

## Detección de PAHs mediante espectroscopía SERS sobre superficies metálicas funcionalizadas con calixarenos

### Detection of PAHs on calixarene-functionalized metal surfaces by means of SERS spectroscopy

J. V. García-Ramos<sup>(1,\*)</sup>, S. Sánchez-Cortés<sup>(1)</sup>, P. Leyton<sup>(2)</sup>, M. Campos-Vallette<sup>(2)</sup>

(1) Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Serrano 123, 28006 Madrid, España

(2) Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, P.O. Box 653. Santiago. Chile

\* Email de contacto: [imtg160@iem.cfmac.csic.es](mailto:imtg160@iem.cfmac.csic.es)

#### RESUMEN:

Se han detectado trazas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) por espectroscopía SERS. Para conseguir este fin, se han desarrollado nuevos sustratos SERS formados por nanopartículas de plata, tanto en suspensión como inmovilizadas sobre vidrio. Estas nanopartículas se cubrieron de moléculas de calix[4]arenos autoensambladas. Entre las moléculas de calixarenos ensayadas, el 25,27-dicarboethoxy-26,28-dihydroxy-*p-tert*-butylcalix[4]areno presenta una mayor selectividad analítica hacia los PAHs formados por cuatro anillos bencénicos, principalmente el pireno. El mecanismo de la interacción entre el calixareno y el PAH parece tener lugar a través de un empaquetamiento  $\pi - \pi$  que conduce a una transferencia de carga entre el complejo y la superficie metálica. Esta interacción puede inducir también cambios en la carga superficial de las nanopartículas metálicas

**Palabras clave:** SERS, Calixareno, Funcionalización de Superficies, Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

#### ABSTRACT:

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were detected at trace concentrations. In order to accomplish that, new SERS substrates were developed based on silver nanoparticles, both in suspension and immobilized in glass. These nanoparticles were covered by self-assembled calix[4]arene molecules. Among the assayed calixarene molecules, the 25,27-dicarboethoxy-26,28-dihydroxy-*p-tert*-butylcalix[4]arene shows a higher analytical selectivity towards PAHs integrated by four benzene rings, mainly pyrene. The interaction mechanism between the calixarene and PAHs seems to take place through a  $\pi - \pi$  stacking leading to a charge-transfer between the complex and the metal surface. This interaction seems to also induce changes in the surface charge of the metallic particles

**Keywords:** SERS, Calixarene, Surface Functionalization, PAHs.

#### REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>.
- [2] H. E. Van Gijssel, L. J. Schild, D. L. Watt, M. J. Roth, G. Q. Wang, S. M. Dawsey, P. S. Albert, Y. L. Qiao, P. R. Taylor, Z. W. Dong, M. C. Poirier, "Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts determined by semiquantitative immunohistochemistry in human esophageal biopsies taken in 1985", *Mutat Res. - Fund. Mol. M.* **547**, 55-62 (2004).
- [3] G. Falcó, J. L. Domingo, J. M. Llobet, A. Teixidó, C. Casas, L. Muller, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Human Exposure through the Diet in Catalonia, Spain", *J. Food Protect.* **66**, 2325-2331 (2003).
- [4] H. Guo, S. C. Lee, L. Y. Chan, W. M. Li, "Risk assessment of exposure to volatile organic compounds in different indoor environments", *Environ Res.* **94**, 57-66 (2004).

- [5] D. Li, L. Jiao, "Molecular epidemiology of pancreatic cancer", *Int. J. Gastrointest. Cancer* **33**, 3-14 (2003).
- [6] T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A. D. Campiglia, "Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment", *Talanta* **47**, 943-969 (1998).
- [7] S. D. Stewart, P. M. Fredericks, "Fourier transform surface-enhanced Raman scattering for the detection and identification of polyaromatic hydrocarbons", *J. Raman Spectrosc.* **26**, 629 (1995).
- [8] G. Vasilyuk, S. Maskevitch, S. Podtynchenko, "Correlation between structural, optical and raman enhancing properties of silver films", *J. Mol. Struct.* **565-566**, 389-394 (2001).
- [9] E. A. Carrasco, M. Campos-Vallette, P. Leyton, G. Diaz, R. E. Clavijo, J. V. García-Ramos, N. Inostroza, C. Domingo, S. Sánchez-Cortés, R. Koch, "Study of the Interaction of Pollutant Nitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Different Metallic Surfaces by Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy (SERS and SEIR)", *J. Phys. Chem. A* **107**, 9611-9619 (2003).
- [10] *Nitrogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Environmental Health Criteria No. 229, World Health Organization, in preparation. (Available via the Internet at [http://www.who.int/pcs/pubs/pub\\_ehc\\_alpha.htm](http://www.who.int/pcs/pubs/pub_ehc_alpha.htm).)
- [11] W. Schmidt, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Astrophysics*, p. 149-164, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, The Netherlands (1987).
- [12] H. Busch, *The Molecular Biology of Cancer*, Academic Press, New York (1974).
- [13] K. D. Bartle, M. L. Lee, S. A. Wise, "Modern analytical method for environmental polycyclic aromatic compounds", *Chem. Soc. Rev.* **10**, 113-158 (1981).
- [14] L. B. Ebert, *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*, ACS Symposium Series 217, American Chemical Society, Washington DC (1988).
- [15] D. M. Hudgins, C. W. Bauschlicher, L. J. Allamandola, "Variations in the peak position of the 6.2  $\mu\text{m}$  interstellar emission feature: A tracer of N in the interstellar polycyclic aromatic hydrocarbon population", *Astrophys. J.* **632**, 316-332 (2005).
- [16] K. N. Houk, G. L. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, "Binding Affinities of Host-Guest, Protein-Ligand, and Protein-Transition-State Complexes", *Angew. Chem. Int. Edit.* **42**, 4872-4897 (2003).
- [17] C. D. Gutsche, "Calixarenes" en *Monographs in Supramolecular Chemistry*, J. F. Stoddart, Edt., Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992).
- [18] C. D. Gutsche, J. A. Levine, K. H. No, L. Bauer, "Calixarenes 9 : Conformational isomers of the ethers and esters of calix[4]arenes", *Tetrahedron* **39**, 409-426 (1983).
- [19] K. S. Park, S. O. Jung, S. S. Lee, J. S. Kim, "Thallium(I)-Selective Electrodes Based on Calix[4]pyrroles", *B. Kor. Chem. Soc.* **21**, 909-912 (1996).
- [20] N. Leopold, B. Lendl, "A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride", *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723-5727 (2003).
- [21] S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos, "Anomalous Raman Bands Appearing in Surface-Enhanced Raman Spectra", *J. Raman Spectrosc.* **29**, 365-371 (1998).
- [22] P. Leyton, S. Sánchez-Cortés, J. V. García-Ramos, C. Domingo, M. Campos-Vallette, C. Saitz, R. E. Clavijo, "Selective molecular recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on Calix[4]arene-functionalized Ag nanoparticles by surface-enhanced raman scattering", *J. Phys. Chem. B.* **108**, 17484-17940 (2004).

## 1. Introducción

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs en inglés, Figura 1) son un grupo de compuestos químicos que se caracterizan por poseer una estructura formada por varios anillos bencénicos condensados. Estos compuestos son unos de los contaminantes medioambientales más importantes, pues se forman durante la combustión incompleta de carbón, petróleo, gas natural y también otras sustancias orgánicas como tabaco o carne a la brasa [1]. Los PAHs aparecen como mezclas de diferentes

compuestos en el aire, el suelo y el agua como consecuencia de algunos procesos naturales y de la actividad humana.

Algunos autores han encontrado una fuerte actividad carcinogénica en estos compuestos, por lo que es evidente la importancia en encontrar un método efectivo y selectivo para detectarlos [2-5].

En general, el análisis químico de PAHs se ha centrado hasta ahora en métodos cromatográficos [6]. Recientemente también se ha utilizado en la detección de PAHs la técnica Raman sobre

superficies nanoestructuradas rugosas, conocida como espectroscopía SERS (surface-enhanced Raman spectroscopy), empleando como sustratos electrodos o films de islotes metálicos [7,8]. Sin embargo, la detección directa de PAHs por estos métodos no resulta demasiado selectiva.

En un trabajo previo [9], se publicaron los espectros vibracionales sobre superficies (SERS y SEIRA) de algunos nitroderivados de los PAHs, los nitroPAHs, como el 1-nitropireno y el 2-nitrofluoreno, donde se demostró la existencia de una interacción efectiva del adsorbato con el metal a través del grupo nitro. Estos compuestos se encuentran en el medio ambiente mezclados con sus precursores los PAHs y cientos de otros compuestos orgánicos, aunque aparecen en cantidades mucho más pequeñas que los PAHs [10]. Suelen encontrarse en fase vapor o adsorbidos sobre partículas de distintos materiales; además, son insolubles o muy poco solubles en agua aunque solubles en disolventes orgánicos.

Estos nitroderivados se originan por nitración de los propios PAHs durante muchos procesos de combustión (por ejemplo: tubos de escape de vehículos, particularmente diesel, sin olvidar los de gasolina o los aviones; emisiones industriales; cocinas domésticas; combustión de madera; etc.) o debido a la reacción con dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) [10-14]. Se ha observado que la distribución de isómeros de nitroPAHs en el aire es muy diferente de la encontrada en emisiones directas de procesos de combustión. Los nitro isómeros de pireno y fluoreno más abundantes encontrados en la combustión de gasoil diesel son el 1-nitropireno (1NP) y el 2-nitrofluoreno (2NF) [10].

Recientemente, el telescopio espacial Spitzer, de la NASA, permitió conocer que los PAHs se encuentran en cada esquina de nuestra galaxia. Sin embargo, esto a pesar de ser importante para los astrónomos, ha sido de poco interés para los astrobiólogos ya que normalmente los PAHs no son importantes en biología. No obstante los PAHs encontrados en el espacio incorporan nitrógeno en su estructura (PAHNs). Esto lo cambia todo [15].

Los PANHs transportan la información del ADN y ARN y son un componente importante de la hemoglobina, la molécula que transporta el oxígeno a través del cuerpo. También forman la clorofila, la principal molécula responsable de la fotosíntesis en las plantas, y – quizás en mayor medida – son el componente principal de la cafeína y del chocolate.

Hubo un tiempo en el que la hipótesis fue que el origen de la vida, desde la formación de compuestos simples hasta la vida compleja, tuvo que ocurrir aquí

en la Tierra, según dijo Doug Hudgins, director del estudio del Centro de Investigación Ames. A continuación comentó: “Hemos descubierto que algunas moléculas biológicamente muy interesantes podrían formarse fuera de nuestro ambiente terrenal y esparcirse aquí”. Irónicamente, los PANHs se forman en abundancia alrededor de estrellas moribundas, por lo que en su muerte extienden las semillas de la vida”.

No obstante, como hemos dicho más arriba, el problema para detectar los PAHs por espectroscopía SERS y SEIRA, seguía siendo la ausencia de afinidad de estas moléculas por el metal, lo cual hizo que no se pudieran registrar espectros IR y Raman intensificados.

A este respecto, el reconocimiento molecular con moléculas que presentan una cavidad bien definida con capacidad para encapsular selectivamente otras moléculas según su tamaño, es uno de los temas de química supramolecular más interesantes en la actualidad con prometedoras aplicaciones en el diseño de sensores [16]. Los calixarenos son moléculas de este tipo que han atraído mucha atención recientemente [17].

Los calixarenos son ciclooligó-meros sintéticos formados por con-densaciones fenol-formaldehído. Tienen forma de cáliz con dos bordes superior e inferior y un anillo central bien definidos (Fig. 2), que les confiere unas propiedades muy interesantes para hospedar moléculas. Asimismo, presentan diferentes conformaciones tales como conos, conos alternados 1,2 y 1,3, etc., [17-19] que pueden condicionar dichas aplicaciones como moléculas huésped. Al cambiar los grupos funcionales del borde superior y/o inferior, es posible obtener diferentes derivados con distintas especificidades frente a diversos tipos de moléculas e iones.

Para este fin, las nanopartículas coloidales de plata se prepararon usando clorhidrato de hidroxilamina como agente reductor [20]. Estas nanopartículas tienen la ventaja, con respecto a las de los coloides de Ag obtenidas con citrato, una distribución de tamaño y forma más uniforme, junto con la ausencia de exceso de citrato y de sus productos de oxidación que suelen interferir con las medidas SERS [21]. Además, este coloide ofrece mejores propiedades electroquímicas superficiales para la detección de PAHs ya que las cargas negativas totales, debidas principalmente a los iones cloruro residuales, son mucho más bajas que en el caso de los coloides de citrato y de borohidruro. En estos últimos, se adsorben sobre la superficie aniones que soportan mas de una carga negativa, aumentando la carga negativa total de la nanopartícula. Sin embargo, estas nanopartículas cubiertas por cloruros presentan

unas propiedades de adherencia muy mejoradas, lo cual facilita su inmovilización sobre vidrio formando películas provistas de una distribución uniforme de partículas metálicas obtenidas por una simple deposición de una parte alícuota de la suspensión coloidal sobre un portamuestras de vidrio.

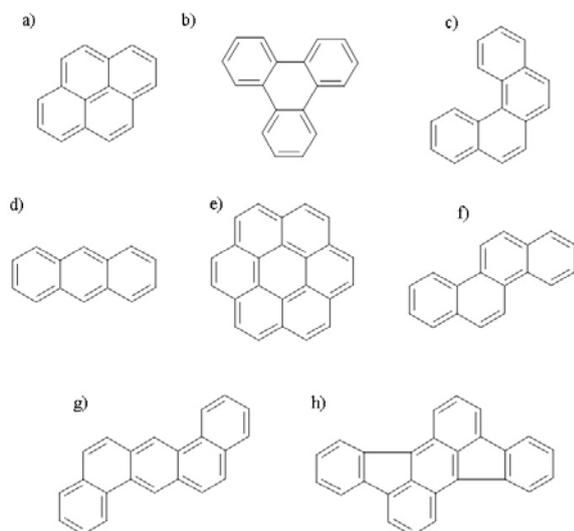


Fig. 1. Estructura molecular de: a) pyrene (PYR), b) triphenylene (TP), c) benzo[c]phenanthrene (BcP), d) anthracene (ANT), e) coronene (COR), f) chrysene (CHR), g) dibenzoanthracene (DBA) y h) rubicene (RUB)

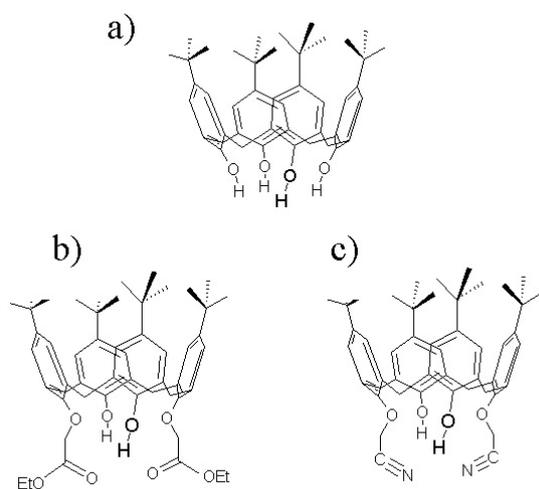


Fig. 2. Estructura Molecular de calix[4]arenos: (a) TOHC, (b) DCEC, (c) DCNC.

## 2. Detalles experimentales

Las medidas SERS sobre coloides de Ag se han llevado a cabo al añadir alícuotas del calixareno en acetona a 500 microlitros del coloide hasta la concentración deseada. En el caso de los complejos calixareno/PAHs, se añadieron después alícuotas de las disoluciones de los PAHs, también en acetona, hasta alcanzar las concentraciones finales deseadas.

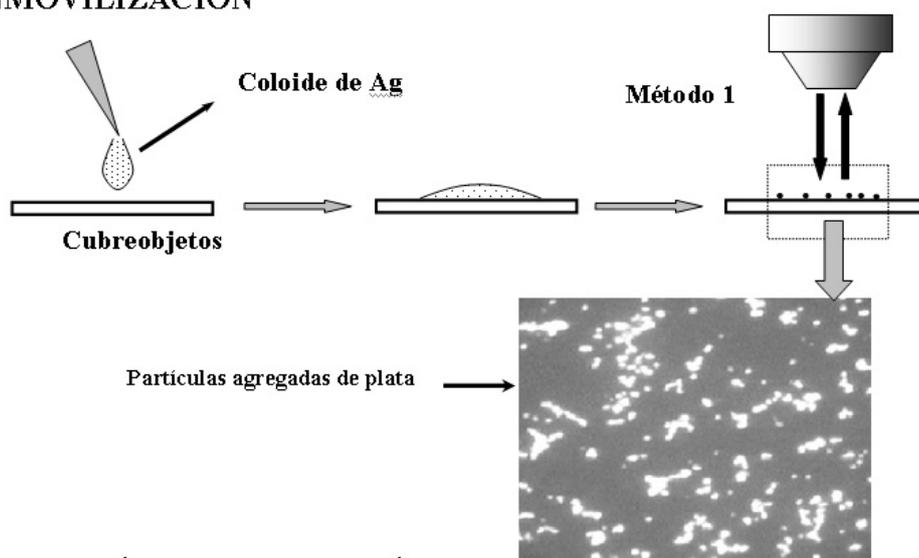
Las películas metálicas de nanopartículas de Ag, con las que hacer medidas micro-SERS, se prepararon al inmovilizar nanopartículas coloidales por dos métodos distintos. En ambos casos, los coloides se activaron previamente añadiendo nitrato potásico 0,5 M en agua hasta alcanzar una concentración final de  $4 \times 10^{-2}$  M. El primer método consiste en el secado a temperatura ambiente de 20 microlitros de dicha suspensión coloidal activada (Fig. 3a). A continuación, se añade una parte alícuota del coloide original sin activar en un portamuestras provisto de una hendidura (2 cm de diámetro y 0,38 mm de profundidad). Sobre dicha hendidura se coloca un cubremuestras con nanopartículas de Ag secas, de tal forma que la parte del coloide esté en contacto con la suspensión. Este segundo método proporciona espectros SERS más reproducibles, por lo que fue seguido para obtener los espectros SERS que se muestran en este trabajo.

Las medidas SERS obtenidas en el microscopio Raman presentan una sensibilidad mucho mayor que las de los experimentos macro, debido a que el área estudiada es mucho menor. Suponiendo que la parte alícuota aplicada ( $10^{-5}$  M de PAHs) se extienda por una superficie de  $10^8 \mu\text{m}^2$  y que la superficie analizada es de unos  $2 \mu\text{m}^2$  si se usa un objetivo de 100x en el micro-Raman, hemos calculado que el total de PAHs analizados es aproximadamente  $10^{-3}$  pg.

## 3. Resultados y discusión

Aunque hemos estudiado varios calixarenos, en este trabajo hemos centrado nuestra atención en el 25,27-dicarboethoxy-26,28-dihydroxy *p-tert*-butylcalix[4]arene (DCEC) debido a que es el que presenta la mayor intensidad SERS.

**a) INMOVILIZACIÓN**



**b) INMERSIÓN Y OBSERVACIÓN**

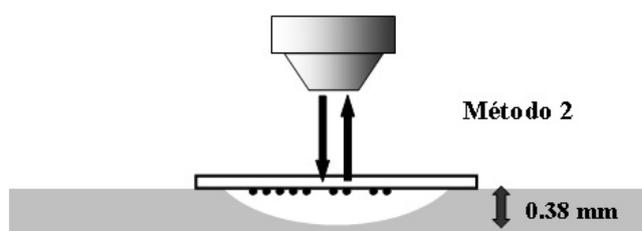


Fig. 3.

En la Fig. 4, se presenta el espectro Raman del DCEC en estado sólido y los espectros SERS de dicha molécula adsorbida sobre coloide de plata en suspensión (excitación a 1064 nm) e inmobilizado (excitación a 785 nm). En general, la intensidad de los espectros SERS de todos los calixarenos estudiados es mayor a 785 nm que a 1064 nm.

Del estudio de estos espectros, se deduce que la molécula de calixareno interacciona con el metal a través del grupo ester, adoptando una orientación específica en la que los grupos tert-butilo están lejos de la superficie. Por otro lado, como ya dijimos al principio, los PAHs no dan espectros SERS debido a que estas moléculas no presentan ninguna afinidad que les permita adsorberse sobre las superficies metálicas. Nuestra experiencia indica que cuando se deposita una gota de PAH en disolución sobre películas de islotes metálicos, la molécula no se adsorbe realmente una vez que el disolvente se ha evaporado, si no que se forman microcristales. Una de las ventajas del micro-Raman es que se pueden elegir convenientemente las áreas a estudiar. De esta

forma, hemos observado que el espectro micro-Raman de estos microcristales corresponde al del PAH sólido.

Este hecho debe tenerse en cuenta cuando se intentan obtener espectros macro-Raman o SERS de disoluciones de PAHs depositadas y secadas sobre superficies metálicas en forma de islotes o electrodos.

De todo esto, podemos concluir que es necesario funcionalizar la superficie metálica con el fin de unir las moléculas de PAHs para que dé lugar a una alta intensificación SERS.

En las Figuras 5 y 6 se muestran los espectros SERS de los complejos calixareno/PAHs obtenidos a dos longitudes de onda de excitación distintas: 1064 y 785 nm respectivamente.

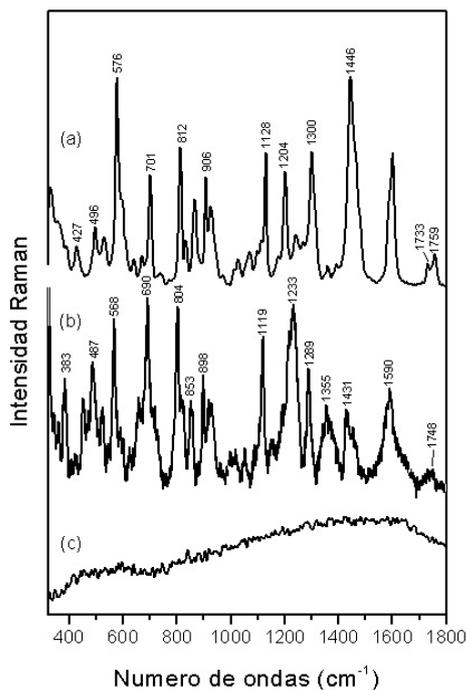


Fig. 4. Espectro Raman de DCEC sólido excitando a 1064 nm (a) y SERS de DCEC ( $10^{-4}$  M) sobre coloide de Ag a 785 (b) y 1064 nm (c).

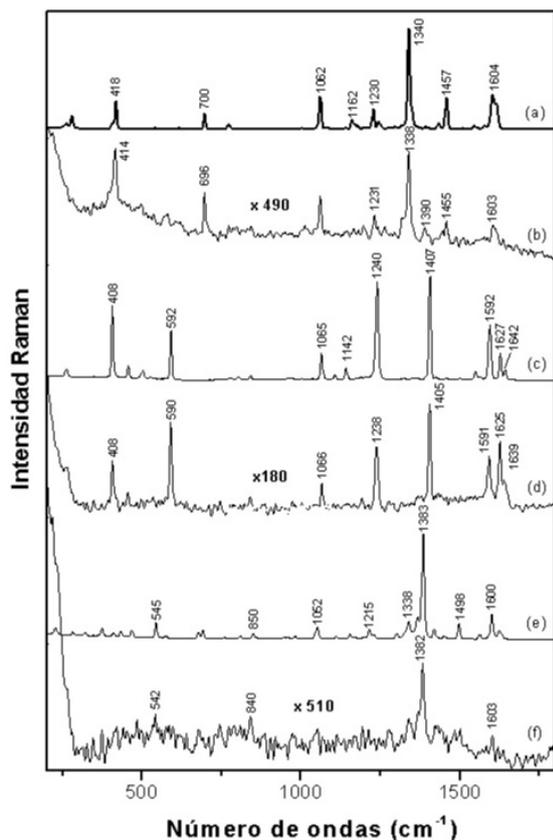


Fig. 5. Espectros Raman de TP, PYR y BcP en sólido (a, c y e, respectivamente) y espectros SERS de complejos de TP, PYR y BcP ( $10^{-4}$  M) con DCEC ( $10^{-4}$  M) sobre coloide de Ag (b, d y f, respectivamente) a 1064 nm

Estas dos líneas de excitación se eligieron para estudiar las dos moléculas que forman el complejo separadamente. Como ya hemos dicho, las bandas del calixareno son muy débiles a 1064 nm y el espectro SERS del complejo estará dominado por el espectro de los PAHs, como se observa en la Figura 4. A esta longitud de onda, la concentración mínima de PAH alcanzada fue de  $10^{-6}$  M. Además, los espectros SERS de los PAHs en los complejos con calixarenos muestran unas importantes diferencias con los correspondientes espectros Raman del sólido. En base al estudio de los espectros SERS de estos complejos, también se pudo concluir que el mecanismo de interacción PAH- calixareno transcurre a través del empaquetamiento  $\pi - \pi$  entre los sistemas aromáticos del DCEC y los PAHs.

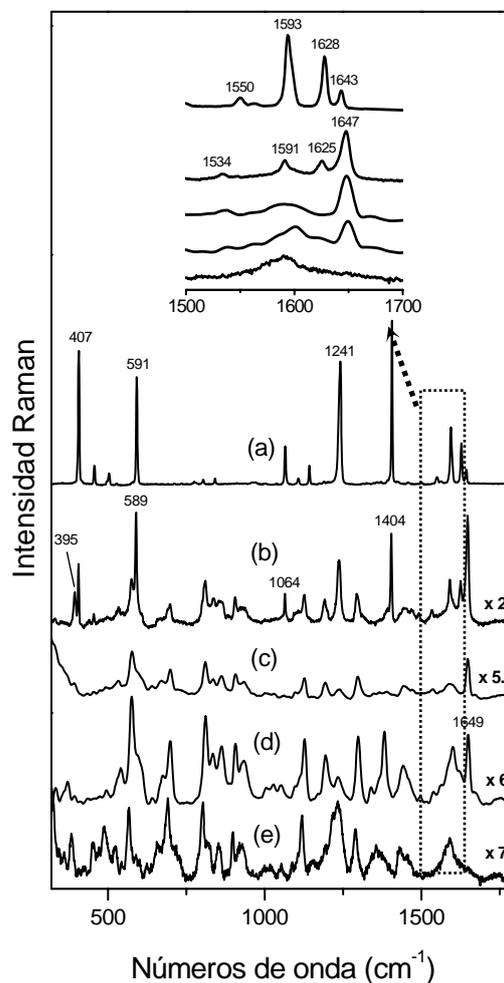


Fig. 6. Espectros Micro-Raman de PYR en sólido (a) y espectros micro-SERS de: b) PYR ( $10^{-4}$  M); c) PYR ( $10^{-8}$  M); d) BcP ( $10^{-6}$  M); y e) DCEC ( $10^{-4}$  M). Todos los espectros se obtuvieron con excitación a 785 nm

#### 4. Conclusiones

Los calixarenos pueden usarse para la detección de PAHs a concentraciones a nivel de trazas por medio de la espectroscopía SERS tanto sobre coloides de plata en suspensión como inmovilizados. La molécula receptora de calixareno adsorbida sobre la superficie metálica captura a la molécula de PAH y la mantiene lo bastante cerca de la superficie metálica para que pueda ser detectada por espectroscopía SERS.

DCEC es el receptor más apropiado entre los calixarenos estudiados en este trabajo, tanto en lo que se refiere a su sensibilidad como a su selectividad en la detección de PAHs. Esta molécula se adsorbe sobre la plata formando un film autoensamblado sobre las nanopartículas coloidales y su interacción con los PAHs induce un cambio significativo en su estructura.

Finalmente, creemos que la modificación de la estructura de los calixarenos (por ejemplo, con un número diferente de anillos bencénicos, o con diferentes grupos funcionales tanto en el borde superior como inferior) podría dar lugar a la consiguiente modificación de su selectividad abriendo el camino para su viabilidad como micro sensores ópticos de estas interesantes moléculas.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el MEC (Proy.: FIS2004-00108), la Comunidad de Madrid (Proy.: MICROSERES; S-0505/TIC/0191) y el Acuerdo Bilateral CSIC-CONICYT (Proy.: 2005CL0002). Los autores expresan su agradecimiento a estos Organismos.