

*SUPERFICIES METÁLICAS NANOESTRUCTURADAS Y SU FUNCIONALIZACIÓN PARA SENSORES MOLECULARES BASADOS EN ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL (RAMAN E INFRARROJA) INTENSIFICADA POR SUPERFICIES*  
C. Domingo, L. Guerrini, Z. Jurasekova, S. Sánchez-Cortés y J.V. García-Ramos  
en “Nuevos usos para viejos materiales y nuevos materiales para viejos usos”, P. Fernandez (Ed.), FGUCM, Madrid (en prensa)

## SUPERFICIES METÁLICAS NANOESTRUCTURADAS Y SU FUNCIONALIZACIÓN PARA SENSORES MOLECULARES BASADOS EN ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL (RAMAN E INFRARROJA) INTENSIFICADA POR SUPERFICIES

C. Domingo, L. Guerrini, Z. Jurasekova, S. Sánchez-Cortés y J.V. García-Ramos  
Instituto de Estructura de la Materia, CSIC  
Serrano 121, 28006 Madrid, España

### RESUMEN

Las nanoestructuras metálicas presentan propiedades ópticas singulares debido a los plasmones superficiales localizados (*Localized Surface Plasmons*) que soportan. La excitación resonante de los mismos produce enormes intensificaciones del campo electromagnético local en las proximidades de las nanoestructuras metálicas, efecto que puede aprovecharse para aumentar la sensibilidad de las técnicas de espectroscopía vibracional (dispersión Raman y absorción infrarroja) que son idóneas para llevar a cabo la caracterización requerida en un sensor molecular. Cuando las moléculas a detectar no presentan afinidad por los sustratos metálicos, se hace necesario funcionalizarlos adecuadamente para conseguir que esas moléculas se aproximen lo suficiente a las nanoestructuras metálicas como para que se beneficien de los enormes campos electromagnéticos locales y, por lo tanto, puedan ser detectadas mediante las técnicas de espectroscopía vibracional intensificadas SERS (*Surface-enhanced Raman Scattering*) y/o SEIRA (*Surface-enhanced Infrared Absorption*). Se presentan ejemplos de detección con esta técnicas de cantidades traza de moléculas de interés biológico y/o medioambiental, utilizando sustratos metálicos nanoestructurados preparados por diferentes métodos.

### INTRODUCCIÓN

Las características principales de un sensor vienen dadas por su sensibilidad y su selectividad, además de su reproducibilidad. Si se trata de diseñar “sensores moleculares”, habrá que utilizar técnicas con alto poder de discriminación entre moléculas. En este sentido, la espectroscopía vibracional (a través de medidas de absorción infrarroja y/o dispersión Raman) sería la técnica de elección puesto que es capaz de proporcionar la “huella dactilar” de cada molécula. Sin embargo, su baja sensibilidad, especialmente en el caso de la espectroscopía Raman, supone una grave limitación para su utilización en sensores. Para aumentar la sensibilidad se puede recurrir a obtener los espectros vibracionales de la molécula a detectar en presencia de superficies metálicas nanoestructuradas. La razón es la siguiente: las nanoestructuras metálicas presentan polarizabilidades grandes debido a las oscilaciones colectivas de su nube de electrones que reciben el nombre de “plasmones superficiales localizados” (en inglés *Localized Surface Plasmons*, LSP) (Willets, 2007). La excitación resonante de dichos plasmones, por ejemplo mediante el láser utilizado para obtener los espectros Raman, produce enormes intensificaciones del campo electromagnético local en las proximidades de las nanoestructuras metálicas. Tal efecto ha sido ampliamente utilizado para incrementar la señal Raman (y por tanto la sensibilidad de la técnica) en varios órdenes de magnitud, en lo que se conoce como espectroscopía SERS (en inglés *Surface-Enhanced Raman Scattering*). La figura 1 presenta una comparación de las

sensibilidades de las espectroscopías Raman e infrarroja con la mucho más sensible espectroscopía de emisión de fluorescencia (en términos de secciones eficaces de las mismas) tanto en el modo convencional como en sus respectivas versiones "Surface-Enhanced": Raman (SERS), absorción infrarroja (SEIRA) y fluorescencia (SEF). La intensificación que se observa en SEIRA se debe al cambio de propiedades ópticas que presentan los metales nanoestructurados en comparación con las propiedades del metal masivo. Si bien dicha intensificación es mucho menor que en SERS, la complementariedad de ambas técnicas resulta de gran interés como se ilustrará más adelante.

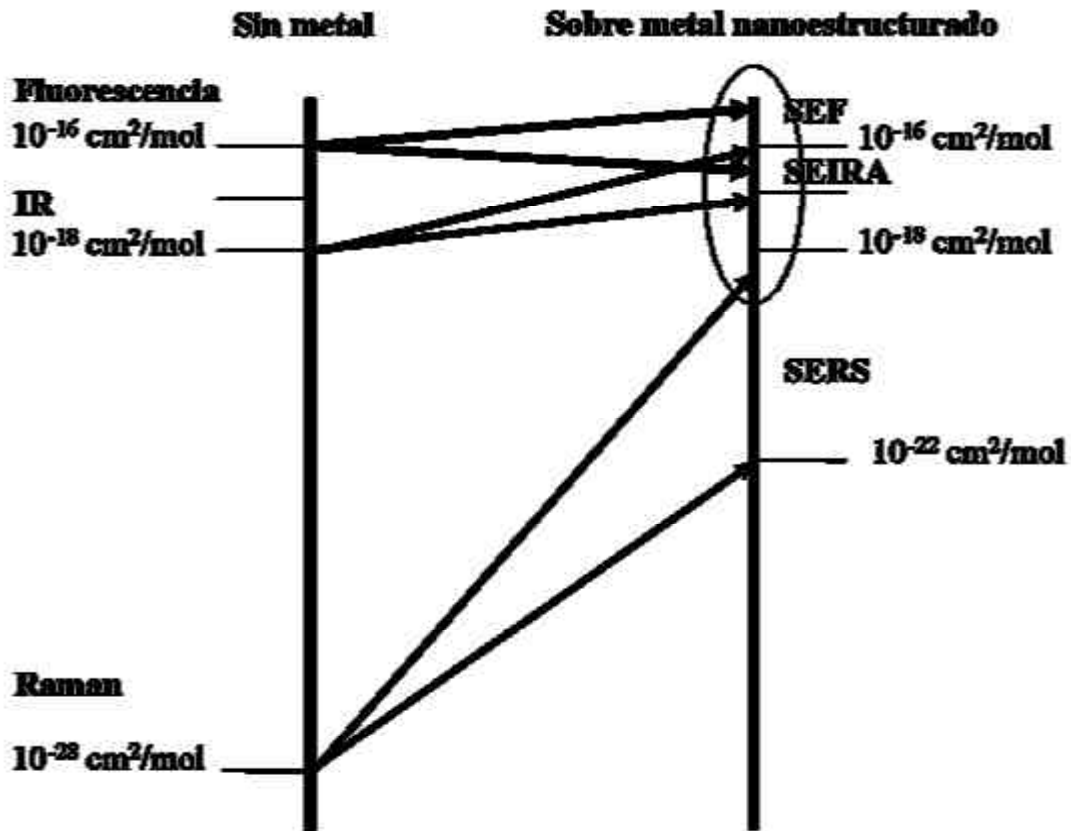


Figura 1. Secciones eficaces de las técnicas de espectroscopía Raman, infrarroja (IR) y de fluorescencia convencionales (sin metal) y sobre metales nanoestructurados. La región enmarcada corresponde a sensibilidades comparables.

Hay dos mecanismos que contribuyen a la intensificación de los espectros mencionados: el electromagnético (EM) y el químico (o de transferencia de carga, CT) (Aroca, 2006). Además aparecen nuevas reglas de selección debidas a la orientación relativa molécula-superficie, de manera que, por ejemplo, se intensifican más las bandas del espectro Raman correspondientes a vibraciones moleculares que tienen una componente perpendicular a la superficie. Los espectros intensificados contienen pues información muy interesante sobre la orientación molecular. El mecanismo electromagnético depende de las propiedades ópticas del metal, a través de su constante dieléctrica, y de las características morfológicas de las correspondientes nanoestructuras,

ya que determinan las propiedades de los LSP. Así, los metales nobles plata, oro y cobre tienen plasmones en el visible y son por lo tanto los más indicados para espectroscopía SERS que se excita con láseres en el visible-infrarrojo próximo, mientras que para SEIRA pueden emplearse, además, otros metales como platino, paladio, hierro, etc. (Aroca, 2004). El mecanismo químico contribuye en menor medida a la intensificación pero es muy relevante en SERS.

Condición *sine qua non* para que la molécula “a detectar” pueda beneficiarse de esos enormes campos electromagnéticos locales y que, por lo tanto, se produzca el aumento de sensibilidad de las técnicas espectroscópicas, es que la molécula se encuentre a menos de 5 nm de la superficie metálica nanoestructurada. Y aquí entra en juego la afinidad de las moléculas por los metales. Al respecto pueden definirse tres grupos de moléculas: a) moléculas con grupos funcionales que interaccionan con el metal (por ejemplo, el grupo tiol tiene una gran afinidad por el oro y el grupo nitro por la plata). Este tipo de moléculas son las ideales para ser detectadas mediante SERS y/o SEIRA puesto que se aproximan suficientemente a la superficie metálica manteniendo su integridad; b) moléculas en las que la interacción con el metal es tan fuerte, que sufren un proceso de degradación al estar en contacto con el metal, como les ocurre a algunos polifenoles, detectándose entonces los productos de degradación (Sánchez-Cortés, 2000); y c) moléculas que no muestran afinidad alguna por los metales y que, por lo tanto, no se aproximan a las superficies metálicas nanoestructuradas que nos ocupan. Dado que la mayor parte de las moléculas pertenecen a este último grupo, se hace necesario encontrar alguna manera de aproximarlas a la superficie metálica para que se puedan detectar mediante sensores SERS y/o SEIRA. La funcionalización de las superficies metálicas con otras moléculas que: 1) presenten afinidad por el metal y 2) atraigan a la molécula a detectar, es una manera eficaz de conseguir este objetivo. Además una correcta funcionalización puede incrementar la selectividad de los correspondientes sensores, como veremos después.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en el diseño de sensores moleculares SERS y SEIRA para detección de moléculas de interés medioambiental. En particular estamos interesados en detección de pesticidas y de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estos últimos son compuestos cancerígenos que pertenecen al tipo c) de moléculas mencionado en el párrafo anterior, por lo que hemos tenido que utilizar, entre otras moléculas, calix[4]arenes sustituidos en los bordes superior e inferior para funcionalizar las superficies metálicas nanoestructuradas a utilizar como sustratos SERS y/o SEIRA. En los apartados siguientes presentaremos algunos ejemplos relevantes de sensores SERS de algunas moléculas de interés biológico (esporas de ántrax, glucosa) desarrollados en otros grupos de investigación, así como un resumen de nuestras aportaciones a la detección SERS y SEIRA de moléculas de interés medioambiental utilizando diversos tipos de sustratos metálicos nanoestructurados.

## **1. SENSORES SERS Y SEIRA**

### **1.1. Métodos de preparación de nanoestructuras metálicas para SERS y SEIRA**

Se han descrito una gran variedad de nanoestructuras metálicas de plata y oro que pueden ser utilizadas como sustratos SERS y/o SEIRA. Su eficiencia “intensificadora” depende críticamente de su morfología (tamaño, forma y distancia entre partículas). Y la

morfología depende del método de preparación. En este sentido hay que mencionar la gran cantidad de trabajo teórico que se dedica a "diseñar" nanoestructuras metálicas con propiedades "intensificadoras" cada vez mejores. Y son los resultados teóricos los que incitan y, de algún modo, encaminan a los investigadores experimentales a buscar y aplicar nuevos métodos de producción. Entre otros se utilizan los siguientes sustratos SERS y SEIRA: coloides metálicos, ya sea en suspensión o inmovilizados; islotes metálicos producidos por evaporación del metal, por deposición con láser pulsado (Domingo, 2007a) o mediante sucesivos ciclos redox, así como nanoestructuras metálicas producidas mediante nanolitografía.

Los coloides metálicos, principalmente de plata, han sido los sustratos SERS más utilizados hasta el presente. Se pueden preparar a partir de una sal del metal, bien sea por reducción química con borohidruro (Carrasco, 2003), citrato o hidroxilamina (Cañamares, 2005), por ablación láser, mediante fotorreducción (Cañamares, 2007) o por radiólisis. No obstante, las tendencias más avanzadas están en el diseño de nanoestructuras óptimas, controlando su forma (triángulos, *nanoshells* (Wang, 2007)), o construyendo estructuras periódicas mediante litografía de nanoesferas o de haz de electrones, o recubriendo esferas dieléctricas debidamente empaquetadas con películas metálicas (Willets, 2007). Cabe decir que también en la síntesis de nanopartículas metálicas mediante métodos químicos se está alcanzando un control muy elevado de la morfología de las mismas (Pastoriza-Santos, 2008), por lo que no debe olvidarse esta vía de producción para obtener sustratos SERS.

### 1.2. Detección SERS y/o SEIRA de moléculas que interactúan con los sustratos metálicos

Las interacciones metal-adsorbato juegan un importante papel en la obtención de espectros SERS. En (Guerrini, 2007) puede encontrarse una revisión sobre el tema que parte de la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio SERS y/o SEIRA de diferentes moléculas que contienen átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno, y utilizando diferentes sustratos metálicos nanoestructurados. Para ilustrar este apartado vamos a describir tres casos de aplicación de dichas técnicas intensificadas a la detección de moléculas que se aproximan *per se* a las superficies metálicas. En todos los casos hay un gran interés en su identificación a niveles de traza (y cuantificación si es posible) debido a que son peligrosas para la salud.

#### 1.2.1) Dipicolinato cálcico (Piridin-2,6-dicarboxilato)

Es el biomarcador de las esporas de ántrax (*Bacillus anthracis*), material muy peligroso que puede ser utilizado en la guerra química (realmente se ha trabajado con esporas de *Bacillus subtilis*, que no son peligrosas). Este biomarcador muestra afinidad por la plata, interactuando con ella a través de los oxígenos del grupo carboxilo. Para su detección mediante SERS se utilizan, como sustratos metálicos nanoestructurados, películas de plata depositadas sobre nanoesferas, con tamaño de estas últimas optimizado para obtener una mayor eficiencia SERS al excitar los espectros en infrarrojo próximo, región en la que las muestras presentan menor fondo fluorescente. El límite de detección determinado a partir de la intensidad de la banda SERS del dipicolinato a  $1020\text{ cm}^{-1}$ , es de  $2.6 \times 10^3$  esporas (inferior a la dosis de  $10^4$  esporas

considerada peligrosa), para un tiempo de detección de 1 minuto y 50 mw de potencia del láser (Zhang, 2006). Supone una mejora considerable respecto de resultados previos en detección SERS del biomarcador, que eran 200 veces menos sensibles y requerían potencias de láser 3 veces mayores. Recientemente, en el mismo grupo de investigación de la Northwestern University (Illinois, USA) liderado por el Prof. Richard P. Van Duyne, se han introducido mejoras en los sustratos, con lo que el límite de detección se ha podido rebajar hasta  $1.4 \times 10^3$  esporas (Willets, 2007).

### 1.2.2) Tiram y ziram

Son pesticidas de la familia de los dimetil-ditiocarbamatos (incluyen el grupo  $(Me)_2N-(CS)S$ ) utilizados en agricultura, irritantes para la piel y las mucosas. Una exposición crónica a los mismos puede tener efectos cancerígenos y teratógenos. Y dada su baja solubilidad en agua resulta muy difícil eliminarlos del medioambiente. Es por ello que existe un gran interés en la detección de trazas de los mismos en suelos, aguas y alimentos, así como en conocer la forma química en que quedan retenidos, por ejemplo, cuando interaccionan con los metales del suelo. Hasta ahora estos pesticidas se analizan de forma indirecta, degradándolos a  $CS_2$  cuya concentración se determina por espectrofotometría y cromatografía de gases.

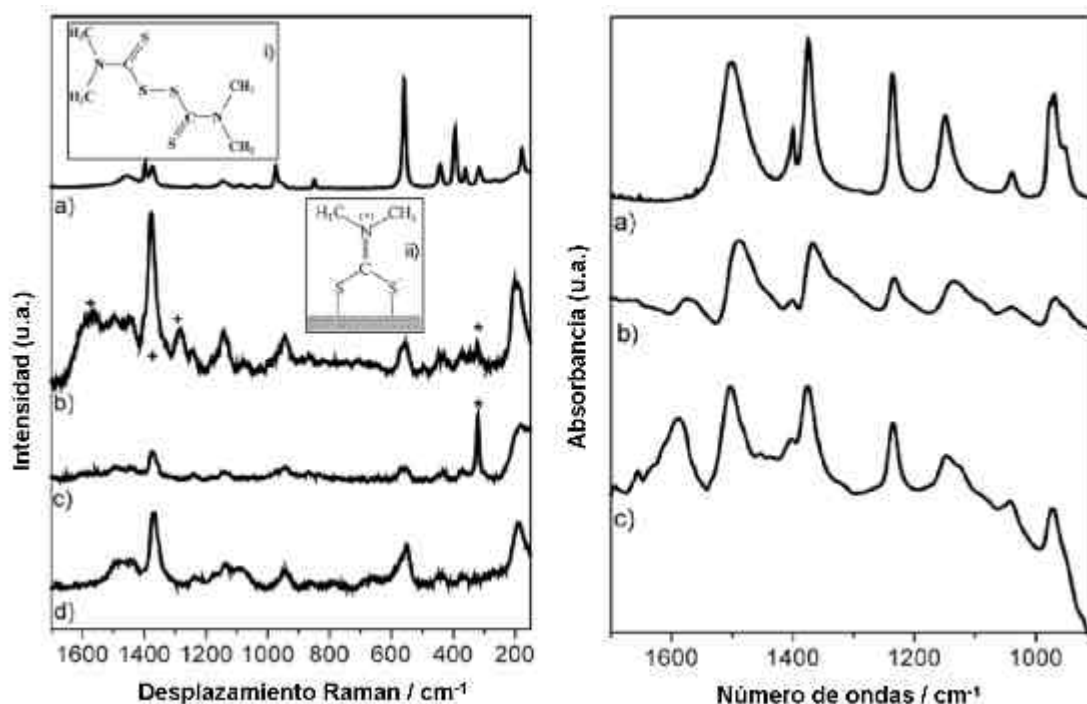


Figura 2. Espectros de tiram. *Izquierda*: a) Raman del sólido; b,c,d) SERS utilizando nanoestructuras de oro evaporadas sobre CaF<sub>2</sub> (b), depositadas con láser pulsado sobre CaF<sub>2</sub> (c) o sobre vidrio (d); \*) bandas de CaF<sub>2</sub>; +) bandas atribuidas a degradación parcial de los sustratos metálicos. Láser de excitación a 633 nm. i) Estructura molecular del tiram; ii) fragmento bidentado de tiram adsorbido sobre oro. *Derecha*: a) FTIR del sólido dispersado en KBr; b,c) SEIRA de las mismas muestras que SERS b) y c), respectivamente. Adaptada y reproducida con permiso (Domingo, 2007a). Copyright 2007 American Chemical Society.

Nosotros hemos llevado a cabo la detección de tiram y ziram mediante SERS y SEIRA, utilizando oro nanoestructurado producido por dos métodos diferentes: 1) evaporación sobre  $\text{CaF}_2$  (Sánchez-Cortés, 2001) y 2) deposición con láser pulsado sobre  $\text{CaF}_2$ , y sobre vidrio (Domingo, 2007a). Para obtener espectros SEIRA por transmisión es necesario que el soporte sea transparente a la radiación infrarroja (de ahí emplear  $\text{CaF}_2$ ), pero en el caso de la dispersión Raman (SERS), que no requiere esta condición, hemos probado también vidrio, ya que las características de las nanoestructuras metálicas que se forman dependen también del material soporte, y por lo tanto también puede ser diferente su eficiencia intensificadora. La figura 2 muestra los espectros correspondientes a 10  $\mu\text{l}$  de una disolución de tiram 0.001% en metanol depositada en una superficie de  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$  de los sustratos metálicos mencionados, tras evaporación del disolvente y posterior lavado con etanol. Un estudio cuidadoso de los espectros *intensificados* y la comparación con los espectros convencionales de las muestras sólidas nos permite proponer la estructura ii) como la que origina las características de los espectros observados sobre el oro. En breve, los cambios observados en SERS en la zona de  $600 \text{ cm}^{-1}$  confirman la ruptura del enlace S-S, la mayor intensificación en SEIRA de determinadas bandas indica una orientación perpendicular a la superficie del enlace C=N y de los grupos metilos, y la menor intensificación de otras bandas conduce a una orientación bastante paralela a la superficie del enlace C-S. Y todo ello, congruente con otras observaciones en SERS, solamente es posible si la especie responsable de los espectros intensificados es la estructura bidentada de la figura 2.

Tanto el tiram como el ziram interaccionan con el oro a través del azufre, pero los espectros nos informan sobre su distinta estabilidad en la superficie metálica (Sánchez-Cortés, 2001). El tiram se rompe y los fragmentos se anclan fuertemente a la superficie de oro de forma bidentada, mientras que el ziram es más estable y se fisisorbe, mayoritariamente, de forma débil sin romperse. Debido a que el mecanismo responsable de SEIRA es solamente electromagnético, es capaz de detectar tanto las moléculas fisisorbidas como la minoría de fragmentos quimisorbidos que se encuentran próximos a la superficie, mientras que SERS solamente detecta la forma quimisorbida, correspondiente a la menor parte de moléculas que se han roto. Es por ello que, pese a la menor intensificación de SEIRA, decimos que SEIRA tiene más sensibilidad que SERS para detección de ziram puesto que es capaz de detectar todas las especies presentes. Por último, acerca de los diferentes sustratos de oro nanoestructurados, podemos concluir que ambos tienen la misma eficiencia intensificadora (aunque la cantidad de oro y la morfología es distinta), y que los preparados por deposición con láser pulsado presentan ventajas ya que no se degradan al ser iluminados con el láser y proporcionan espectros SEIRA con bandas menos asimétricas (Domingo, 2007a).

### *1.2.3) 1-Nitropireno y 2-Nitrofluoreno*

Son derivados nitrados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (en inglés, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs). Los nitro-PAHs son agentes cancerígenos con mayor toxicidad que los propios PAHs. Pueden formar aductos con el DNA induciendo mutaciones, y también pueden interaccionar con las proteínas a través del grupo hemo. Se originan por nitración de los propios PAHs durante muchos procesos de combustión (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 (NO<sub>2</sub>). Los nitro isómeros de pireno y fluoreno más abundantes encontrados en la combustión de gasoil diesel son el 1-nitropireno y el 2-nitrofluoreno. Nosotros hemos abordado su detección mediante SERS y SEIRA, utilizando coloides de plata obtenidos por reducción con borohidruro (tanto en suspensión como inmovilizados), e islotes de oro depositados sobre germanio. Los espectros SERS se excitaron con láseres a 1064, 785 y 514 nm (Carrasco, 2003). Análisis detallados de sus espectros, completados con cálculos teóricos *ab initio*, nos permiten concluir que estos nitroderivados interaccionan con el metal a través de los oxígenos del grupo nitro que es coplanar con los anillos aromáticos, quedando perpendicularmente anclados a la superficie metálica aunque de forma distinta: en forma bidentada el 2-nitrofluoreno y en forma monodentada el 1-nitropireno. En el caso de las medidas SERS en suspensión, con dispositivo macro, el límite de detección alcanzado fue de 400 pg, correspondiente a la cantidad de nitro-PAHs presente en el volumen de  $\sim 1.6 \times 10^8 \text{ mm}^3$  analizado conteniendo una disolución  $10^{-6}\text{M}$  de los nitro-PAHs. En el caso de detección “en seco”, es decir, utilizando coloides inmovilizados la sensibilidad es mayor puesto que se puede utilizar dispositivo micro. En el área de  $2 \text{ mm}^2$  analizada con el objetivo 100X, se detectaron  $\sim 10^{-3}$  pg de los nitro-PAHs estudiados.

### 1.3. Detección SERS y/o SEIRA de moléculas sin afinidad por los sustratos metálicos: funcionalización de los mismos

Existe una gran cantidad de moléculas que no tienen grupos funcionales capaces de interaccionar con las superficies metálicas y cuya detección mediante SERS y/o SEIRA no es posible. En estos casos se puede acudir a funcionalizar bs metales con otras moléculas que sí interaccionan con el metal, formando monocapas auto-organizadas (en inglés *Self-assembled Monolayers, SAMs*) y que además presentan algún tipo de afinidad por la molécula a detectar. El objetivo es conseguir que esas moléculas “no activas” desde el punto de vista del metal, se aproximen lo suficiente a los sustratos metálicos nanoestructurados como para que “sientan” los grandes campos electromagnéticos locales que dan lugar a la intensificación de los espectros Raman y/o infrarrojo. Ilustraremos este apartado con otros tres casos de analitos de interés.

#### 1.3.1) Glucosa

Se aspira a disponer de medidores de glucosa en sangre en tiempo real y de forma continua, que puedan ser implantados en los pacientes. Los sensores SERS de glucosa más eficaces hasta el momento, han sido diseñados, construidos y probados *in vitro* e *in vivo* en el grupo del Prof. Van Duyne. Emplean unos agentes funcionalizadores que se anclan al sustrato metálico constituido por películas de plata sobre nanoesferas, pero que no “capturan” a la molécula de glucosa, sino que, actúan como fases de reparto (en inglés *partition layers*) de forma semejante a lo que hacen las fases estacionarias en cromatografía HPLC. Se trata de unos SAMs mixtos decanotiol/mercaptohexanol, con componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, que promueven el que la molécula de glucosa se aproxime a la plata para que se pueda detectar cuantitativamente mediante la intensidad de su banda SERS a  $1462 \text{ cm}^{-1}$ , pero que inmediatamente “sueltan” la glucosa, es decir, son reversibles en escalas de tiempo que permiten seguir en tiempo real la evolución de glucosa en sangre (Zhang, 2006). Este tipo de detección SERS de

glucosa de forma directa y cuantitativa presenta claras ventajas sobre otros sensores comerciales de glucosa, en los que la medida de la concentración de glucosa se basa en un método electroquímico indirecto.

### *1.3.2) Dimetilisoftalato (DMIP)*

Además de que es una molécula de gran interés en la química de polímeros, nosotros la hemos utilizado como molécula aromática modelo de las que no interactúan con metales. Y para su detección mediante SEIRA y/o SERS funcionalizamos la superficie metálica con SAMs de tioles sobre oro nanoestructurado, este último preparado por evaporación sobre germanio. El objetivo final era comprobar la eficacia de dichos SAMs para aproximar moléculas con anillos aromáticos a los sustratos metálicos (Domingo, 2003).

Llevamos a cabo estudios SEIRA y SERS de tres tioles de diferentes características: aromático (tiofenol), alifático de cadena corta (propanotiol) y alifático de cadena larga (octadecanotiol). El análisis de los espectros nos permitió deducir la orientación de los SAMs de los tres tioles respecto de la superficie de oro y, seguidamente, estudiamos los espectros intensificados del DMIP sobre los sustratos de oro funcionalizados. En primer lugar hay que decir que solamente fue posible observar espectros SEIRA del DMIP, tanto en transmisión como en reflexión. Si bien la intensificación fue modesta en todos los sustratos funcionalizados, del estudio de los correspondientes espectros se pudo deducir que el DMIP se intercala entre las moléculas del SAM de tiofenol, debido a una débil interacción  $\pi$ - $\pi$  entre sus respectivos anillos aromáticos. Sin embargo, cuando el oro está funcionalizado con propanotiol u octadecanotiol, el DMIP se coloca paralelo a la superficie, al extremo de la cadena alifática, por lo tanto más alejado de la superficie en el caso de la cadena más larga. Se concluye que sustratos de oro funcionalizados con tiofenol sería la mejor opción para detección SEIRA de moléculas con anillos aromáticos.

La ausencia de espectros SERS de DMIP sobre sustratos nanoestructurados de oro, tanto "limpios" como funcionalizados con tioles, se atribuye a la no suficiente proximidad del DMIP a los mismos. Sin embargo, esa misma proximidad permite obtener unos espectros SEIRA de muy buena calidad. Una vez más se pone de manifiesto que aunque la intensificación en SEIRA es mucho menor que en SERS, al ser la espectroscopía infrarroja "sin metal" bastante más sensible que la espectroscopía Raman convencional, SEIRA puede ser la técnica de detección a elegir en algunos casos "rebeldes" desde el punto de vista SERS.

### *1.3.3) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)*

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 de otras sustancias orgánicas como tabaco o carne a la brasa. 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 y que, preferentemente, no requiera manipulación de las muestras (hasta ahora el método que se utiliza es la cromatografía) y pueda ser aplicado *in situ*. Ya hemos visto anteriormente que hemos tenido éxito en la detección SERS y SEIRA de nitro-PAHs, debido a que el grupo nitro interacciona con la plata y el oro. Sin embargo no es posible detectar los PAHs mediante las mismas técnicas, por lo que hay que recurrir a funcionalizar los sustratos metálicos.

En este sentido, 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. Más en concreto, los calixarenos son moléculas de este tipo que han atraído mucha atención recientemente. Son ciclooligómeros sintéticos formados por condensaciones fenol-formaldehído. Tienen forma de cáliz con dos bordes (superior e inferior) y un anillo central bien definidos 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. 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.

Nosotros hemos funcionalizado coloides de plata (en suspensión e inmovilizados), e islotes de oro obtenidos por evaporación, con diversos calix[4]arenos, que tienen 4 grupos tert-butilo en el borde superior y diferentes sustituyentes en el anillo inferior, a saber: 4 grupos hidroxilo (TOHC); 4 grupos carboetoxi (TCEC); 2 grupos carboetoxi y 2 hidroxilo alternados (DCEC); 4 grupos ciano (TCNC); 2 grupos ciano y 2 hidroxilo alternados (DCNC) (ver estructuras en la figura 5). Y hemos empleado los sustratos metálicos funcionalizados para tratar de detectar los siguientes PAHs: antraceno, dibenzoantraceno, pireno, benzo[c]fenantreno, trifenileno, coroneno, criseno y rubiceno (ver estructuras en la figura 6). La elección de estos PAHs, con diferente número de anillos y formas diferentes, iba encaminada a estudiar la posible selectividad de los calix[4]arenos en “capturar” unos u otros PAHs, para elucidar si existe algún tipo de reconocimiento molecular entre la molécula hospedadora y la molécula huésped.

Como ejemplo de los resultados obtenidos, en la figura. 3 se presenta el espectro Raman del DCEC en estado sólido y los espectros SERS de dicha molécula adsorbida sobre coloide de plata en suspensión (láser de excitación a 1064 nm) e inmovilizado (excitación a 785 nm) (García-Ramos, 2007). 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 éster del borde inferior, adoptando una orientación específica en la que los grupos tert-butilo están lejos de la superficie. Las dos líneas de excitación láser 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 se pudieron detectar PAHs en disoluciones  $10^{-6}$  M. Además, los espectros SERS de los PAHs en los complejos con

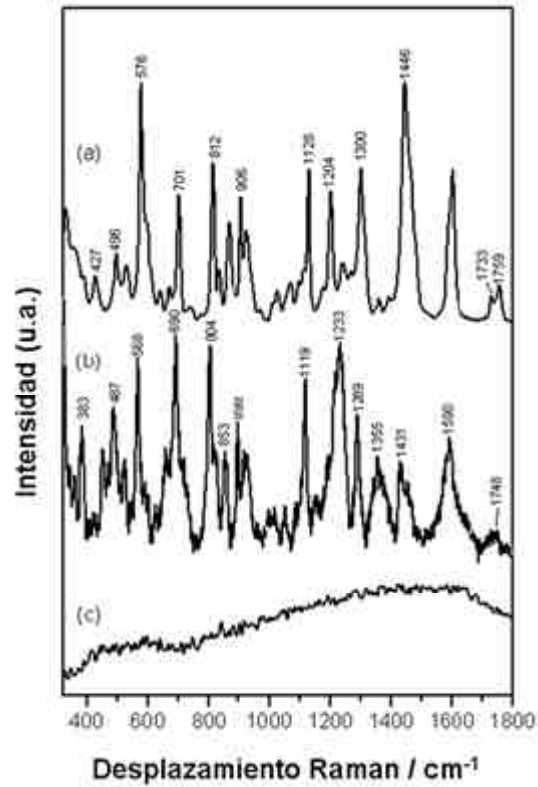
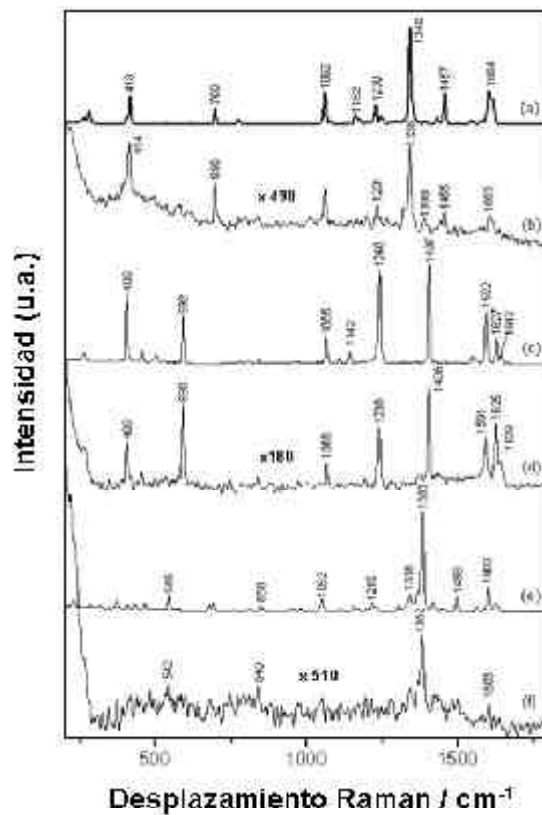


Figura 3. Espectro Raman de DCEC sólido excitando a 1064 nm (a) y SERS de DCEC (10<sup>-4</sup> M) sobre coloide de Ag a 785 (b) y 1064 nm (c). Reproducida con permiso (García-Ramos, 2007).



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 p – p entre los sistemas aromáticos del DCEC y los PAHs (Leyton, 2005a, 2005b)

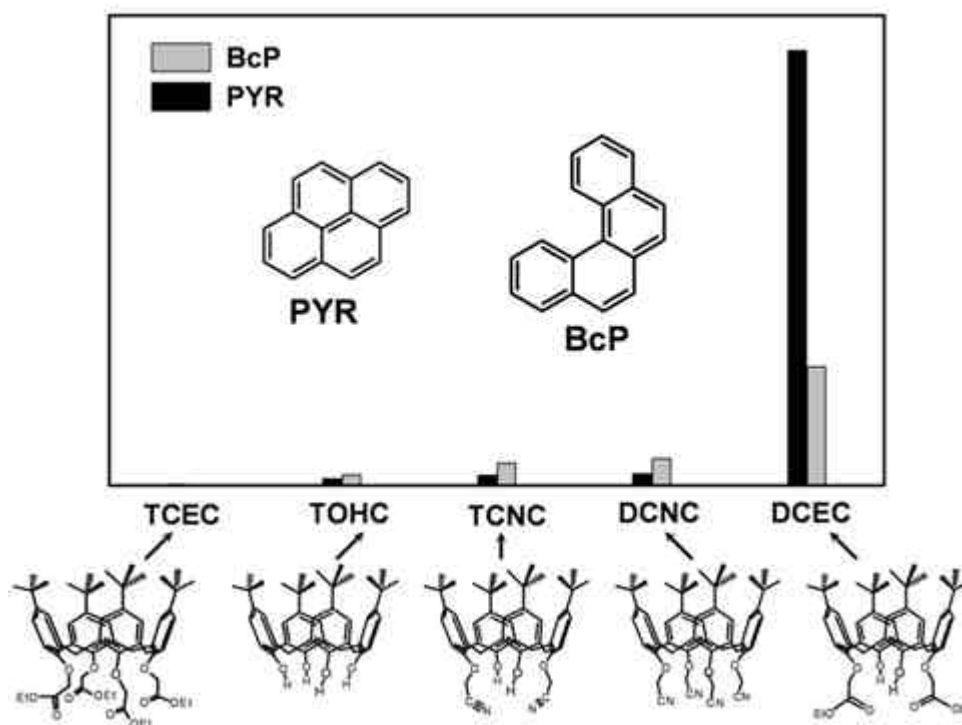


Figura 5. Áreas normalizadas (respecto a la banda a 1405 cm<sup>-1</sup> del pireno (PYR) en el complejo con DCEC) de las bandas SERS más intensas de pireno y benzo[*c*]fenantreno (BcP) (10<sup>-4</sup> M) en los diferentes calixarenos. Reproducida con permiso (Domingo, 2007b), Copyright 2007 American Chemical Society.

De acuerdo con la intensidad de las bandas SERS de cada PAH en los diferentes complejos PAH-calix[4]areno, puede establecerse que existe selectividad en el reconocimiento molecular entre unos y otros, jugando un importante papel el tamaño y la estructura química del PAH (Leyton, 2004). La figura 5 ilustra dicha selectividad para el caso de pireno y benzo[*c*]fenantreno: el DCEC resulta ser el más eficaz para su detección. Más aún, en la figura 6 puede verse que el DCEC es especialmente selectivo para pireno. Y en todo ello interviene el hecho de la forma en que cada calixareno se ancla a la superficie metálica, información que se extrae de los cambios observados en los espectros SEIRA. Es este un claro ejemplo de la complementariedad de las técnicas SERS y SEIRA: el pireno se detecta en un sensor SERS, utilizando el DCEC como agente funcionalizador de la superficie metálica, pero es la técnica SEIRA la que nos permite conocer el por qué de la selectividad mencionada: el DCEC se ancla al metal en forma bidentada a través de los oxígenos del grupo éster por lo que la cavidad y los tert-butilos del borde superior adoptan una disposición bastante abierta en la que se puede acomodar el pireno. Sin embargo el TCEC, por impedimentos estéricos en el borde inferior, únicamente puede anclarse a la superficie metálica en forma monodentada, lo

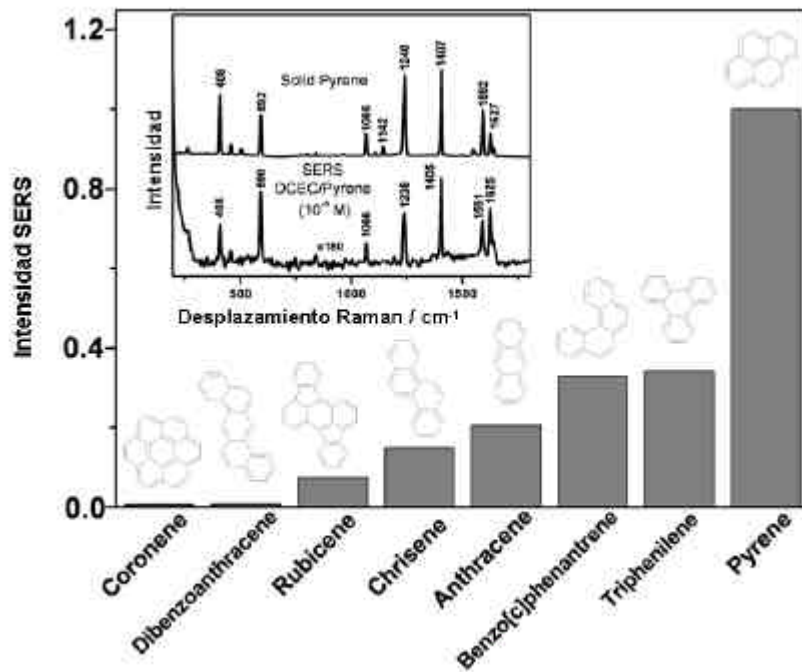


Figura 6. Áreas normalizadas (respecto a la banda a 1405  $\text{cm}^{-1}$  del pireno en el complejo con DCEC) de las bandas SERS más intensas de los PAHs estudiados ( $10^{-4}$  M) en DCEC ( $10^{-4}$  M). Láser de excitación a 1064 nm. Adaptada y reproducida con permiso (Domingo, 2007b), Copyright 2007 American Chemical Society.

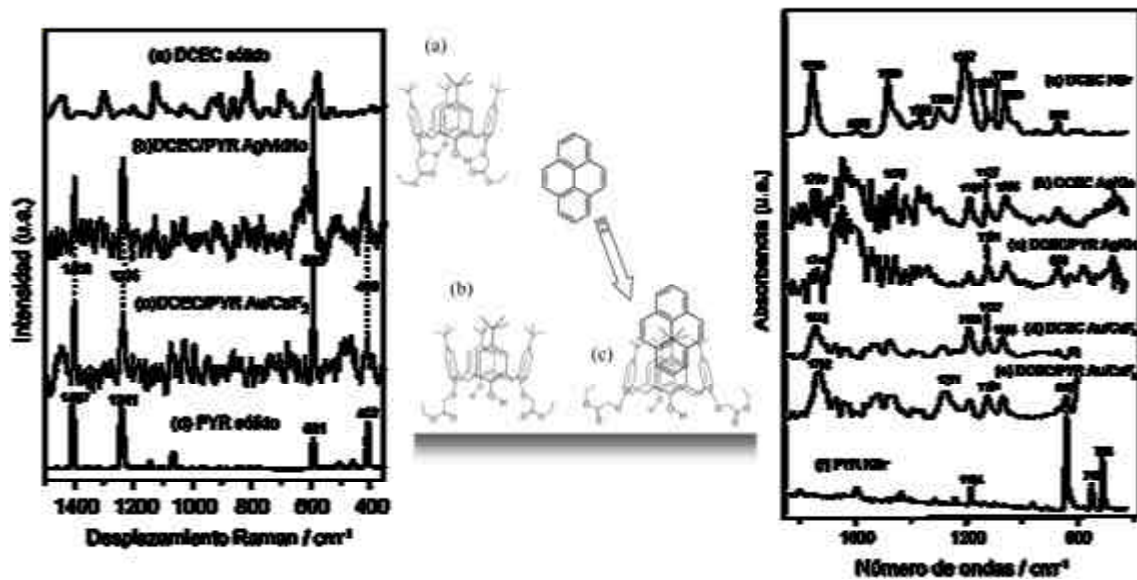


Figura 7. Izquierda: Espectro Raman de DCEC sólido (a); espectro SERS del complejo DCEC/PYR en Ag/vidrio (b) y en Au/CaF<sub>2</sub> (c); espectro Raman de pireno sólido. Láser de excitación a 785 nm. Derecha: Espectro FTIR de DCEC (a) y de PYR (f) sólidos en KBr; espectro SEIRA de DCEC en Ag/Ge (b) y Au/CaF<sub>2</sub> (d); espectro SEIRA del complejo DCEC/PYR en Ag/Ge (c) y Au/CaF<sub>2</sub> (e). Todos los espectros son de transmisión. Centro: DCEC (a) y adsorción en la superficie metálica del DCEC (b) y del complejo DCEC/PYR, deducida de los correspondientes espectros SEIRA. Adaptada y reproducida con permiso (Leyton, 2005b), Copyright 2005 American Chemical Society.

que origina una disposición más cerrada de la parte superior que no permite la “entrada” del pireno. Cuando se añade el pireno, el complejo DCEC-pireno formado pasa a anclarse en forma monodentada, lo cual se deduce también de los cambios observados en los espectros SEIRA correspondientes (ver figura 7).

En un paso posterior hemos sintetizado y probado un nuevo calix[4]areno con dos grupos ditiocarbamato y 2 grupos hidroxilo alternados en el borde inferior. El nuevo calixareno se ancla de forma monodentada a la superficie metálica a través de uno de los azufres del grupo ditio, pero cuando se añade pireno, el complejo resultante se ancla de forma bidentada con los dos azufres del grupo ditio. Hemos comprobado que con este nuevo sustrato funcionalizado se disminuye en dos órdenes de magnitud el límite de detección SERS de pireno, de manera que, para las mismas condiciones de observación del espectro que en el caso del complejo con DCEC, es posible detectarlo en una disolución  $10^{-8}$  M (Guerrini, 2006).

En conclusión, la selectividad de los calixarenos en la detección SERS de PAHs está basada en el tamaño de la cavidad, y en la forma de interaccionar los sustituyentes del borde inferior con el sustrato metálico nanoestructurado.

## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**

Se han presentado brevemente los fundamentos de las espectroscopías vibracionales intensificadas por superficies metálicas nanoestructuradas, basadas en los enormes campos electromagnéticos locales que origina la excitación resonante de los plasmones superficiales localizados que soportan dichas nanoestructuras, así como los métodos de preparación de las mismas. Se ha ilustrado con algunos ejemplos la detección SERS y/o SEIRA de algunas moléculas de interés biológico y/o medioambiental, utilizando tanto sustratos metálicos puros como funcionalizados de diversas maneras. Queda demostrada la utilidad de dichas técnicas en la fabricación de sensores moleculares, con especial hincapié en la selectividad que puede alcanzarse utilizando agentes funcionalizadores adecuados. El diseño y fabricación de sensores moleculares basados en estas técnicas intensificadas es un campo de investigación (y aplicación) en auge, en el que se aúnan los esfuerzos de investigadores teóricos y experimentales para diseñar y fabricar nanoestructuras metálicas con mayor eficiencia intensificadora, utilizando nuevos métodos de producción de las mismas y eficaces métodos de funcionalización, a la vez que se genera la tecnología necesaria para que los correspondientes sensores moleculares lleguen a ser comercializados.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Educación y Ciencia de España (Proyectos FIS2004-00108 y FIS2007-63065) y de la Comunidad de Madrid (Proyecto MICROSERES, S-0505/TIC-0191). L.G. agradece la beca I3P concedida por el CSIC y Z.J. agradece al “VI Programa Marco” de la Unión Europea la “Marie Curie Early Stage Research Training Fellowship” concedida dentro del Contrato MEST-CT-2004-513915.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aroca, R.F., Ross, D.J., Domingo, C., (2004): *Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy*, Appl. Spectrosc. 58, 324A-338A.
- Aroca, R., (2006): *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester
- Cañamares M.V., Sánchez-Cortés S., Gómez-Varga J.D., Domingo C., García-Ramos J. V., (2005): *Comparative study of the morphology, aggregation, adherence in glass and SERS activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag<sup>+</sup> using citrate and hydroxylamine*, Langmuir 21, 8546-8553.
- Cañamares M. V., García-Ramos J. V., Gómez-Varga J. D., Domingo C., Sánchez-Cortés S., (2007): *Ag nanoparticles prepared by laser photoreduction as substrates for in situ Surface-enhanced Raman Scattering analysis of dyes*, Langmuir 23, 5210-5215.
- Carrasco, E. A., Campos-Vallette M., Leyton P., Diaz G., Clavijo R.E., García-Ramos J.V., Inostroza N., Domingo C., Sánchez-Cortés S., Koch R., (2003): *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.
- Domingo C., García-Ramos J.V., Sánchez-Cortés S., Aznarez J.A., (2003): *Surface-enhanced infrared absorption of DMIP on gold-germanium substrates coated by self-assembled monolayers*, J. Mol. Struct. 661-662, 419-427.
- Domingo C., Resta V., Sánchez-Cortés S., García-Ramos J.V., Gonzalo J., (2007a): *Pulsed laser deposited Au nanoparticles as substrates for Surface-enhanced vibrational spectroscopy*, J. Phys. Chem. C 111, 8149-8152.
- Domingo, C., Guerrini, L., Leyton, P., Campos-Vallette, M., García-Ramos, J.V., Sánchez-Cortés, S., (2007b): *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Surface-Enhanced Infrared Absorption based molecular sensors* en "New Approaches in Biomedical Spectroscopy", K. Kneipp, R. Aroca, H. Kneipp y E. Wentrup-Byrne, Eds. ACS Symposium Series 963, American Chemical Society, Washington, pp 138-151.
- García-Ramos, J. V., Sánchez-Cortés S., Leyton P., Campos-Vallette M., (2007): *Detección de PAHs mediante espectroscopía SERS sobre superficies metálicas funcionalizadas con calixarenos*, Opt. Pura Apl. 40, 227-233.
- Guerrini L., Domingo C., García-Ramos J. V., Sánchez-Cortés S., (2006): *Silver nanoparticles functionalized by a dithiocarbamate calix[4]arene derivative: An effective supramolecular host for the Surface-enhanced Raman Scattering detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Langmuir 22, 10924-10926.
- Guerrini L., Jurasekova J., Domingo C., Pérez-Méndez M., Leyton P., Campos-Vallette M., García-Ramos J.V., Sánchez-Cortés S., (2007): *Importance of metal-adsorbate interactions for the Surface-enhanced Raman Scattering of molecules adsorbed on plasmonic nanoparticles*, Plasmonics 2, 147-156.
- Leyton P., Sánchez-Cortés S., García-Ramos J. V., Domingo C., Campos-Vallette M., Saitz C., Clavijo R. E., (2004): *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, 17484-17490.
- Leyton P., Sánchez-Cortés S., Campos-Vallette M., Domingo C., García-Ramos J. V., Saitz C., (2005a): *Surface-enhanced micro-Raman detection and*

*characterization of calix[4]arene-polycyclic aromatic hydrocarbon host-guest complexes*, Appl. Spectrosc., 59, 1009-1015.

- Leyton P., Domingo C., Sánchez-Cortés S., Campos-Vallette M., García-Ramos J. V., (2005b): *Surface enhanced vibrational (IR and Raman) spectroscopy in the design of chemosensors based on ester functionalized p-tert-butylcalix[4]arene hosts*, Langmuir 21, 11814-11820.
- Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M., (2008): *Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges*", J. Mater. Chem. (en prensa).
- Sánchez-Cortés, S., García-Ramos, J. V., (2000): *Adsorption and chemical modification of phenols on silver surface*, J. Colloid and Interface Science 231, 98-106.
- Wang H., Kundu J., Halas N.J., (2007): *Plasmonic nanoshell arrays combine Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopies on a single substrate*, Angew. Chem. Inter. Ed., 46, 9040-9044.
- Willets K.A., Van Duyne, R.P., (2007): *Localized Surface Plasmon Resonance spectroscopy and sensing*, Annu. Rev. Phys. Chem. 58, 267-297.
- Zhang, X., Shah, N. C., Van Duyne, R. P., (2006): *Sensitive and selective chem/bio sensing based on Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)*, Vib. Spectrosc. 42, 2-8.