga entre el analito y el metal. Cuando el analito se adsorbe sobre la superficie se produce una interacción entre el nivel de energía de Fermi del metal y los niveles de energía HOMO y LUMO del analito que promueve la transición de electrones y facilita la transferencia de carga a través de ellos. Esta transferencia de carga modifica la distribución de los electrones en la superficie y provoca un cambio en la polarizabilidad de las moléculas, lo que genera el incremento de la dispersión Raman. Dependiendo de los niveles de energía y el potencial del electrodo, la transferencia de carga puede ocurrir tanto del metal al analito como del analito al metal, promoviendo de igual manera el cambio de la polarizabilidad y la amplificación de las señales Raman. Aunque el mecanismo de mejora química contribuye significativamente al incremento de la dispersión Raman, diversos estudios han demostrado que la mejora electromagnética es el mecanismo predominante durante el proceso de mejora del SERS (Smith y Dent, 2019).

Durante los últimos años, el método SERS se ha destacado como una herramienta analítica atractiva y prometedora para el análisis y detección de una extensa variedad de moléculas debido a su excelente capacidad para determinar selectivamente pequeñas cantidades de un analito en una muestra compleja con un alto nivel de sensibilidad y precisión. No obstante, este método presenta diversas limitaciones a nivel práctico que pueden afectar el desempeño de los experimentos, y, por consiguiente, empeorar la calidad de los resultados. Uno de los principales desafíos es el complejo control de las variables del sistema en los experimentos, las cuales deben mantener estables para evitar reducir notablemente la reproducibilidad y precisión de la técnica. Por lo tanto, para garantizar un rendimiento eficiente no solo es necesario seleccionar una superficie adecuadamente

rugosa de un metal apropiado, sino también asegurar que el analito se adsorba de manera efectiva sobre la superficie del metal (Smith y Dent, 2019). De esta manera, es posible disminuir la variación de los resultados y obtener datos más precisos, sensibles y reproducibles. Esta técnica ha sido aplicada de forma exitosa en diversas áreas de ciencia como la química analítica, bioquímica, medicina, biotecnología, ciencias forenses, entre otras. Una de las aplicaciones más comunes es el análisis de trazas de sustancias químicas como medicamentos, drogas, explosivos, colorantes y fluidos biológicos. Estos análisis incluyen una serie de procedimientos útiles para detectar, identificar y cuantificar de forma precisa la presencia de este grupo de sustancias en distintos tipos de matrices (Le Ru y Etchegoin, 2009).

3.3 Teoría funcional de la densidad (DFT)

La teoría funcional de la densidad (DFT) es un enfoque computacional utilizado en física, química y ciencia de los materiales para estudiar la estructura electrónica de la materia. Los métodos de estructura electrónica son una herramienta útil para el experimento, debido a que proporcionan información esencial para la comprensión y predicción de las propiedades y la reactividad química de sistemas de muchos electrones. Esta teoría permite determinar propiedades elementales como la estructura electrónica, orbitales moleculares, energías de ionización, frecuencias vibracionales, interacciones intermoleculares, entre otras. La teoría funcional de densidad utiliza una función de densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ como variable básica, en lugar de la compleja función de onda de muchos electrones $\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N)$ y la ecuación de Schrödinger asociada ($\hat{H}\Psi = E\Psi$). Esto permite simplificar en gran medida el problema electrónico de muchos cuerpos, dado que la densidad electrónica depende solo de 3 variables espaciales (x,y,z), mientras que la función de onda depende de $3N$ variables espaciales, donde “N” es el número total de

electrones del sistema (Orio et al., 2009). La densidad electrónica $p(r)$ de un estado dado se define como el número de electrones por unidad de volumen y se representan en función de Ψ como:

$$p(r) = N \int \dots \int |\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N)|^2 dx_1, dx_2, \dots, dx_N \quad (1)$$

Donde el número total de electrones en un átomo “N”, puede obtenerse integrando la densidad electrónica,

$$N = N[p(r)] = \int p(r) dr \quad (2)$$

Utilizando esta teoría es posible determinar todas las propiedades electrónicas del estado fundamental de un sistema de átomos o moléculas, a través de funcionales que dependen de la densidad electrónica. Las primeras ideas acerca de la existencia de estos funcionales se originaron a finales de la década de 1920, con los modelos estadísticos de Thomas y Fermi. Sin embargo, fue en el año 1964, cuando Hohenberg y Kohn (HK) establecieron dos teoremas fundamentales para dar inicio al desarrollo de lo que hoy en día se conoce como la teoría funcional de la densidad (Hohenberg & Kohn, 1964). El primer teorema de HK establece que la densidad electrónica $p(r)$, determina el potencial externo $v(r)$, y, por lo tanto, también determina el hamiltoniano y la función de onda electrónica del estado fundamental, lo que permite calcular todas las propiedades del sistema como la energía cinética $T(p)$, la energía potencial $V(p)$ y la energía total $E(p)$. De este modo, la energía total E_v puede expresarse en función de la densidad electrónica, como:

$$E_v[p] = T[p] + V_{ne}[p] + V_{ee}[p] \quad (3)$$

$$= \int p(r) v(r) dr + F_{HK}[p] \quad (4)$$

Donde $F_{HK}[p]$ es el funcional universal de Hohenberg-Kohn (independiente del potencial externo) que contiene las contribuciones de la energía cinética $T[p]$, la energía de repulsión electrón-electrón $J[p]$ y la energía de intercambio y correlación electrónica $E_{xc}[p]$.

$$F_{HK}[p] = T[p] + V_{ee}[p] = T[p] + J[p] + E_{xc}[p] \quad (5)$$

Por otro lado, el segundo teorema de HK es una reformulación del principio variacional para la energía del estado fundamental en términos de la densidad electrónica. Este teorema establece que para una densidad de prueba $\tilde{p}(r)$, tal que $\tilde{p}(r) \geq 0$ y $\int \tilde{p}(r) dr = N$, se cumple que,

$$E_0 \leq E_v[\tilde{p}] \quad (6)$$

Donde E_0 es la energía exacta del estado fundamental y $E_v[\tilde{p}]$ es la energía calculada con la densidad de prueba $\tilde{p}(r)$ en el funcional de la energía total. De modo que, la densidad electrónica del estado fundamental $p_0(r)$ es aquella que minimiza el funcional de la energía total $E_v[p]$, y, por lo tanto, satisface la ecuación de Euler-Lagrange (principio estacionario):

$$\mu = \frac{\delta E_v[p]}{\delta p(r)} = v(r) + \frac{\delta F_{HK}[p]}{\delta p(r)} \quad (7)$$

Donde μ es un multiplicador de Lagrange denominado potencial químico. Esta expresión es considerada una ecuación análoga a la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo, con la cual es posible determinar la estructura electrónica de un sistema de muchos electrones (Parr y Yang, 1994). Una de las contribuciones más importantes al problema variacional de minimizar la energía del funcional $E_v[p]$, fue el desarrollo de ecuaciones de Kohn-Sham (KS) en 1965. Estas ecuaciones son similares a las ecuaciones clásicas Hartree-Fock (HF), sin embargo, KS consideran tanto efectos de intercambio como de correlación electrónica. Las ecuaciones de KS permiten simplificar el problema de describir el movimiento de muchos electrones que interactúan bajo un potencial externo estático $v(r)$, al considerar un sistema de electrones que no interactúan y se mueven en un potencial efectivo v_{eff} . De este modo, el gran problema de describir la estructura electrónica de un sistema de N electrones se reduce a solucionar un conjunto de N ecuaciones de un solo electrón.

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{eff} \right] \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (8)$$

Donde φ_i son las N-funciones de onda del hamiltoniano de un electrón $\hat{h}_s$, con las que se construye el determinante de la función de onda del estado fundamental Ψ_0 . Por otra parte, el término v_{eff} es el potencial efectivo que incluye las contribuciones del potencial externo, las interacciones electrón-electrón y los efectos de intercambio y correlación electrónica.

$$v_{eff}(r) = v(r) + \frac{\delta J[p]}{\delta p(r)} + \frac{\delta E_{xc}[p]}{\delta p(r)} \quad (9)$$

$$= v(r) + \int \frac{p(r')}{|r-r'|} dr' + V_{xc}(r) \quad (10)$$

En donde la densidad electrónica total $p(r)$ se define en términos de N orbitales φ_i , como:

$$p(r) = \sum_i^N \sum_s |\varphi_i(r, s)|^2 \quad (11)$$

Las ecuaciones de KS son un conjunto de ecuaciones no lineales que deben resolverse de manera autoconsistente, debido a que el v_{eff} depende de la $p(r)$, la cual a su vez depende de las funciones propias φ_i . Para ello, primero se realiza una estimación inicial de la $p(r)$ usando la base seleccionada, luego, se construye el v_{eff} experimentado por los electrones, y, por último, se resuelven las ecuaciones KS para encontrar un conjunto de funciones de un electrón φ_i , con las cuales se calcula una nueva $p(r)$ y se vuelve a repetir el procedimiento hasta alcanzar la convergencia (Parr y Yang, 1994).

A pesar de que las ecuaciones de KS ofrecen una descripción exacta de la energía cinética del sistema $T[p]$, aún existen grandes dificultades para la determinación precisa del funcional de intercambio y correlación electrónica $E_{xc}[p]$. Debido a esto, los investigadores han desarrollado una gran variedad de funcionales de intercambio y correlación alternativos, basados principalmente en la aproximación de densidad local (LDA) y la aproximación de gradiente generalizado (GGA). La LDA es un tipo de aproximación basada en el modelo del gas de electrones uniforme, el cual considera que la densidad electrónica es la misma en todos los puntos

del espacio. De este modo, el funcional de la energía de intercambio y correlación $E_{xc}[p]$ puede expresarse como una función que depende solamente de la densidad electrónica $p(r)$,

$$E_{xc}^{LDA}[p] = \int p(r) \epsilon_{xc}(p) dr \quad (12)$$

Donde ϵ_{xc} es la energía de intercambio y correlación por partícula de un gas de electrones uniforme de densidad $p(r)$. Por otro lado, la GGA es otro tipo de aproximación al funcional $E_{xc}[p]$, la cual, a diferencia de la LDA, considera no solo el valor de la densidad electrónica $p(r)$ en cada punto, sino también el valor de su gradiente $\nabla p(r)$, permitiendo así una mejor descripción de la distribución real (no homogénea) de los electrones en los átomos y las moléculas.

$$E_{xc}^{GGA}[p] = \int f(p(r), \nabla p(r)) dr \quad (13)$$

La incorporación de estas aproximaciones ha contribuido al desarrollo de una gran cantidad de enfoques más elaborados y precisos, como los funcionales híbridos o funcionales meta-GGA. Actualmente, se dispone de una amplia variedad de aproximaciones que han servido de referencia para el desarrollo de métodos más precisos, como los funcionales PBE, B97, BLYP, BP89, TPSS, entre otros. Estudios han demostrado que los funcionales GGA presentan un rendimiento razonable en la determinación de geometrías en equilibrio, energías totales y frecuencias vibracionales para una amplia variedad de sistemas químicos de tamaño medio (≈ 100 -200 átomos). Sin embargo, a pesar de su buen desempeño, aún se requiere el desarrollo de nuevos funcionales que permitan la descripción exacta de los efectos de intercambio y correlación, así como el tratamiento de las

interacciones intermoleculares e intramoleculares y las limitaciones asociadas a las bases utilizadas en los cálculos SCF (Orio et al., 2009).

4. Metodología

4.1 Etapa 1: Determinación de espectros Raman y SERS del sildenafil

4.1.1 Análisis estructural de la geometría optimizada del sildenafil mediante DFT

En primer lugar, para la simulación de los espectros Raman y SERS teóricos, primero se llevó a cabo la optimización de la geometría de la molécula del SDF en fase gaseosa utilizando la DFT con el funcional B3LYP y el conjunto de base estándar 6-31G(d). Posteriormente, mediante el uso del programa GaussView 6.0 (Dennington et al., 2019), se midieron diferentes parámetros estructurales de la geometría optimizada del SDF, tales como las distancias de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros, y los resultados se compararon con los datos experimentales reportados en la literatura obtenidos mediante difracción de rayos X (Barbas et al., 2018). Luego, empleando el software de modelamiento molecular VMD (**V**isual **M**olecular **D**ynamics) (Humphrey et al., 1996), se construyó un mapa de potencial electrostático molecular (MEP) de la estructura optimizada del SDF para identificar los sitios de interacción más probables de la molécula con la superficie metálica.

4.1.2 Simulación de espectros teóricos Raman y SERS del sildenafil

Ahora bien, a partir de la estructura optimizada, primero se procedió a calcular el espectro Raman del SDF mediante el cálculo de las frecuencias vibracionales utilizando el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-31G(d). Posteriormente, para la simulación del espectro SERS del SDF, se construyeron dos complejos molécula – clúster usando clústeres de oro de diferente

tamaño (SDF-Au₆ y SDF-Au₁₀) con el fin de simular la interacción del SDF con la superficie de nanopilares de oro (AuNPs). Para ello, cada clúster (Au₆ y Au₁₀) fue ubicado inicialmente cerca a los diferentes sitios de interacción más probables de la molécula identificados previamente en el MEP, proponiéndose así dos geometrías iniciales para cada posible sitio de interacción de la molécula. Esta estrategia permitió evaluar y predecir las posibles interacciones u orientaciones de la molécula sobre la superficie metálica, y, además, analizar el efecto del tamaño del clúster sobre el rendimiento del método computacional para la simulación de espectros SERS. Luego, se procedió a realizar la optimización de cada uno de los complejos propuestos, y una vez obtenidas las geometrías optimizadas, se calcularon las frecuencias vibracionales utilizando el funcional B3LYP con el conjunto de base mixto 6-31G(d)/Lanl2dz. En este caso, el potencial de núcleo efectivo Lanl2dz fue empleado para los átomos de oro con el fin de incorporar los efectos relativistas asociados a los centros metálicos, mientras que el conjunto de base 6-31G(d) se utilizó para describir los electrones de valencia de los átomos no metálicos presentes en la molécula de SDF. Asimismo, con el objetivo de compensar las desviaciones sistemáticas ocasionados por el método computacional y mejorar la concordancia entre los espectros teóricos y experimentales, todas las frecuencias calculadas fueron corregidas aplicando un factor de escala 0,9896 y 0,9880 para los espectros Raman y SERS, respectivamente. Por último, tanto la optimización de las geometrías como la simulación de los espectros Raman y SERS fueron realizados utilizando de software Gaussian 09 (Frisch et al., 2009)

4.1.3 Adquisición de espectros experimentales Raman y SERS del sildenafil

Posteriormente, se llevó a cabo la adquisición de los espectros experimentales Raman y SERS utilizando una solución stock de sildenafil de 1mg/mL en metanol obtenida de la empresa Sigma-Aldrich Corp. Para ello, tanto el espectro Raman como el espectro SERS se registraron en

un rango espectral de 700 a 2000 cm^{-1} usando un láser con una longitud de onda de excitación de 785 nm. En primer lugar, para la obtención del espectro Raman se depositaron 10 μL de la solución stock sobre una lámina portaobjetos de silicio y después se midió el espectro usando un objetivo de larga distancia de trabajo de 100 x, una potencia láser de 10 mW y un tiempo de acumulación de señal de 20 segundos. Por otra parte, para la adquisición del espectro SERS, primero se depositaron 10 μL de la solución stock sobre una superficie de nanopilares de silicio con recubrimiento oro ($\sim 3 \times 3$ mm cada uno), y luego se dejaron reposar durante 5-10 minutos para homogenizar la superficie y alcanzar el equilibrio de adsorción. Después, el espectro SERS se obtuvo usando un objetivo de larga distancia de trabajo de 50x, una potencia láser de 10 mW y un tiempo de acumulación de señal de 2 segundos.

4.2 Etapa 2: Análisis vibracional de los espectros Raman y SERS del sildenafil

Por otro lado, una vez determinados los espectros experimentales y teóricos del SDF, se llevó a cabo el análisis vibracional y la asignación de modos vibracionales de los espectros Raman y SERS experimentales. Para ello, primero se graficaron los resultados obtenidos del cálculo de las frecuencias vibracionales mediante el programa GaussView 6.0 (Dennington et al., 2016), el cual permitió visualizar gráficamente los modos vibracionales correspondientes a cada una de las señales o frecuencias calculadas en los espectros. Después, a partir de la comparación entre los espectros teóricos y experimentales, se realizó la asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en los espectros Raman y SERS experimentales. Posteriormente, mediante el análisis comparativo entre los espectros SERS de los complejos en cada sitio de interacción, se propuso un posible modelo de interacción o adsorción del SDF sobre la superficie de AuNPs. Y, por último, a partir del modelo de adsorción propuesto, se construyó un MEP del complejo SDF-Au con el fin de visualizar la redistribución electrónica e identificar las posibles

regiones de interacción entre la molécula y la superficie.

4.3 Etapa 3: Evaluación del potencial analítico del método SERS para la detección de sildenafil

Ahora bien, en esta tercera etapa se evaluó el desempeño y el potencial analítico del método SERS para el análisis y detección de sildenafil. Para ello, primero se prepararon cinco soluciones de SDF en un rango de concentraciones de 6 μM a 100 μM a partir de la solución stock, y luego, se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de su uso para evitar su degradación.

Tabla 1

Datos para la preparación de las soluciones de sildenafil a diferentes concentraciones (6 a 100 μM).

# Solución	Concentración de la solución en μM	Concentración de la solución en mg/L
1	6 μM	2,85 mg/L
2	12 μM	5,70 mg/L
3	25 μM	11,87 mg/L
4	50 μM	23,73 mg/L
5	100 μM	47,46 mg/L

Posteriormente, se registraron los espectros SERS de cada una de las soluciones mediante el uso del microscopio de imagen Raman DXRxi de alto rendimiento, suministrado por el Departamento de Micro y Nanotecnología de la Universidad Técnica de Dinamarca durante una pasantía realizada por el Dr. John Jairo Castillo León. En este caso, para la adquisición de los espectros SERS, primero se depositaron 10 μL de cada solución sobre la superficie de nanoestructurada de oro, y luego se dejaron secar y reposar durante 5-10 minutos para homogenizar la superficie. Después, los espectros SERS fueron obtenidos utilizando un objetivo

de trabajo de 10 x, una rendija de 50 μm , una potencia láser de 5 mW y un tiempo de acumulación de la señal de 0.1 segundos, lo que produjo ~ 1000 espectros SERS por cada chip o cada concentración. Luego, se construyó un único espectro SERS para cada concentración de SDF promediando todos los espectros recopilados durante la adquisición de datos. Y finalmente, mediante el análisis de la relación entre la intensidad de las señales características y la concentración de SDF, se identificaron y definieron las señales más apropiadas para el análisis cualitativo y cuantitativo de SDF.

4.4 Etapa 4: Determinación de sildenafil en un multivitamínico mediante SERS

En esta última etapa, para evaluar la aplicabilidad del método SERS en matrices complejas, se llevó a cabo la determinación de SDF en un extracto de un multivitamínico (MV) fortificado. Este tipo de muestra fue seleccionada debido a los múltiples señalamientos relacionados con presuntos casos de falsificación y adulteración ilegal con sildenafil. Para la preparación de la muestra, se pesaron 1,86mg de polvo de la tableta del MV y se disolvieron en 1mL de una mezcla de metanol/agua (1:1, v/v). Después, la mezcla se agitó en un vórtex durante 2 min para asegurar una disolución completa, y luego, se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de jeringa de PTFE de 0,45 μm para eliminar la materia particulada, en donde el filtrado obtenido se empleó como extracto del MV en blanco. Posteriormente, para simular la muestra adulterada se enriqueció el extracto del MV en blanco con una solución de SDF de 25 μM y después se llevó a cabo la adquisición de los espectros SERS de cada una de las muestras (solución de SDF de 25 μM , MV en blanco y MV enriquecido con solución de SDF de 25 μM). En este caso, la obtención de los espectros SERS se llevó a cabo usando la misma metodología y condiciones descritas en la etapa 3. Y por último, se realizó la determinación de SDF en el MV mediante el análisis comparativo de los espectros SERS de cada una de las

muestras, lo que permitió identificar las señales características del SDF y evaluar la selectividad del método SERS para el análisis de SDF en este tipo de matrices.

5. Resultados y discusiones

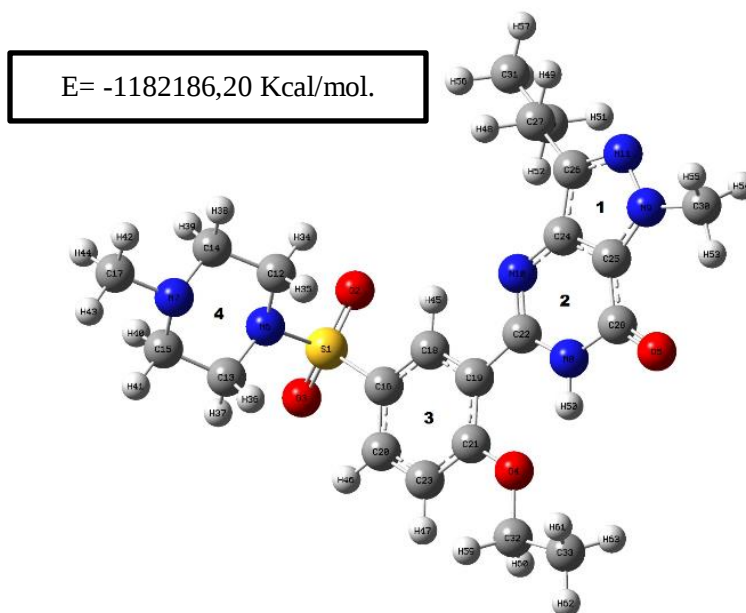
5.1 Determinación de espectros Raman y SERS del sildenafil

5.1.1 *Análisis estructural de la geometría optimizada del sildenafil mediante DFT*

Para la simulación de los espectros Raman y SERS del sildenafil, se utilizó la geometría optimizada de la molécula del sildenafil en fase gaseosa obtenida mediante la DFT en el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). Esta geometría fue seleccionada después de evaluar las estructuras optimizadas y energías relativas de diez conformeros del sildenafil optimizados mediante el mismo nivel de teoría, cuyos resultados se muestran en el apéndice A de este trabajo de investigación. La figura 3 ilustra la geometría optimizada del conformero más estable (de menor energía), cuya energía relativa es igual a -1182186,20 Kcal/mol.

Figura 3

Geometría optimizada de la molécula de sildenafil.



En este caso, para facilitar el análisis estructural de la geometría del sildenafil y la correcta identificación e interpretación de sus modos vibracionales, cada átomo de la molécula se etiquetó con el símbolo de su elemento y un número específico para identificar rápidamente la posición de los diferentes átomos y grupos funcionales en la estructura. Asimismo, la estructura de la molécula se dividió en tres regiones estructurales principales basadas en sus distintos sistemas de anillos y grupos funcionales característicos. La primera región (Anillo 1 y 2) representa la parte central de la molécula responsable de la interacción del sildenafil con la enzima PDE5. Esta región, denominada pirazolopirimidinona, está formada por un sistema de dos anillos fusionados que combina un anillo de pirazol con un anillo de pirimidina que está unido a grupo carbonilo (C=O). La segunda región está conformada por un grupo 4-etoxifenilo (anillo 3) y un grupo sulfonilo (-SO₂-) que influyen aún más sobre la interacción del sildenafil con la enzima PDE5 y mejoran su afinidad de unión y selectividad. Y, por último, la tercera región (anillo 4) consta de un anillo de piperazina, un anillo heterociclo de seis miembros que contiene cuatro átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno en posiciones opuestas.

La geometría optimizada del sildenafil, que se muestra en la figura 3, resultó ser una estructura estable y consistente que corresponde a un mínimo de energía en la superficie de energía potencial, lo cual se confirmó mediante la ausencia de frecuencias imaginarias en los cálculos de las frecuencias vibracionales. Esta geometría fue sometida a un análisis estructural con el objetivo de evaluar el desempeño del método computacional (B3LYP/6-31G(d)) para la optimización de la estructura molecular del sildenafil y el cálculo de sus frecuencias vibracionales para la predicción de sus espectros Raman y SERS. En este análisis se midieron diferentes parámetros geométricos, tales como longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros, los cuales fueron comparados con respecto a los datos experimentales obtenidos en otro estudio mediante difracción de rayos X (Barbas et al., 2018). Las tablas 2, 3 y 4 muestran los resultados obtenidos de las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros de las principales regiones o grupos funcionales de la estructura del sildenafil.

Tabla 2

Longitudes de enlace de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X

Enlace	Longitud de enlace (Å) calculada con DFT	Longitud de enlace (Å) experimental*	Error absoluto (Å)
N ₆ -S ₁	1.68886	1.63431	0.05455
S ₁ =O ₂	1.46351	1.42461	0.03890
S ₁ =O ₃	1.46532	1.43199	0.03333
S ₁ -C ₁₆	1.79773	1.75691	0.04082
C ₂₀ =C ₂₃	1.38983	1.37393	0.01590
C ₂₁ -O ₄	1.36519	1.36107	0.00412
C ₁₉ -C ₂₂	1.49141	1.49045	0.00096
N ₁₀ -C ₂₂	1.30692	1.29329	0.01363
C ₂₈ =O ₅	1.22853	1.22825	0.00028

C24-C25	1.39986	1.37947	0.02039
N11-N9	1.35395	1.36124	0.00729
C26-C27	1.49832	1.49054	0.00778

Nota: *Datos suministrados por el centro de datos cristalográficos de Cambridge (CCDC). **Deposition Number(s):** 1821370

Tabla 3

Ángulos de enlace de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X

Enlace	Ángulo de enlace (°) calculado con DFT	Ángulo de enlace (°) experimental*	Error absoluto (°)
C13-N6-C12	113.19146	111.98459	1.20687
O2=S1=O3	122.27112	120.02584	2.24528
N6-S1-C16	107.13784	106.11850	1.01934
C20-C16-C18	120.46785	119.37998	1.08787
C21-O4-C32	120.54414	119.95614	0.58800
N10-C22-N8	122.25845	122.82598	0.56753
N8-C28-O5	121.31824	120.55540	0.76284
N11-N9-C25	111.14560	111.00220	0.14340
C26-C27-C29	113.20670	120.65262	7.44592

Nota: *Datos suministrados por el centro de datos cristalográficos de Cambridge (CCDC). **Deposition Number(s):** 1821370

Tabla 4

Ángulos diedros de la estructura optimizada del sildenafil y la estructura experimental obtenida mediante difracción de rayos X

Enlace	Ángulo diedro (°) calculado con DFT	Ángulo diedro (°) experimental*	Error absoluto (°)
C12-N6-S1-C16	71.07154	64.41775	6.65379
N6-S1-C16-C20	91.22480	89.67458	1.55022

O2-S1-C16-C18	26.02610	29.60791	3.58181
C21-C19-C22=N10	-177.93190	-179.09705	1.16515
C21-O4-C32-C33	-179.03296	-176.21716	2.8158
N10-C24-C25-N9	-179.92713	-176.68791	3.23922
O5-C28-C25-C24	-179.84908	-176.81707	3.03201
N11-C26-C27-C29	104.94299	-116.53597	221.47896
C26-C27-C29-C31	-179.93618	-164.87350	15.06268

Nota: *Datos suministrados por el centro de datos cristalográficos de Cambridge (CCDC). **Deposition Number(s):** 1821370

En primer lugar, el análisis estructural permitió observar una evidente disposición coplanar en la región conformada por el sistema de anillos pirazolopirimidinona (anillo 1 y 2) y el grupo 4-etoxifenilo (anillo 3), respaldada por la presencia de ángulos diedros en esta región con valores cercanos a -180° (tabla 4). Este alto nivel de coplanaridad y la presencia de sistemas aromáticos conjugados favorecen la deslocalización electrónica a lo largo de dicha región, lo que promueve la reducción de la energía total del sistema y contribuye a la estabilización de la molécula. Por otra parte, el anillo de piperazina (anillo 4) presenta una orientación casi perpendicular con respecto al plano de los anillos 1,2 y 3, en donde el análisis estructural reveló un ángulo diedro o de torsión de aproximadamente 91° entre los átomos N₆- S₁- C₁₆- C₂₀. Esta orientación puede atribuirse en gran parte a efectos de impedimento estérico y a repulsiones de los pares electrónicos provocadas por los átomos de oxígeno del grupo sulfonilo (-SO₂-).

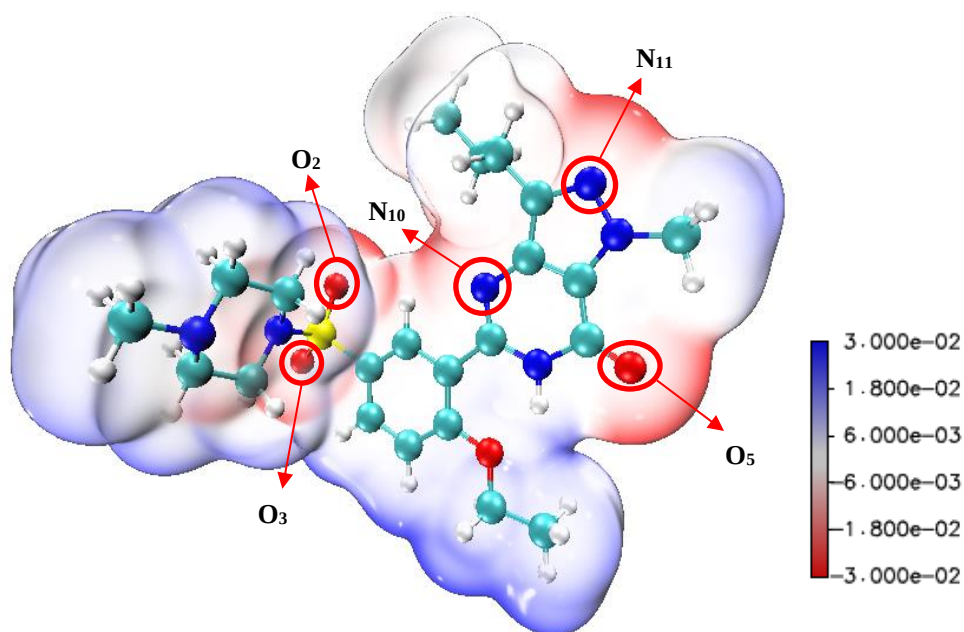
Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos de los ángulos de enlace (tabla 3) vemos que estos muestran un muy buen nivel de concordancia con respecto a los valores experimentales de la estructura cristalina, obteniéndose un error absoluto medio (MAE) de aproximadamente $1,67412^\circ$. Asimismo, también se logra observar que los valores calculados de las longitudes de enlace (tabla 2) presentaron valores relativamente cercanos a los valores reportados en la literatura

con un error absoluto medio de 0,01983Å. No obstante, las mayores desviaciones se presentaron particularmente en los enlaces adyacentes al átomo de azufre N6-S1, S1=O2, S1=O3 y S1-C16, cuyos errores absolutos fueron iguales a 0.05455, 0.03890, 0.03333 y 0.04082Å, respectivamente. Todas estas desviaciones observadas, entre los valores calculados por DFT y los obtenidos experimentalmente, pueden atribuirse principalmente al efecto que tiene el entorno químico de la molécula sobre sus propiedades estructurales y electrónicas. Esto debido a que en el modelado computacional solo se considera a la molécula en fase en gaseosa y en condiciones aisladas a una temperatura de 0K, mientras que en difracción de rayos X la molécula se encuentra en estado sólido a una temperatura mucho mayor ($\approx 100\text{-}298\text{K}$) y su distribución espacial puede verse afectada por diversos factores externos e interacciones intermoleculares que pueden provocar ligeras variaciones en los parámetros geométricos medidos.

Ahora bien, a partir de la estructura optimizada del sildenafil se determinó el mapa de potencial electrostático molecular (MEP), el cual brinda información acerca de la distribución de carga a través de la superficie de la molécula y los posibles sitios de adsorción o interacción de la molécula con la superficie de nanopilares de oro (AuNPs). La figura 4 ilustra el MEP de la molécula de sildenafil en donde las zonas de color rojo y azul indican regiones de alta y baja densidad electrónica, respectivamente.

Figura 4

Mapa de potencial electrostático molecular (MEP) de la molécula de sildenafil



El MEP del sildenafil permitió relevar que las regiones de mayor densidad electrónica (rojas) se localizan específicamente sobre algunos heteroátomos de la estructura como los dos oxígenos (O₂ y O₃) del grupo sulfonilo, el nitrógeno (N₁₀) y el oxígeno (O₅) del anillo de pirimidina (anillo 2) y el nitrógeno (N₁₁) del anillo de pirazol (anillo 1). Todos estos sitios de alta densidad electrónica (rojo) se caracterizan por ser potenciales sitios de interacción y/o adsorción molecular, dado que pueden actuar como especies nucleofílicas para compartir sus electrones y formar nuevos enlaces químicos. Por el contrario, las regiones de baja densidad electrónica (azul) se encuentran principalmente alrededor del anillo de piperazina (anillo 4) y el grupo 4-etoxifenilo (anillo 3), lo que sugiere posibles sitios para las interacciones electrofílicas. El análisis del MEP del sildenafil es una etapa esencial dentro del contexto de la espectroscopía SERS, dado que la información obtenida acerca de los posibles sitios de interacción de la molécula con la superficie de AuNPs nos ayudó a formular las distintas geometrías iniciales que fueron utilizadas como punto de partida para llevar a cabo la simulación de los espectros SERS del sildenafil usando los diferentes modelos de clústeres de oro (Au₆ y Au₁₀).

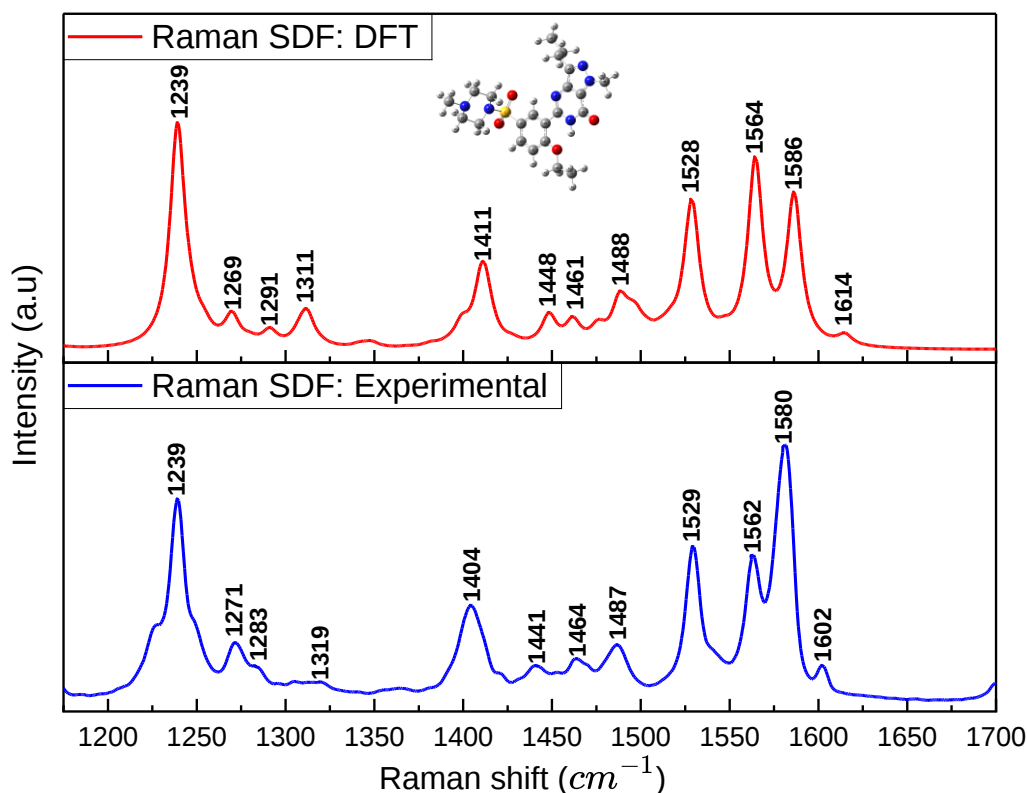
5.2 Análisis vibracional de los espectros Raman y SERS del sildenafil

5.2.1 Comparación del espectro Raman experimental y teórico del sildenafil

Con base a la estructura optimizada del sildenafil, se procedió a calcular el espectro Raman de la molécula empleando el mismo nivel de teoría B3LYP/6-31G(d). La figura 5 ilustra la comparación entre el espectro Raman experimental (línea azul) y el espectro calculado mediante DFT (línea roja), en la región de huella dactilar comprendida en el rango de 1175 a 1700 cm^{-1} . Las frecuencias vibracionales calculadas fueron corregidas aplicando un factor de escala de 0.9896, con el objetivo de compensar las desviaciones sistemáticas asociadas al método armónico y al nivel de teoría empleado. Asimismo, los factores utilizados en este trabajo fueron seleccionados previamente con base en la literatura y luego ajustados mediante el análisis comparativo de las bandas experimentales más intensas.

Figura 5

Espectro Raman experimental de una tableta de sildenafil de 100mg (línea azul) y espectro Raman calculado del sildenafil utilizando el método B3LYP/6-31G(d) (línea roja)



En este caso, el análisis comparativo de los espectros Raman del sildenafil evidenció una excelente concordancia entre los resultados experimentales y teóricos, mostrando un alto grado de similitud en la posición, forma e intensidades relativas de las señales. Asimismo, el análisis espectral también permitió identificar la presencia de cinco de bandas intensas y bien definidas, ubicadas en 1239, 1404, 1529, 1562 y 1580 cm⁻¹, las cuales pueden atribuirse a los principales modos vibracionales y bandas características de la molécula de sildenafil. Estas señales son consistentes con las señales reportadas previamente por Hang et al. (2017) y Lin et al. (2019) en sus estudios sobre la detección de sildenafil en otras matrices mediante SERS, lo que respalda la validez de las señales obtenidas y valida el buen desempeño y fiabilidad del método computacional (B3LYP/6-31G(d)) para la descripción precisa de la estructura vibracional de la molécula de sildenafil.

Una vez comparados los espectros Raman del sildenafil, se llevó a cabo la asignación de los modos vibracionales de las principales señales observadas en el espectro experimental usando como referencia los resultados obtenidos mediante los cálculos DFT. En este estudio, el análisis vibracional del espectro Raman se centró especialmente en las principales señales observadas en el espectro ubicadas en 1239, 1404, 1529, 1562 y 1580 cm^{-1} , mientras que las demás señales solo fueron incluidas y descritas en la tabla 5.

Tabla 5

Asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en el espectro

Raman del sildenafil

Raman Exp (cm^{-1})	Raman DFT (cm^{-1})	Asignación de señal
<u>1239</u>	<u>1239</u>	<u>RA(anillo 3) + δ(N8-H50) de anillo 2 + ν(C19-C22)</u>
1271	1269	ν (N11-N9) de anillo 1 + ω (H55-C30-H54) + τ (H-C-H) del grupo propilo (anillo 1)
1283	1291	δ (C18-H45) del anillo 3 + δ (C23-H47) del anillo 3
1319	1311	DA(anillo 3) + δ(N8-H50) del anillo 2 + δ(C29-H51) del grupo propilo (anillo 1)
<u>1404</u>	<u>1411</u>	<u>DA(anillo 3) + ω(H-C-H) del grupo etilo (anillo 3) + ν(N11-C26) del anillo 1</u>
1441	1448	δ (N8-H50) del anillo 2 + s (H55-C30-H54) + ν (N9-C25) del anillo 1
1464	1461	ω (H-C-H) del grupo metilo (anillo 1) + δ (N8-H50) del anillo 2
1487	1488	δ (C23-H47) del anillo 3 + s (H-C-H) del grupo propilo (anillo 1) + ν (C24-C26)
<u>1529</u>	<u>1528</u>	<u>DA(anillo 1) + δ(N8-H50) del anillo 2 + s(H59-C32-H60) del grupo 4-etoxi</u>
<u>1562</u>	<u>1564</u>	<u>δ(N8-H50) del anillo 2 + ν(N10=C22) del anillo 2 + δ(C20-H46) de anillo 1</u>
<u>1580</u>	<u>1586</u>	<u>DA(anillo 3) + δ(N8-H50) del anillo 2</u>
1602	1614	DA(anillo 3) + δ (N8-H50) del anillo 2

Nota. **RA:** Respiración de anillo; **DA:** Deformación de anillo; **ν :** Vibración de tensión o estiramiento; **ν_s :** Estiramiento simétrico; **ν_{as} :** Estiramiento asimétrico; **δ :** Vibración de flexión; **s :** Tijereteo; **p :** Balanceo; **ω :** Aleteo y **τ :** Torsión.

La región estudiada (1175 a 1700 cm^{-1}) presenta diversas señales características que describen los diferentes modos vibracionales de la molécula del sildenafil. De acuerdo con los

resultados teóricos, cada una de estas señales corresponde a la superposición o el acoplamiento de varios modos de vibración que se expresan de manera simultánea en la molécula, lo que refleja el alto nivel de complejidad de los movimientos atómicos dentro de la molécula. En primer lugar, la banda en 1239 cm^{-1} se atribuye principalmente a una respiración del anillo 3, acompañada de una flexión del enlace N8-H50 situado en el anillo 2 y un estiramiento del enlace C19-C22 que conecta a los anillos 2 y 3. De igual manera, la señal observada a 1404 cm^{-1} se origina de una deformación del anillo 3, una vibración tipo aleteo del enlace H-C-H en el grupo etilo del anillo 3 y un estiramiento del enlace N11-C26 ubicado en el anillo 1. Por otro lado, a frecuencias más altas, la banda localizada en 1529 cm^{-1} se asocia principalmente a una deformación del anillo 1, junto con una flexión del enlace N8-H50 y un modo de tijereteo del enlace H59-C32-H60 presente en el grupo 4-etoxi. Asimismo, la banda ubicada en 1562 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento del enlace N10=C22 localizado en el anillo 2 y la flexión de los enlaces N8-H50 y C20-H46, mientras que la banda más intensa observada en 1580 cm^{-1} corresponde específicamente a la deformación del anillo 3 y la flexión del enlace N8-H50. En este caso, el análisis vibracional del espectro Raman del sildenafil, permitió evidenciar que las bandas más intensas y representativas están dominadas principalmente por vibraciones asociadas a los sistemas aromáticos y enlaces o grupos funcionales adyacentes a los anillos 1,2 y 3. Este resultado es coherente con la estructura electrónica de la molécula, dado que en estas regiones se produce una mayor deslocalización electrónica que permite generar grandes cambios en la polarizabilidad durante las vibraciones moleculares, lo cual favorece el proceso de dispersión Raman, y como resultado, los modos vibracionales asociados a dichas regiones exhiben una mayor intensidad en el espectro.

5.2.2 Comparación del espectro SERS experimental y teórico del sildenafil

Una vez analizados los espectros Raman, se procedió a calcular el espectro SERS teórico

del sildenafil utilizando como modelo un complejo sildenafil-oro (SDF-Au) con clústeres de diferente tamaño (Au₆ y Au₁₀) para simular la superficie de nanopilares de oro y evaluar el efecto del tamaño del clúster sobre el desempeño del conjunto de base mixto 6–31G(d)/Lanl2dz para la simulación de espectros SERS. En este caso, los clústeres Au₆ y Au₁₀ fueron seleccionados como modelos simplificados de los sitios activos de oro, con el fin de representar y simular las interacciones locales entre el SDF y la superficie metálica con un costo computacional razonable. Durante estas simulaciones, cada clúster se colocó cerca a los diferentes sitios de interacción más probables de la molécula del sildenafil (O₂, O₃, O₅, N₁₀ y N₁₁), con el objetivo de predecir y comprender la posible interacción de la molécula con la superficie. Estos sitios de interacción fueron identificados previamente mediante el análisis del mapa de potencial electrostático molecular (MEP) mostrado en la figura 4. Las figuras 6 y 7 presentan el espectro SERS experimental del sildenafil y los espectros SERS calculados para los diferentes sitios de interacción de la molécula empleando los clústeres Au₆ y Au₁₀, respectivamente. Asimismo, las frecuencias vibracionales calculadas fueron corregidas aplicando un factor de escala de 0.9880 para compensar las desviaciones asociadas al método armónico y al nivel de teoría empleado.

Figura 6

Espectro SERS experimental del sildenafil (azul) y espectros SERS teóricos del complejo SDF–Au₆ en los distintos sitios de interacción de la molécula: O₂ (verde), O₃ (violeta), O₅ (rojo), N₁₁ (amarillo) y N₁₀ (rosado)

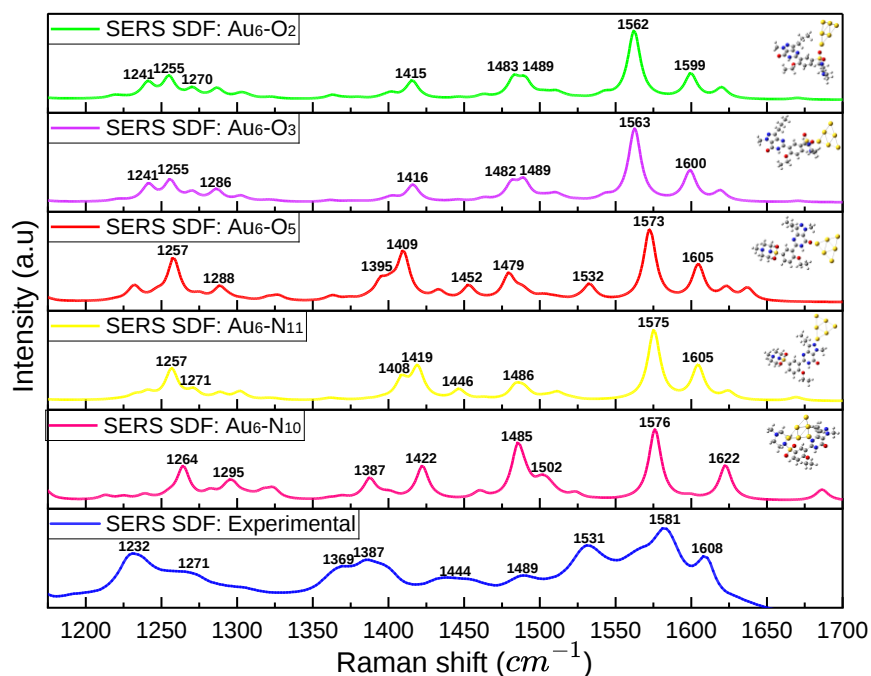
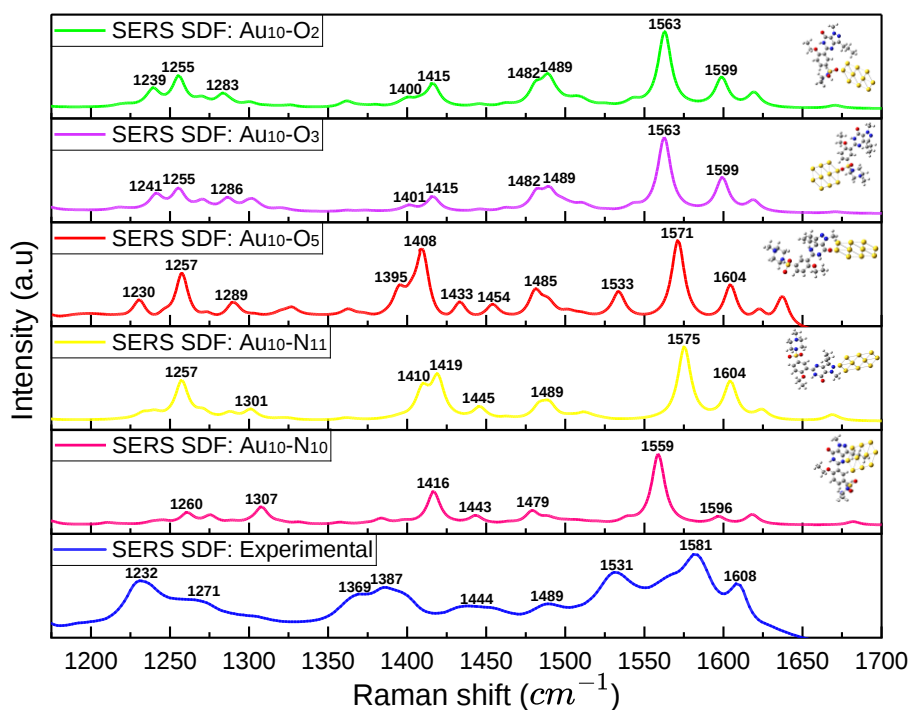


Figura 7

Espectro SERS experimental del sildenafil (azul) y espectros SERS teóricos del complejo SDF–Au10 en los distintos sitios de interacción de la molécula: O2 (verde), O3 (violeta), O5 (rojo), N11 (amarillo) y N10 (rosado)



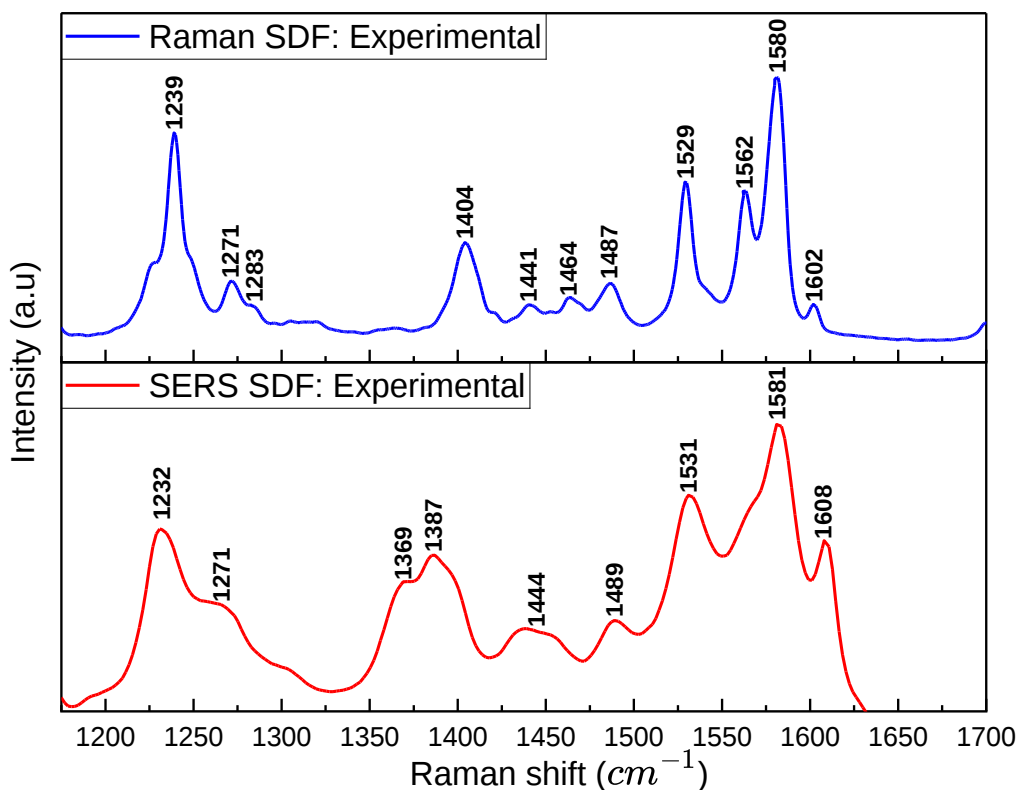
En primer lugar, el análisis de los espectros SERS del sildenafil permitió evidenciar que los espectros teóricos obtenidos en los sitios de interacción O₂, O₃, O₅ y N₁₁, presentan un alto grado de similitud entre los modelos SDF-Au₆ y SDF-Au₁₀. Es decir, los espectros calculados mediante ambos modelos para un mismo sitio de interacción (por ejemplo, O₂), presentan prácticamente las mismas posiciones e intensidades relativas, independiente del tamaño del clúster utilizado. Este resultado demuestra que el modelo con el clúster de seis átomos (Au₆) no solo es suficiente para describir adecuadamente los espectros vibracionales de la molécula en estos sitios de interacción, sino que además resulta más eficiente en términos de costo computacional en comparación con el clúster de diez átomos (Au₁₀). Ahora bien, cuando se comparan los espectros obtenidos entre los diferentes sitios de interacción para un mismo modelo, se observan que para cada sitio hay una distribución de señales notablemente diferentes, lo que sugiere que el fenómeno SERS está más influenciado por el sitio de adsorción de la molécula que por el tamaño de clúster. Sin embargo, al analizar los espectros teóricos obtenidos en el sitio de interacción N₁₀, se observan variaciones significativas entre los modelos Au₆ y Au₁₀, tanto en la posición como en las intensidades relativas de las bandas. Este comportamiento puede atribuirse en gran parte a los efectos de impedimento estérico provocados por los grupos funcionales voluminosos presentes alrededor del sitio de interacción N₁₀. Estos efectos estéricos producen modificaciones en la estructura electrónica y vibracional de la molécula durante su interacción con el clúster, lo que provoca cambios en las frecuencias e intensidades relativas de las señales.

Por otro lado, al comparar el espectro SERS experimental con los espectros SERS teóricos, se observó que en ambos modelos (Au₆ y Au₁₀), los espectros correspondientes a la interacción en el átomo O₅ presentan un mayor grado de concordancia en términos de la distribución e intensidades relativas de las señales. En particular, este es el único espectro teórico que reproduce

la banda experimental ubicada en 1531 cm^{-1} , la cual aparece a 1532 y 1533 cm^{-1} en los modelos Au_6 y Au_{10} , respectivamente. Esta observación podría indicar que el átomo O_5 puede ser uno de los sitios de adsorción más probables durante la interacción de la molécula del sildenafil con la superficie de nanopilares de oro. No obstante, es importante señalar que, desde el punto de vista experimental, la adsorción de la molécula sobre la superficie no puede atribuirse exclusivamente a un único sitio de interacción. Es decir, además de la interacción predominante a través del átomo O_5 , también es probable que la molécula interactúe con la superficie a través de otros sitios de adsorción, y, por lo tanto, presente orientaciones diferentes con respecto a la superficie. Estas diversas interacciones y configuraciones producen cambios electrónicos y geométricos en el entorno de la molécula que ocasionan modificaciones en su estructura vibracional, y como consecuencia, se observan efectos de ensanchamiento, corrimiento e intensificación de ciertas bandas observadas en el espectro SERS en comparación con las obtenidas en el espectro Raman, tal como se evidencia en la figura 8. En resumen, estos resultados indican que, aunque el modelo de adsorción más probable corresponde a la interacción del átomo O_5 del sildenafil con la superficie metálica, la forma y distribución de las señales en el espectro experimental pueden verse afectadas por la contribución simultánea de múltiples interacciones y orientaciones de la molécula sobre la superficie, lo que permite explicar y comprender de forma más detallada y realista los efectos producidos sobre las señales durante el fenómeno SERS.

Figura 8

Comparación del espectro Raman (azul) y SERS (rojo) experimental del sildenafil



Una vez establecido el modelo de adsorción del sildenafil sobre la superficie de oro, se llevó a cabo la asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en el espectro SERS experimental, usando como referencia los resultados obtenidos en los cálculos del complejo SDF-Au₆ en el sitio de interacción O5. Este modelo fue seleccionado debido a su capacidad para reproducir de manera adecuada las principales señales observadas en el espectro con un menor costo computacional en comparación con el modelo de mayor tamaño (SDF-Au₁₀). En este caso, al igual que en análisis de los espectros Raman, este estudio vibracional se centró específicamente en las señales más representativas del espectro SERS experimental, ubicadas en 1232, 1387, 1531, 1581 y 1608 cm^{-1} , mientras que las demás señales solo fueron descritas y presentadas en la tabla 6.

Tabla 6*Asignación de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en el espectro**SERS del sildenafil.*

SERS Exp (cm ⁻¹)	SERS DFT (cm ⁻¹)	Asignación de señal
<u>1232</u>	<u>1257</u>	<u>δ(C-H) del grupo metilo (anillo 1) + δ(N8-H50) del anillo 2</u>
1271	1288	δ(C-H) del anillo 3
1369	1395	δ(N8-H50) del anillo 2 + ω(H60-C32-H59) del grupo 4-etoxi
<u>1387</u>	<u>1409</u>	<u>δ(N8-H50) del anillo 2 + ω(H60-C32-H59) del grupo 4-etoxi</u>
1444	1452	ω(H-C-H) del grupo metilo (anillo 1)
1489	1479	ω(H-C-H) del grupo metilo (anillo 1) + δ(C-H) del anillo 3
<u>1531</u>	<u>1532</u>	<u>DA(anillo 1) + ν(C28=O5) del anillo 2 + s(H-C-H) del grupo metilo (anillo 1)</u>
<u>1581</u>	<u>1573</u>	<u>DA(anillo 3) + δ(N8-H50) del anillo 2 + ν(C22-N10) del anillo 2</u>
<u>1608</u>	<u>1605</u>	<u>DA(anillo 3) + s(C22-N8-H50) del anillo 2</u>

Nota. RA: Respiración de anillo; DA: Deformación de anillo; ν: Vibración de tensión o estiramiento; ν_s: Estiramiento simétrico; ν_{as}: Estiramiento asimétrico; δ: Vibración de flexión; s: Tijereteo; ρ: Balanceo; ω: Aleteo y τ: Torsión.

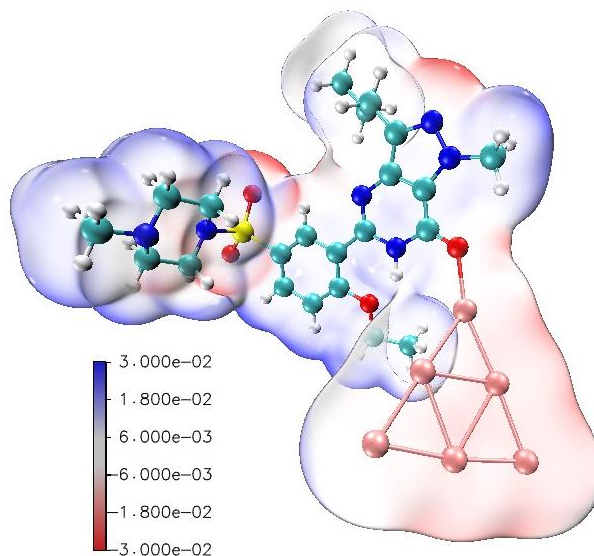
Para comenzar, la banda en 1232 cm⁻¹ se atribuye principalmente a una flexión del enlace C-H del grupo metilo del anillo 1, acompañada de una flexión del enlace N8-H50 ubicado en el anillo 2. Asimismo, la señal observada a 1387 cm⁻¹ se origina de una flexión del enlace N8-H50 y un aleteo del enlace H60-C32-H59 situado en el grupo 4-etoxi. Por otro lado, a frecuencias más altas, la banda localizada en 1531 cm⁻¹ se asocia principalmente a una deformación del anillo 1, junto con un estiramiento del enlace C28=O5 y un modo de tijereteo del enlace H-C-H localizado en el grupo metilo del anillo 1. De igual manera, la banda más intensa ubicada en 1581 cm⁻¹ está relacionada con la deformación del anillo 3, en coordinación con una flexión del enlace N8-H50 y vibración de tensión del enlace C22-N10 ubicadas en el anillo 2, mientras que la banda observada en 1608 cm⁻¹ corresponde específicamente a la deformación del anillo 3 y vibración de tijereteo

del enlace C22-N8-H50 situada en el anillo 2.

Este análisis vibracional, permitió evidenciar que las señales más representativas e intensas del espectro SERS están dominadas principalmente por vibraciones asociadas a los anillos y enlaces situados alrededor del sitio de interacción O5. En particular, la señal experimental ubicada en 1531 cm^{-1} , que solo fue reproducida por el modelo de adsorción en el sitio O5, describe un estiramiento del enlace C28=O5, lo que respalda la participación directa del átomo O5 en la interacción de molécula del sildenafil con la superficie de oro. Estos resultados refuerzan aún más la idea de que el fenómeno SERS está fuertemente influenciado por aquellas regiones o sitios de interacción de la molécula que presentan una mayor probabilidad de interacción con la superficie. En otras palabras, el efecto de intensificación SERS resulta ser un fenómeno altamente localizado, que depende principalmente de la orientación y el sitio de interacción con el que la molécula se adsorbe a la superficie, y afecta en mayor grado a aquellos modos vibracionales relacionados o cercanos a estos sitios de mayor probabilidad. En conclusión, este estudio vibracional permite validar y confirmar que el modelo de adsorción más probable es aquel en el cual molécula de sildenafil interactúa con la superficie de oro a través del átomo de O5. La figura 9 muestra el mapa de potencial electrostático molecular del complejo SDF-Au6 en el sitio de interacción O5.

Figura 9

Mapa de potencial electrostático molecular (MEP) del complejo SDF-Au6 en el sitio de interacción O5.

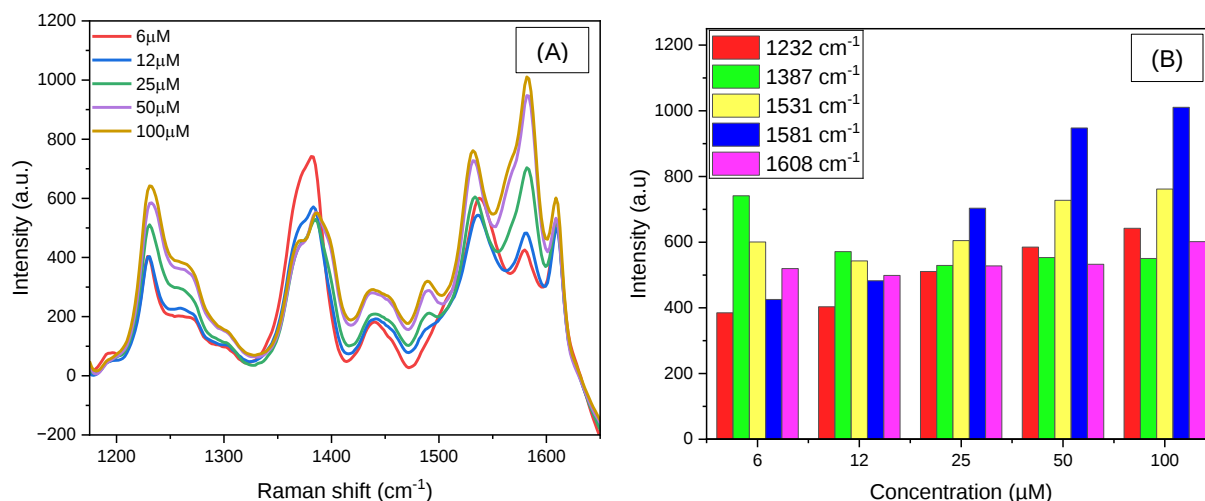


5.3 Evaluación del potencial analítico del método SERS para la detección de sildenafil

En esta fase, se evaluó el desempeño y el potencial analítico del método SERS para el análisis y detección de sildenafil. Para ello, primero se registraron los espectros SERS del sildenafil en un rango de concentraciones de $6\mu\text{M}$ a $100\mu\text{M}$ (Figura 10A), y después, con base a estos espectros, se construyó un gráfico de barras que relaciona la intensidad SERS de las cinco señales características del sildenafil seleccionadas previamente (1232 , 1387 , 1531 , 1581 y 1608 cm^{-1}) en función de su concentración (Figura 10B). Esto con el objetivo de establecer y definir las señales más apropiadas para el análisis y detección de sildenafil.

Figura 10

A) Espectros SERS del sildenafil a diferentes concentraciones y B) Gráfico de barras de la intensidad SERS en función de la concentración de sildenafil



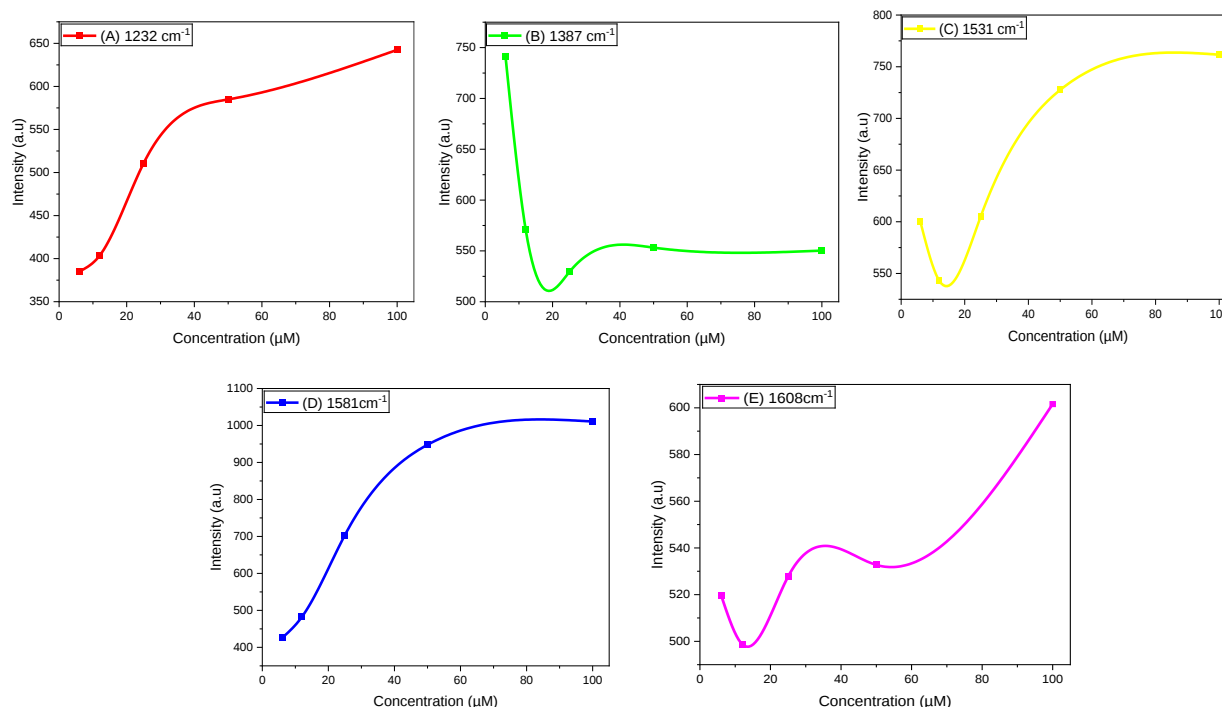
Nota. A) Espectros SERS del sildenafil a diferentes concentraciones 6 μM (rojo), 12 μM (azul), 25 μM (verde), 50 μM (violeta) y 100 μM (dorado). B) Gráfico de barras que relaciona la intensidad SERS de las señales características del sildenafil en función de su concentración: 1232 cm^{-1} (rojo), 1387 cm^{-1} (verde), 1531 cm^{-1} (amarillo), 1581 cm^{-1} (azul) y 1608 cm^{-1} (rosado).

Al analizar los espectros SERS del sildenafil a diferentes concentraciones (Figura 10A), se evidenció que todas las señales características de la molécula, localizadas en 1232, 1387, 1531, 1581 y 1608 cm^{-1} , están presentes y bien definidas en todo el rango de concentraciones estudiado. Incluso, en el espectro de color rojo correspondiente a la concentración más baja (6 μM), las bandas permanecen claramente visibles e intensas, lo que demuestra una alta sensibilidad y un gran potencial del método SERS para detectar niveles de concentración aún más bajos. Sin embargo, al analizar la relación entre la intensidad y la concentración del analito de cada una de las señales características (Figura 10B), se observan diferencias significativas entre las variables analizadas para cada señal. Por un lado, las señales ubicadas en 1232 y 1581 cm^{-1} son las únicas que exhiben un incremento constante en su intensidad a medida que aumenta la concentración, lo que indica una mejor correlación entre las variables y las postula como las señales más apropiadas para la identificación y detección de sildenafil. En cambio, las señales localizadas en 1387, 1531 y 1608 cm^{-1} presentan un comportamiento irregular e inconsistente, lo que dificulta establecer una correlación clara entre la intensidad y la concentración del analito. La figura 11 ilustra los gráficos

de dispersión que describen de forma más explícita las relaciones descritas previamente entre la intensidad de la señal y la concentración para cada una de las señales estudiadas.

Figura 11

Gráficos de dispersión de la intensidad SERS en función de la concentración.



Nota. Gráficos de dispersión que relacionan la intensidad SERS de las señales características del sildenafil en función de su concentración: (A) 1232 cm^{-1} (rojo), (B) 1387 cm^{-1} (verde), (C) 1531 cm^{-1} (amarillo), (D) 1581 cm^{-1} (azul) y (E) 1608 cm^{-1} (rosado).

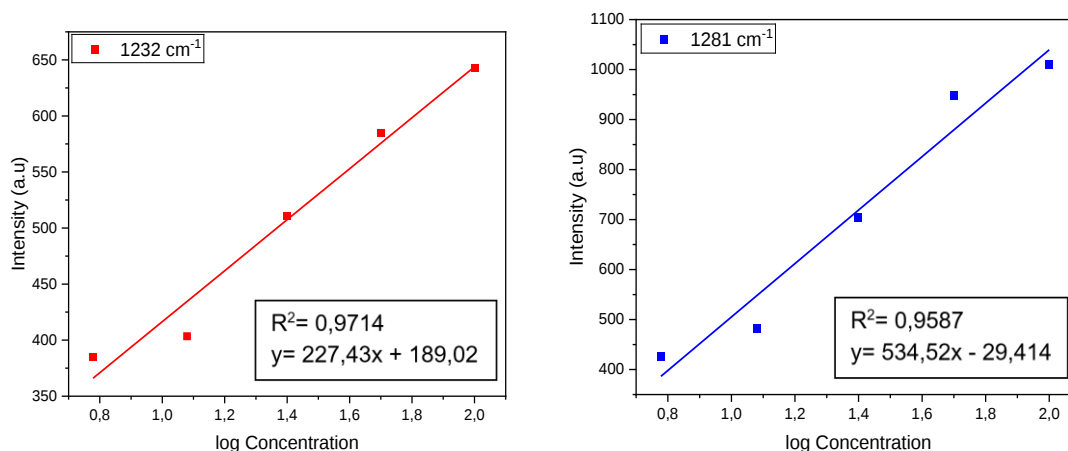
El análisis de los gráficos de dispersión de cada una de las señales (Figura 11), permitió corroborar que evidentemente las bandas ubicadas en 1232 y 1581 cm^{-1} presentan la mejor correlación entre la intensidad de la señal y la concentración del analito. No obstante, los gráficos 11A y 11D, evidenciaron que dicha relación no describe un comportamiento completamente lineal, sino que presentan una tendencia logarítmica. Estos gráficos revelan que en el régimen de bajas concentraciones ($\sim 6 - 40 \mu\text{M}$) existe una correlación casi lineal entre la intensidad y la concentración, demostrando así una alta sensibilidad del método en este intervalo de

concentración, lo cual que resulta útil para la detección a nivel de trazas. Por el contrario, a mayores concentraciones ($\sim 40 - 100\mu\text{M}$), la intensidad de la señal tiende a estabilizarse o nivelarse a medida que aumenta la concentración. Este comportamiento logarítmico es característico de los sistemas SERS y suele atribuirse principalmente a fenómenos relacionados con la aglomeración y/o saturación de las moléculas del analito sobre la superficie metálica, los cuales impiden que ocurra una interacción efectiva del analito con la superficie y provocan una disminución de los efectos de amplificación o mejora en la intensidad de las señales pese al aumento de la concentración.

Ahora bien, con el objetivo de analizar y describir de forma más adecuada y precisa el comportamiento logarítmico observado anteriormente, se procedió a construir los gráficos de dispersión que relacionan la intensidad de cada señal (1232 y 1581 cm^{-1}) con el logaritmo en base de 10 de la concentración del analito, cuyos resultados se ilustran en la figura 12. El uso de esta escala logarítmica no solo permite linealizar la relación entre ambas variables, sino también identificar y seleccionar la señal que ajusta mejor a los resultados experimentales.

Figura 12

Gráficos de dispersión que relacionan la intensidad SERS de las señales ubicadas en 1232 y 1581cm^{-1} en función del logaritmo en base 10 de la concentración.



En este caso, el análisis de los gráficos de dispersión permitió evidenciar que ambas señales presentan una muy buena correlación lineal entre las variables, la cual fue respaldada por la obtención de coeficientes de determinación (R^2) relativamente altos. No obstante, cuando se comparan los valores obtenidos de R^2 para ambas señales, se observa que la señal ubicada en 1232cm^{-1} presenta un mejor ajuste ($R^2 = 0,9714$) en comparación con la banda localizada en 1281cm^{-1} ($R^2 = 0,9587$). Por lo tanto, este resultado permite establecer que la señal ubicada en 1232 cm^{-1} resulta ser la más adecuada para el análisis de sildenafil, debido a que exhibe una mejor correlación entre las variables y ofrece una respuesta más estable y consistente en todo el rango de concentración evaluado, lo que la convierte en un marcador analítico apropiado y confiable. Sin embargo, es importante señalar que para una evaluación y validación más completa del método SERS se requieren estudios adicionales de límite de detección, límite de cuantificación, nivel precisión, recuperación y reproducibilidad intersustrato.

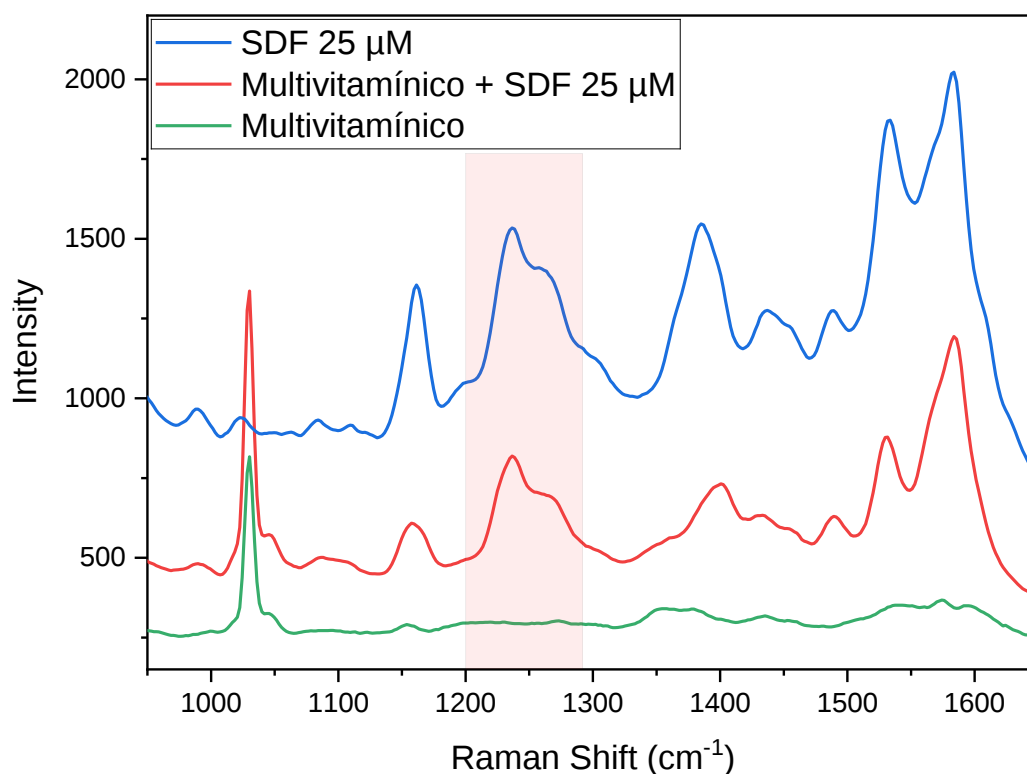
5.4 Determinación de sildenafil en un multivitamínico mediante SERS

En esta última etapa del estudio, se llevó a cabo la determinación de sildenafil en un extracto de un multivitamínico fortificado mediante SERS. Este multivitamínico fue seleccionado

como modelo de matriz adulterada debido a los múltiples señalamientos relacionados con presuntos casos de falsificación y adulteración con sildenafil. Para este análisis, se realizó la simulación de un escenario real de contaminación mediante la adición controlada de sildenafil a una muestra del multivitamínico. Para ello, se midieron y compararon los espectros SERS de tres sistemas diferentes: una solución estándar de sildenafil (25 μ M), una muestra del multivitamínico sin adición y una muestra del multivitamínico enriquecida con sildenafil (25 μ M). La figura 13 ilustra los espectros SERS obtenidos para cada una de las muestras analizadas.

Figura 13

Espectros SERS de los tres sistemas analizados.



Nota. Espectro SERS de una solución de sildenafil 25 μ M (azul), una muestra del multivitamínico sin adición de sildenafil (verde) y una muestra del multivitamínico enriquecida con sildenafil 25 μ M (rojo).

Al analizar comparativamente los espectros SERS se logró observar una clara y evidente diferencia entre los tres sistemas evaluados, caracterizada por la presencia o ausencia de las señales características del sildenafil. Por un lado, tal como se esperaba, el espectro correspondiente a la solución estándar de sildenafil 25 μM (línea azul) mostró todas las bandas características de la molécula identificadas previamente, incluyendo la señal usada como marcador analítico ubicada en 1232 cm^{-1} . Por su parte, el espectro del multivitamínico sin adición (línea verde) no exhibió tales señales características del sildenafil, sino por el contrario, mostró una banda intensa y prominente alrededor de 1031 cm^{-1} , la cual se atribuye comúnmente a vibraciones de respiración de anillos aromáticos relacionadas con la presencia de vitaminas, como la riboflavina u otros excipientes fenólicos. En cambio, al analizar la muestra del multivitamínico enriquecida con sildenafil (línea roja), se observa claramente la aparición e intensificación de las señales características de la molécula, en particular la señal a 1232 cm^{-1} , así como también la presencia de la banda asociada a la matriz del multivitamínico ubicada en 1031 cm^{-1} . Estos resultados demuestran la gran capacidad y potencial del método SERS para la identificación y detección de sildenafil en matrices complejas, incluso en presencia de sustancias o excipientes interferentes.

6. Conclusiones

En este estudio vibracional se desarrolló y estableció un procedimiento analítico sensible y eficiente para la identificación y detección de sildenafil en matrices complejas mediante el método SERS y cálculos DFT. Este enfoque teórico-experimental es una estrategia útil y efectiva que no solo ofrece una descripción precisa y detallada acerca de la estructura y las propiedades vibracionales de la molécula, sino también permite evaluar y demostrar la capacidad y el potencial del método SERS para el análisis de sildenafil. En primer lugar, mediante este estudio se logró demostrar que el método teórico B3LYP (6-31G(d)/Lanl2dz) es una herramienta precisa y

confiable para la optimización de la geometría molecular del sildenafil y la simulación de sus espectros Raman y SERS. Este resultado fue respaldado por el alto grado de concordancia exhibido entre los datos experimentales y los cálculos teóricos, lo que permitió validar el buen desempeño del método para el análisis estructural y vibracional de la molécula. Por su parte, el análisis del MEP del sildenafil, reveló que los sitios de mayor probabilidad de interacción de la molécula con la superficie metálica se localizan especialmente sobre los átomos de oxígeno (O₂, O₃ y O₅) y nitrógeno (N₁₀ y N₁₁) de la estructura. No obstante, el análisis comparativo de los espectros SERS calculados en los diferentes sitios de adsorción, permitió establecer que la interacción del sildenafil con la superficie de nanopilares de oro (AuNPs) ocurre principalmente a través del átomo de oxígeno (O₅) del grupo carbonilo (C=O) ubicando en el anillo de pirimidina (anillo 2).

Por otro lado, la buena correlación evidenciada entre los espectros experimentales y teóricos, facilitó la caracterización y asignación precisa de los modos vibracionales a cada una de las señales observadas en los espectros Raman y SERS. En particular, la asignación de los modos vibracionales reveló que las principales bandas del espectro SERS, ubicadas en 1232, 1387, 1531, 1581 y 1608 cm⁻¹, se encuentran relacionadas principalmente con vibraciones de sistemas aromáticos y grupos funcionales situados alrededor del sitio de interacción O₅, lo que fortalece y valida aún más el modelo de adsorción propuesto. Asimismo, la evaluación del método SERS, demostró que la banda localizada en 1232cm⁻¹ es la más adecuada para el análisis y detección de sildenafil, debido a que exhibe la mejor correlación lineal entre la intensidad de señal y el logaritmo de la concentración ($R^2 = 0,9714$). Además, esta banda ofrece una respuesta más estable y consistente en todo el rango de concentración estudiado (6-100µM), lo que la convierte en un marcador analítico apropiado y confiable para la detección de sildenafil en matrices complejas.

Y finalmente, el método SERS permitió identificar las bandas características del SDF en el extracto de multivitamínico fortificado, lo que demuestra la gran capacidad y potencial del método para la identificación y detección de sildenafil en matrices complejas, incluso en presencia de sustancias y compuestos interferentes. El enfoque propuesto en este trabajo ofrece una herramienta analítica rápida, sensible y eficiente para el análisis in situ de sildenafil en productos adulterados, lo que la convierte en una alternativa prometedora para su uso en controles de calidad y vigilancia dentro de la industria farmacéutica y de suplementos.

Referencias Bibliográficas

- Al-Hroub, H., Alkhawaja, B., Alkhawaja, E., & Arafat, T. (2016). Sensitive and rapid HPLC-UV method with back-extraction step for the determination of sildenafil in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 1009-1010, 1–6. DOI:10.1016/j.jchromb.2015.11.059
- Barbas, Rafael; Font-bardia, Merce; Prohens, Rafel . (2018). Polymorphism of Sildenafil: A new metastable desolvate. *Crystal Growth & Design*, (), *acs.cgd.8b00683*. DOI:10.1021/acs.cgd.8b00683
- Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Rozo, C. E., & Boisen, A. (2015). Adsorption and Vibrational Study of Folic Acid on Gold Nanopillar Structures Using Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. 1–8, 2015. DOI: 10.5772/61606.
- Castillo, J. J., Rindzevicius, T., Rozo, C. E., Thamdrup, L. H. E., & Boisen, A. (2025). Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with DFT for sensitive detection of tadalafil in complex matrices. *Vibrational Spectroscopy*, 140,103847. DOI:10.1016/j.vibspec.2025.103847
- Castillo, J. J., Rozo, C. E., Bertel, L., Rindzevicius, T., Mendez-Sanchez, S. C., Ortega, F. M., & Boisen, A. (2015). Orientation of Pterin-6-Carboxylic Acid on Gold Capped Silicon Nanopillars Platforms: Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. DOI:10.5935/0103-5053.20150352
- Castillo, J.J (2024). Nature's Impostors: Electrochemical Detection of Sildenafil in Natural

Products. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.1007562

Cooper, J. D. H., Muirhead, D. C., Taylor, J. E., & Baker, P. R. (1997). Development of an assay for the simultaneous determination of sildenafil (viagra) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 701(1), 87–95. DOI:10.1016/S0378-4347(97)00339-3

Dennington, Roy; Keith, Todd A.; Millam, John M. GaussView, versión 6 (2016). Semichem Inc., Shawnee Mission, KS.

Frisch MJ, GW Trucks, HB Schlegel, GE Scuseria, MA Robb, JR Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, GA Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, HP Hratchian, AF Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, JL Sonnenberg, M. Hada ... DJ Fox, *Gaussian 09* (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009).

Goldstein, I., Burnett, A. L., Rosen, R. C., Park, P. W., & Stecher, V. J. (2018). The Serendipitous Story of Sildenafil: An Unexpected Oral Therapy for Erectile Dysfunction. *Sexual Medicine Reviews*. DOI: 10.1016/j.sxmr.2018.06.005

Goldstein, Irwin (2012). The Hour Lecture That Changed Sexual Medicine—The Giles Brindley Injection Story. *The Journal of Sexual Medicine*, 9(2), 337–342. DOI:10.1111/j.1743-6109.2011.02635.x

Guo, Chang., Gao, Xun., Qi Wang, Chao Song, Hailong Yu, Qiuyun Wang, Yinping Dou, and

- Jingquan Lin. (2023). Density Functional Theory and Raman Spectroscopy Studies of Adsorption Sites of Au Nanoparticles with Alectinib. *American Chemical Society*. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c03241
- Hang, Z.; Hasi, W.; Lin, B.; Han, S.; Sha, X.; Jia, S.; Lou, X.; Lin, D.; Lv, Z (2017). Rapid Detection of Sildenafil Drugs in Liquid Nutraceuticals Based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Technology. *Chinese Journal of Chemistry*, 35(10), 1522–1528. DOI:10.1002/cjoc.201700168
- Hohenberg, P., & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136(3B), B864–B871. DOI:10.1103/physrev.136.b864
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima). (2017). Alerta Sanitaria: El Invima detecta comercialización de productos fraudulentos en Bogotá. Obtenido de https://app.invima.gov.co/alertas/ckfinder/userfiles/files/ALERTAS%20SANITARIAS/medicamentos_pbiologicos/2017/Octubre/ALERTA%20SANITARIA%20PRODUCTOS%2031%20DE%20OCT%20DE%202017.pdf
- Le Ru, Eric C. & Etchegoin, Pablo G. (2009). Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Chapter 1 - A quick overview of surface-enhanced Raman spectroscopy. *Elsevier*. DOI: 10.1016/B978-0-444-52779-0.00007-6

- Li, E., Hou, J., Li, D., Wang, Y., He, J., & Zhang, J. (2010). The mechanism of vacuum constriction devices in penile erection: The NO/cGMP signaling pathway?. *Medical Hypotheses*, 75(5), 422–424. DOI:10.1016/j.mehy.2010.04.011
- Lin, L., Qu, F., Nie, P., Zhang, H., Chu, B., & He, Y. (2019). Rapid and Quantitative Determination of Sildenafil in Cocktail Based on Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Molecules*, 24(9), 1790. DOI:10.3390/molecules24091790
- Man, C. N., Nor, N. M., Lajis, R., & Harn, G. L. (2009). Identification of sildenafil, tadalafil and vardenafil by gas chromatography–mass spectrometry on short capillary column. *Journal of Chromatography A*, 1216(47), 8426–8430. DOI:10.1016/j.chroma.2009.10.016
- McCabe, M. P., Sharlip, I. D., Atalla, E., Balon, R., Fisher, A. D., Laumann, E., ... Seagraves, R. T. (2016). Definitions of Sexual Dysfunctions in Women and Men: A Consensus Statement From the Fourth International Consultation on Sexual Medicine 2015. *The Journal of Sexual Medicine*, 13(2), 135–143. DOI:10.1016/j.jsxm.2015.12.019
- Mokhtar, S. U., Chin, S.-T., Kee, C.-L., Low, M.-Y., Drummer, O. H., & Marriott, P. J. (2016). Rapid determination of sildenafil and its analogues in dietary supplements using gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 121, 188–196. DOI:10.1016/j.jpba.2016.01.034
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 135413523, Sildenafil Citrate. Retrieved September 16, 2024 obtenido de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sildenafil-Citrate>.

Orio, M., Pantazis, D. A., & Neese, F. (2009). Density functional theory. *Photosynthesis Research*, 102(2-3), 443–453. DOI10.1007/s11120-009-9404-8

Parr, R. G. & Yang, W. Y. (1994). Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. Oxford University Press, Vol. 16.

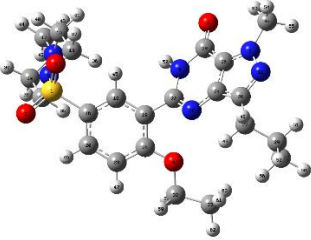
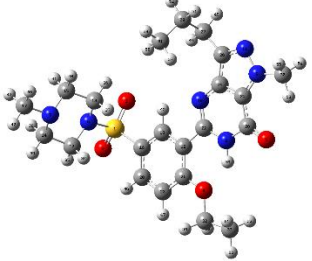
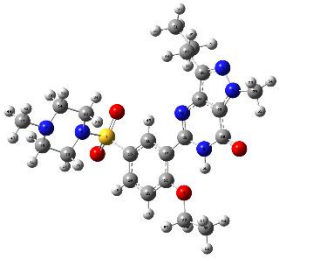
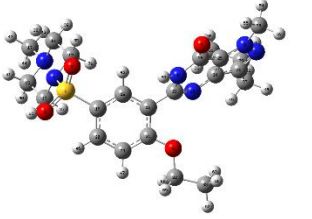
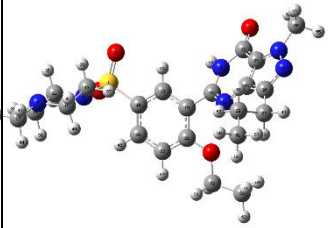
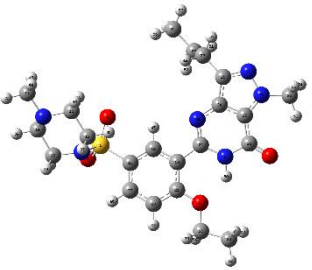
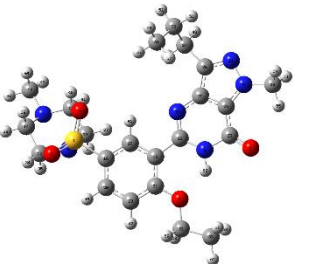
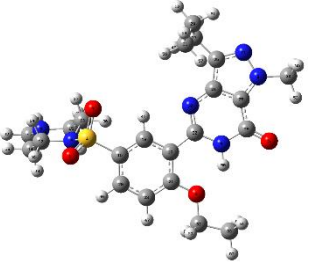
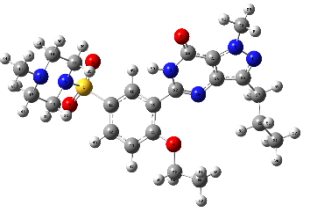
Smith, E., & Dent, G. (2019). Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach. Second Edition. Hoboken, NJ : Wiley.

Tracqui, A., & Ludes, B. (2003). HPLC-MS for the Determination of Sildenafil Citrate (Viagra(R)) in Biological Fluids. Application to the Salivary Excretion of Sildenafil after Oral Intake. *Journal of Analytical Toxicology*, 27(2), 88–94. DOI:10.1093/jat/27.2.88

U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2017). Label: VIAGRA (sildenafil citrate) tablets (New Drug Application (NDA): 020895). Obtenido de https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020895s048lbl.pdf.

Apéndices

Apéndice A. Geometrías optimizadas de los diez confórmeros de SDF obtenidas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G(d).

CONFÓRMERO #1 E= -1182179,94Kcal/mol 	CONFÓRMERO #2 E= -1182185,57Kcal/mol 	CONFÓRMERO #3 E= -1182186,20Kcal/mol 	CONFÓRMERO #4 E= -1182180,40Kcal/mol 
CONFÓRMERO #5 E= -1182180,14Kcal/mol 	CONFÓRMERO #6 E= -1182184,29Kcal/mol 	CONFÓRMERO #7 E= -1182183,68Kcal/mol 	CONFÓRMERO #8 E= -1182184,61Kcal/mol 
CONFÓRMERO #9 E= -1182180,65Kcal/mol 		CONFÓRMERO #10 E= -1182176,72Kcal/mol 