

INFORME FINAL

Proyecto de Investigación

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

DOCUMENTO 1

Evaluación de proteínas humanas de interés biomédico mediante espectroscopía de Raman

Investigadores participantes

Lic.-Ing. Silvia Arce-Solano (Escuela de Biología)
Dr. Erick Hernández-Carvajal (Escuela de Biología)
Dr. Dionisio Gutiérrez-Fallas (Escuela de Física)
Dr. Ernesto Montero-Zeledón (Escuela de Física)

Autor:

Dr. Ernesto Montero Zeledón

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Abril 2024

Tabla de contenido

1.	Código y título del proyecto	1
2.	Autores y direcciones	1
3.	Resumen	1
4.	Palabras clave	2
5.	Introducción	3
6.	Marco teórico	5
7.	Metodología	6
7.1	Obtener los conectores interdominio a1 y a3 del FVIII humano, de manera heteróloga mediante técnicas biotecnológicas.....	8
7.2	Establecer el protocolo de síntesis de las nanopartículas de plata mediante métodos químicos.....	8
7.3	Implementar una metodología para la aplicación de la espectroscopía Raman en la identificación de proteínas.....	9
8.	Resultados	9
8.1	Resultados relacionados con el objetivo específico 1	9
8.2	Resultados relacionados con el objetivo específico 2	10
8.2.1	Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)	10
8.2.2	Caracterización de las nanopartículas de plata	12
8.3	Resultados relacionados con el objetivo específico 3	15
8.3.1	Establecimiento del protocolo para la preparación del coloide acuoso proteína-AgNP	15
8.3.2	Estudio de la relación óptima entra la muestra y las nanopartículas	16
8.3.3	Tratamiento de los substratos para la colocación de la muestra.....	17
8.3.4	Preparación de la muestra para los ensayos.....	18
8.3.5	Determinación de las condiciones experimentales óptimas de medición	19
8.3.6	Obtención de los espectros y valoración.....	21
8.3.7	Identificación de las vibraciones características de los espectros de las proteínas y relación de las vibraciones características con la composición de las proteínas	23
9.	Discusión y conclusiones	24
10.	Recomendaciones.....	26
11.	Agradecimientos.....	26
12.	Referencias	27
13.	Anexos	29
13.1	Certificados de participación en el Bilateral Workshop CR-Taiwan	29
13.2	Resúmenes de la participación en el XIII SCiMAN	30

1. Código y título del proyecto

Código: 1450017

Título: Evaluación de proteínas humanas de interés biomédico mediante espectroscopía de Raman.

2. Autores y direcciones

Autor	Grado Académico	Dirección
Dionisio Gutiérrez Fallas (Coordinador-Jubilado)	Doctorado	Escuela de Física digutierrez2008@gmail.com
Ernesto Montero Zeledón (Investigador)	Doctorado	Escuela de Física emontero@tec.ac.cr
Silvia Arce Solano (Investigadora)	Licenciatura	Escuela de Biología sarce@tec.ac.cr
Erick Hernández Carvajal (Investigador)	Doctorado	Escuela de Biología erhernandez@tec.ac.cr
Juan Teodomiro López Navarrete (Colaborador <i>ad honorem</i>)	Doctorado	Universidad de Málaga teodomiro@uma.es

3. Resumen

A pesar de su importancia médica y el alto costo que generan en los sistemas de salud, algunas enfermedades, como las cardiovasculares y la hipertensión, siguen representando una carga económica significativa. Estas patologías, principales causas de morbilidad y mortalidad en países desarrollados y en vías de desarrollo, están relacionadas con la formación de coágulos sanguíneos, cuyo proceso molecular aún no se comprende completamente. Conocer en profundidad la formación de fibrina, mediada principalmente por la trombina, y las mutaciones en el factor VIII, especialmente en pacientes con hemofilia A, es fundamental para avanzar hacia tratamientos personalizados y mejorar los protocolos diagnósticos. La identificación de proteínas clave en la coagulación, como trombina y factor VIII, es crucial para entender sus mecanismos de interacción. En este contexto, la espectroscopía Raman, particularmente en su variante SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), ha emergido como una técnica rápida y efectiva para la detección de proteínas biomédicas, gracias a su sensibilidad mejorada mediante nanopartículas metálicas. En este trabajo, se logró sobreexpresar, purificar y analizar proteínas humanas relevantes, como FVIIIa1, FVIIIa3 y trombina, mediante espectroscopía Raman SERS en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Imagen y Color de la Escuela de Física. La implementación de esta metodología permite realizar análisis preliminares de proteínas de forma rápida y

eficiente, facilitando futuras investigaciones en el campo biomédico. La evolución tecnológica de la técnica amplía su potencial para caracterizar materiales biológicos, contribuyendo a la detección temprana y al desarrollo de protocolos más sencillos, precisos y adaptados a las necesidades clínicas.

4. Palabras clave

Enfermedades cardiovasculares, proteínas humanas, espectroscopia RAMAN, SERS, identificación de proteínas.

5. Introducción

El mejoramiento de la calidad de vida es uno de los aspectos a los que actualmente nuestra sociedad dirige gran cantidad de sus recursos. Costa Rica cuenta con un sistema de salud que ha sido utilizado frecuentemente como modelo en América Latina, sin embargo, no escapa a los grandes problemas administrativos y de calidad de servicio que constantemente son tema de discusión.

Particularmente, las enfermedades del sistema circulatorio continúan siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, elevándose su incidencia en países en vías de desarrollo. Se ha observado que un evento común que desencadena las dos manifestaciones más frecuentes y dañinas de las dolencias cardiovasculares, *la isquemia cardíaca* (o infartos) y el *derrame cerebrovascular*, es la formación de coágulos sanguíneos que interrumpen el suministro de oxígeno y nutrientes al corazón y al cerebro, respectivamente. Por su elevada incidencia, resulta evidente que cualquier avance destacado en la investigación redundará, a mediano o largo plazo, en importantes beneficios sanitarios y económicos. Es deber de nuestra institución retribuir la confianza y asignación de recursos por parte del estado, mediante el estudio y solución de problemas que conlleven al mejoramiento de la calidad de vida de los costarricenses, así como, contribuir a la formación de profesionales con la conciencia de contribuir a la solución de problemas de índole social.

El TEC ha respondido directamente a la solución de muchas de las necesidades de nuestro país en los diferentes aspectos de la ingeniería, y es hasta en los últimos 8 a 10 años que en el tema de salud se conocen algunos de los aportes del TEC mediante investigaciones realizadas en las escuelas de Biología, Química, Física e Ingeniería en Electrónica, entre otras. Por otra parte, la Escuela de Física ha desarrollado algunas áreas de investigación aplicada como Plasmas y Física de Materiales, y en 2018 abrió la carrera de Ingeniería Física. Es aquí, a través de la espectroscopía, que se ve una oportunidad de contribuir con el desarrollo de la Física Aplicada a la solución de los problemas que aquejan a nuestra sociedad, particularmente en la caracterización de moléculas de interés biomédico, ya que de los espectros característicos que se obtienen mediante la espectroscopía Raman y la espectroscopía UV es posible obtener información muy valiosa sobre las moléculas orgánicas, no solo de su constitución sino también de su interacción con otros agentes. En el caso de la espectroscopía Raman, dado que el material biológico presenta algunas singularidades para su caracterización, se requiere la adaptación de una metodología conocida como SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) (Siddhanta y Narayana 2012, Han *et al.* 2010, Tian 2005), en la cual se favorece un incremento de la señal Raman mediante el contacto de la muestra con materiales metálicos. Existen muchas formas para lograr este contacto, tales como el uso de sustratos metálicos o la inclusión de nanopartículas metálicas en la preparación de la muestra.

Dentro de las ventajas de utilizar la espectroscopía Raman con respecto a los métodos tradicionales de caracterización está que los ensayos requieren periodos cortos de tiempo, son confiables y de bajo costo si se cuenta con el equipamiento. Además, la espectroscopía Raman no se ve afectada por la presencia de agua, como ocurre con la espectroscopía infrarroja. Esta es una característica que favorece el análisis del material biológico; sin embargo, la técnica se ve perjudicada por un fenómeno de luminiscencia, al ser las muestras expuestas a la radiación electromagnética. Es aquí donde, para minimizar el efecto de la “fluorescencia”, se utiliza la técnica SERS.

La caracterización de proteínas de interés biomédico nos permite desarrollar la metodología y establecer los protocolos para utilizar esta novedosa técnica como complemento de las técnicas tradicionales, y quizás en algunos casos, pretender substituir los procedimientos actuales. Esta investigación aprovechó la experiencia en la producción de proteínas humanas del Centro de Investigación en Biotecnología, así como la experiencia desarrollada en el Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Imagen y Color de la Escuela de Física en el uso de la espectroscopía Raman para el análisis del material biológico.

Las proteínas utilizadas, factor VIII (FVIII) y trombina, fueron seleccionadas por su papel fundamental en el mecanismo molecular del proceso de coagulación de la sangre. El objetivo general de la investigación consistió en la identificación de los conectores del factor VIII humano mediante espectroscopía Raman, para posteriores ensayos con trombina. Para cumplir este propósito, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener los conectores interdominio a1 y a3 del FVIII humano, de manera heteróloga mediante técnicas biotecnológicas.
2. Establecer un protocolo de la síntesis de las nanopartículas de plata mediante métodos químicos.
3. Implementar una metodología para la aplicación de la espectroscopía Raman en la identificación de proteínas.

6. Marco teórico

La espectroscopía Raman es una técnica que se ha desarrollado desde hace muchos años, a partir del descubrimiento del fenómeno de dispersión de la luz al incidir sobre las moléculas de una muestra. Sin embargo, gracias al acelerado desarrollo tecnológico de estas últimas décadas, específicamente en la tecnología de los láseres y el mejoramiento de los detectores y los dispositivos ópticos, se han diversificado las aplicaciones de la técnica, especialmente por la información que esta técnica brinda de la geometría molecular y de cómo los átomos están enlazados, lo que permite la identificación de las especies químicas en una muestra e inclusive, la diferenciación entre sustancias que tienen diferentes estructuras pero que comparten la misma fórmula química (Dieing et al., 2011).

En el uso, la espectroscopía Raman ha mostrado varias ventajas: en ocasiones no se requiere de una preparación especial de la muestra, los ensayos suelen requerir poco tiempo y se utilizan pequeñas cantidades de muestra. Sin embargo, esta técnica también presenta algunas dificultades: la señal característica de los diferentes enlaces es generalmente de baja intensidad, por lo que se ve fuertemente afectada cuando la muestra presenta algún fenómeno de luminiscencia (específicamente la fluorescencia). También, la muestra puede experimentar cambios durante el análisis (en la estructura molecular, deterioro o calentamiento), además, para cierto tipo de moléculas no se pueden observar vibraciones con esta metodología. Específicamente, en muestras de origen biológico es frecuente el fenómeno de fluorescencia (Popp et al., 2011) y la observación de cambios físicos en la muestra, lo que requiere una búsqueda especial de condiciones para poder observar los espectros característicos de la muestra.

Es posible reducir los efectos de algunos de los fenómenos mencionados. Por ejemplo, la correcta selección del láser y el establecimiento de la potencia de trabajo pueden contribuir a eliminar los cambios físicos que experimenta la muestra; así como establecer las condiciones para observar el espectro característico del material. También, es posible activar los puntos en los que se presenta el efecto Raman mediante el contacto de la muestra con materiales metálicos, favoreciendo la interacción del campo eléctrico generado por el láser con los electrones del metal. Esta interacción, conocida como resonancia de plasmones, incrementa la intensidad de la señal del efecto Raman, permitiendo observar la información característica de las moléculas; a esta técnica se le conoce como SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) (Tian, 2005). Esta técnica SERS requiere de una preparación especial de la muestra y de encontrar las condiciones experimentales adecuadas para realizar la medición. Además, la metodología aplicada para el análisis de muestras biológicas se encuentra limitada por muchos aspectos, principalmente la sensibilidad necesaria para la identificación de las moléculas, la interacción entre el substrato o partículas metálicas y la muestra, así como las características propias del material biológico a ser analizado.

Para el tipo de muestra propuesto (proteínas), son necesarios cinco procesos: a) Producción de las proteínas con un grado de pureza y a una concentración adecuada b) preparación de las partículas metálicas (tamaño, forma y naturaleza), c) preparación de las muestras a ser observadas, d) condiciones adecuadas para realizar las mediciones (láser, potencia, tiempo de exposición) y e) análisis de los espectros característicos (búsqueda de las vibraciones que puedan ser asociadas a cambios en la estructura de las proteínas).

Actualmente, para cada uno de los procesos se encuentra en la literatura una gran variedad de procedimientos que son adecuados dependiendo de la muestra y de la disponibilidad de equipo y recursos (Stöckel et al., 2015). Por ello, dada la experiencia desarrollada en el LEMIC de la Escuela de Física, específicamente con la síntesis de nanopartículas de plata, se realizaron ensayos para determinar las características físicas adecuadas, de tamaño y forma, de las nanopartículas que permitan identificar las proteínas obtenidas en el Centro de Investigación en Biotecnología.

7. Metodología

La participación del investigador Ernesto Montero Zeledón y la del coordinador Dionisio Gutiérrez Fallas, estaba relacionada con los objetivos específicos 2 y 3. Del primer objetivo son responsables los profesores de la Escuela de Biología. A continuación, se presenta el plan de acción del proyecto “Evaluación de proteínas humanas de interés biomédico mediante espectroscopía de Raman” presentado a la VIE. El objetivo general del proyecto fue “Identificar los conectores del factor VIII humano mediante espectroscopía Raman, para posteriores ensayos con trombina”. La Tabla 1. presenta la codificación de la responsabilidad y de los participantes, mientras que la Tabla 2. muestra los responsables de las actividades y los productos asociados con los objetivos específicos.

Tabla 1. Codificación de la responsabilidad y de los participantes del proyecto.

Código de nivel de responsabilidad	Código de participantes
E: Ejecutar P: Participar S: Supervisar	EH: Erick Hernández SA: Silvia Arce DG: Dionisio Gutiérrez EM: Ernesto Montero JT: Juan Teodomiro AB: Estudiante asistente de Biología AF: Estudiante asistente de Física

Tabla 2. Responsables de las actividades y los productos asociados con cada objetivo específico.

Objetivo Específico	Productos	Actividades	Encargados de la actividad y nivel de responsabilidad
1. Obtener los conectores interdominio a1 y a3 del FVIII humano, de manera heteróloga mediante técnicas biotecnológicas.	Obtención de las proteínas puras y evaluadas en cuanto a pureza, concentración e identidad.	1. Extracción y purificación de las proteínas producidas en cepas de <i>Escherichia coli</i> .	EH (S) SA (E) AB (E)
		2. Evaluación la pureza de las proteínas recombinantes.	EH (E, S) SA (E) AB (E)
		3. Determinación de la concentración de las proteínas.	EH (S) SA (E) AB (E)
		4. Caracterización de las proteínas mediante espectrometría de masas.	EH (E, S) SA (E) AB (E)
2. Establecer el protocolo de síntesis de las nanopartículas de plata mediante métodos químicos.	Nanopartículas de plata con variedad de tamaños.	1. Selección del método de preparación de las nanopartículas para este tipo de muestras.	DG(E) EM(E)
		2. Ensayos para definir el diseño experimental de preparación de las nanopartículas.	DG(E,S) EM(E,S) AF(E)
		3. Preparación de las nanopartículas.	DG(E,S) EM(E,S) AF(E)
		4. Determinación de las distribuciones de tamaños y morfología de las nanopartículas (TEM, análisis óptico de las micrografías, UV).	EM(E,S) AF(E)
3. Implementar una metodología para la aplicación de la espectroscopía Raman en la identificación de proteínas.	Muestras de proteínas preparadas para ser analizadas mediante SERS	1. Establecimiento del protocolo para la preparación del coloide acuoso proteína-AgNP.	DG(S) EM(S) AF(E)
		2. Estudio de la relación óptima de concentración entre la muestra y las nanopartículas.	DG(S) EM(S) AF(E)
		3. Tratamiento de esterilización de los substratos para la colocación de la muestra.	AF(E)
		4. Preparación de la muestra para los ensayos.	DG(E,S) EM(E,S) AF(E)
	Espectros Raman de las muestras.	1. Determinación de las condiciones experimentales de medición (longitud de onda del láser, tiempo de exposición, potencia, número de exposiciones, objetivo del microscopio).	DG(E,S) EM(E,S) AF(E)
		2. Obtención de los espectros.	DG(E,S) EM(E,S) AF(E)
		3. Valoración de los espectros (calidad, pertinencia)	DG(E) JT(E,S) EH(E)
	Vibraciones	1. Identificación de las vibraciones	DG(E) JT(E,S)

Objetivo Específico	Productos	Actividades	Encargados de la actividad y nivel de responsabilidad
	características identificadas	características de los espectros de las proteínas.	EH(E) SA(E) EM(P)
		2. Relación de las vibraciones características y la composición de las proteínas.	DG(E) JT(E,S) EH(E) SA(E) EM(P)

En la propuesta de investigación, aparece la metodología general del proyecto donde se establecían las siguientes fases, asociadas con los objetivos específicos.

7.1 Obtener los conectores interdominio a1 y a3 del FVIII humano, de manera heteróloga mediante técnicas biotecnológicas

Aprovechando la experiencia obtenida en la expresión de proteínas recombinantes del FVIII en otro proyecto (Centro Funcional: 1510078) los fragmentos a estudiar se expresarán mediante los plásmidos de expresión pET3a-FVIIIa1 y pET3a-FVIIIa3 en células competentes de Escherichia coli One Shot[®] BL21 (DE3) (InvitrogenTM). Posteriormente, se pudo realizar la inducción para la sobreexpresión de las proteínas de interés mediante la adición de IPTG con una OD de 0,6 a 600 nm. La sobreexpresión se lleva a cabo durante 6 h en medio de cultivo Luria Bertani.

Los fragmentos recombinantes se purifican por cromatografía de afinidad utilizando Ni NTA agarosa, el grado de la calidad y pureza de las proteínas se evalúan mediante geles de SDS-Tris-Tricina. Finalmente, la identidad de las proteínas recombinantes se establece utilizando espectrometría de masas de las proteínas purificadas (MS) y de digestiones enzimáticas de las mismas con tripsina (MS/MS).

7.2 Establecer el protocolo de síntesis de las nanopartículas de plata mediante métodos químicos

La síntesis de las nanopartículas de plata se realiza en los laboratorios de la Escuela de Física del ITCR. Los coloides se preparan según los protocolos obtenidos de la literatura, basados en el método de Lee y Meisel (Lee & Meisel, 1982), en el cual las nanopartículas se obtienen a partir de sales disueltas en agua, la utilización de un estabilizante y agentes dispersivos, sometidos a un tratamiento térmico. Sin embargo, se pretende utilizar el método desarrollado por Bastús (Bastús et al. 2014), en el cual es posible obtener partículas de plata con una alta dispersión, lo cual favorece la obtención de los espectros Raman.

La caracterización de la morfología y la distribución de tamaño de partícula se realiza mediante microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía de UV-Visible con esfera integradora. Los

ensayos se realizan en el laboratorio de microscopía del TEC, y las distribuciones se analizarán en el LEMIC mediante software especializado. También, en colaboración con la Escuela de Química del TEC, se realizarán ensayos de potencial Z, el cual permite valorar la estabilidad de las dispersiones coloidales y la distribución de tamaños.

7.3 Implementar una metodología para la aplicación de la espectroscopía Raman en la identificación de proteínas

Las nanopartículas se utilizan para realizar ensayos de espectrometría Raman mediante la técnica SERS. Se evalúan los resultados obtenidos con diferentes diámetros de nanopartículas. Se utilizarán diámetros promedio de nanopartículas de 20 nm, 50 nm, 60 nm y 70 nm. Las mediciones serán realizadas en el LEMIC.

Estas mediciones requieren de la búsqueda de las condiciones óptimas para obtener los espectros adecuados: el estudio de la potencia, el tiempo de exposición, el número de ensayos, el aumento de los objetivos y la longitud de onda del láser. También, resulta necesario realizar ensayos que determinen la mejor relación de la mezcla muestra-nanopartículas. Se utilizan relaciones mayores, menores e iguales entre ellas.

Se utilizan vidrios portaobjetos como sustratos sobre los que se colocará la muestra. Estos sustratos deben ser preparados mediante un proceso de limpieza y esterilización, lo que se hace mediante lavado en baño ultrasónico y con agentes químicos.

Los análisis se realizarán a partir de una gota de 1 μ L de la suspensión proteínas-AgNP, depositada sobre el sustrato y seca en condiciones ambientales normales. Para realizar los ensayos de espectroscopía, en cada portaobjetos se depositarán tres muestras preparadas bajo las mismas condiciones y una muestra testigo. En cada muestra se realizarán ensayos en tres puntos diferentes, buscando la zona adecuada sobre la gota.

8. Resultados

8.1 Resultados relacionados con el objetivo específico 1

Tanto la Licda. Ing. Silvia Arce Solano como el Dr. Erick Hernández Carvajal, presentaron un informe de salida anticipada y un informe parcial del proyecto, cumpliendo con los compromisos ante la VIE. La Licda. Ing. Arce presentó su informe de salida del proyecto en junio de 2019. El Dr. Hernández presentó su informe parcial del proyecto en 2021. El informe de salida fue aprobado por los Consejos de la Escuela de Biología (CIB-525-2021) y de Física (FIS-202-2021) para finalmente ser aprobado por la Dirección de Proyectos, como consta en el memorando DIP-734-2021. Con relación al objetivo específico 1 del proyecto, esta fue responsabilidad exclusiva de los compañeros de la Escuela de Biología, del que ya presentaron informe y que se cumplió completamente.

8.2 Resultados relacionados con el objetivo específico 2

Como se puede apreciar en el plan de acción, el trabajo de los investigadores Ernesto Montero y Dionisio Gutiérrez estaba relacionado solamente con los objetivos específicos 2 y 3. El objetivo específico 2 consistió en el desarrollo de un protocolo de síntesis de las nanopartículas de plata mediante métodos químicos. Para realizar esto se partió del método de Lee & Meisel de 1982, que consiste en la preparación de una disolución de nitrato de plata junto que se mezcla en caliente con una disolución de boro hidruro de sodio o citrato de sodio, como agente reductor y estabilizante. Por su parte, el objetivo específico 3, estaba relacionado con la implementación de una metodología para la aplicación de la espectroscopía Raman en la identificación de proteínas.

8.2.1 Síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs)

En esta sección se contemplan las tres primeras actividades del objetivo: selección del método de preparación de las nanopartículas para este tipo de muestras, ensayos para definir el diseño experimental de preparación de las nanopartículas y preparación de las nanopartículas.

Se sintetizaron las nanopartículas de plata (AgNPs) por la reducción química de nitrato de plata utilizando disoluciones acuosas de citrato de sodio o borohidruro de sodio, como agentes reductores. Añadiendo unas pocas gotas de ácido tánico, es posible controlar el tamaño de las nanopartículas de plata en ambos procesos de síntesis. El tamaño óptimo de las nanopartículas mejora la intensidad de los picos en la espectroscopia Raman, como lo establece la metodología SERS. La espectroscopia UV-Vis, también se utiliza para la caracterización de las nanopartículas, a través de un pico de absorción intenso debido a la excitación de los plasmones de superficie que depende de factores como el tamaño, la forma y la concentración de nanopartículas de plata. De la misma manera, las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Uno de los métodos de síntesis se basa en el uso de borohidruro de sodio como agente reductor. En este método primero se enfría una disolución de 30 mL con borohidruro de sodio (2 mM) en un baño de hielo usando agitación. Se añade una solución gota a gota de 10 mL con nitrato de plata (1 mM) manteniendo la agitación. Cuando se han añadido cerca de las dos terceras partes de la disolución de nitrato de plata, se aprecia un ligero cambio en la coloración y se detiene el goteo de la disolución. Luego se lleva a hervor durante 1 h añadiendo poco a poco la disolución restante, hasta ajustar el volumen final a 40 mL. En la Figura 1 se muestra de forma esquemática el proceso de síntesis de las nanopartículas.

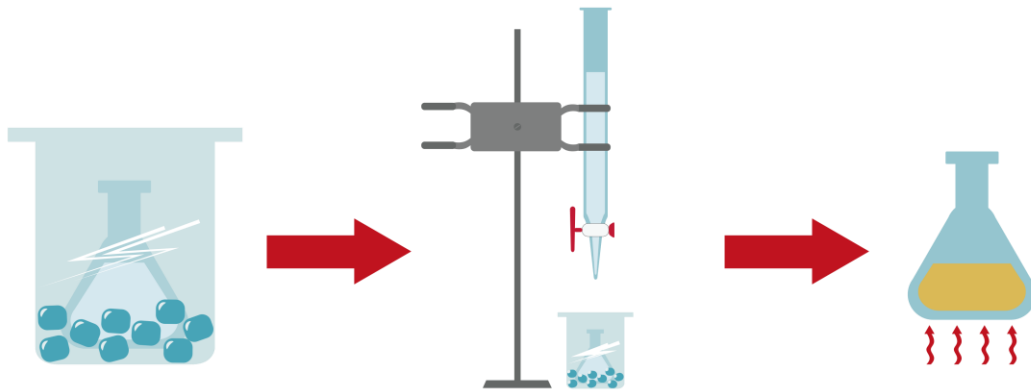
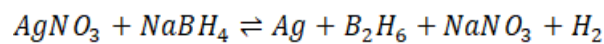


Figura 1. Esquema del procedimiento de síntesis de nanopartículas utilizando borohidruro de sodio como agente reductor.

En el caso del borohidruro de sodio como agente reductor, la ecuación química que describe la reacción se muestra a continuación:



El otro método de síntesis se basa en el uso de citrato de sodio como agente reductor. En este método una disolución de 100 mL de citrato de sodio (5 mM) se calienta hasta cerca de 90 °C con agitación, agregando distintas concentraciones de ácido tánico. Luego se deposita gota a gota la disolución de nitrato de plata, la reacción es aplacada mediante un baño de hielo. La Figura 2 muestra un esquema de este proceso de síntesis.

Como se verá en el apartado correspondiente, sobre el tema de síntesis de nanopartículas se presentó un póster en el SCiMAN del 2018, realizado en la Universidad de Costa Rica, bajo el título “Synthesis and characterization of silver nanoparticles for analysis of biological materials by SERS” (ANEXO 1).

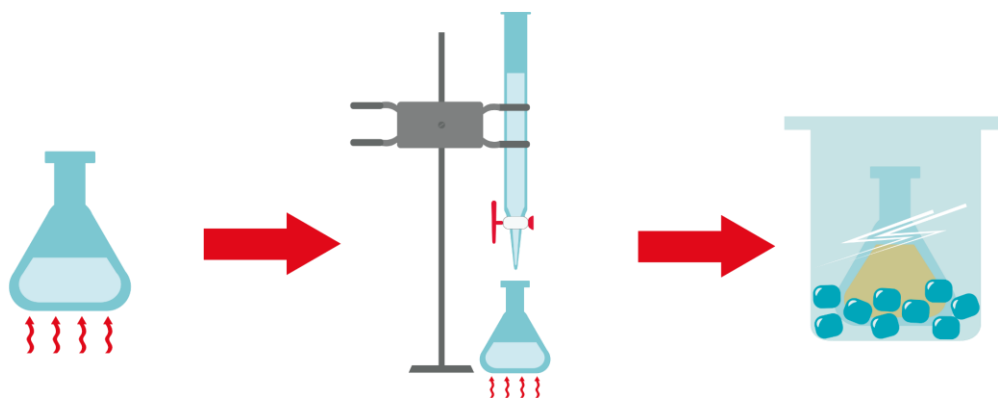


Figura 2. Esquema del procedimiento de síntesis de nanopartículas utilizando citrato de sodio como agente reductor.

Para llevar a cabo el proceso de contacto de las nanopartículas con las proteínas se probaron dos métodos principales: *in situ* y *ex situ*. El primero, corresponde a una reducción sobre la mezcla acuosa de Ag^+ y proteínas; mientras que *ex situ*, corresponde a una síntesis de AgNPs separada de las proteínas y un mezclado posterior. La síntesis de nanopartículas se realiza de acuerdo con el método de Lee & Meisel de 1982, como se ha mencionado en los párrafos anteriores.

8.2.2 Caracterización de las nanopartículas de plata

El análisis por espectroscopia UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas por ambos métodos permite apreciar la influencia de la concentración de ácido tánico en la posición del máximo de absorción. La Figura 3 muestra los espectros de absorbancia, donde se aprecia la banda de absorción de las nanopartículas que tiene un semi ancho cercano a los 150 nm y un máximo próximo a los 400 nm.

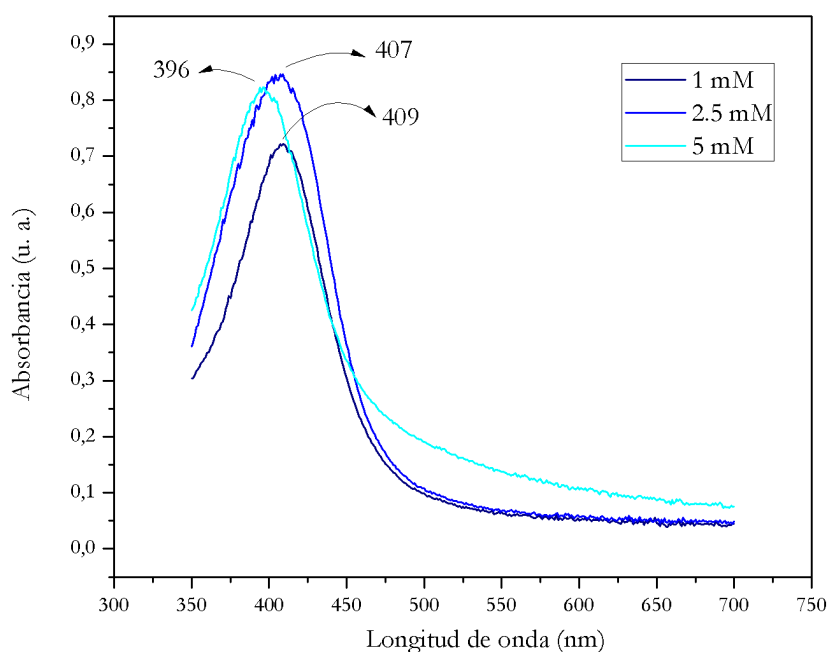


Figura 3a. Absorbancia de las nanopartículas sintetizadas con borohidruro de sodio

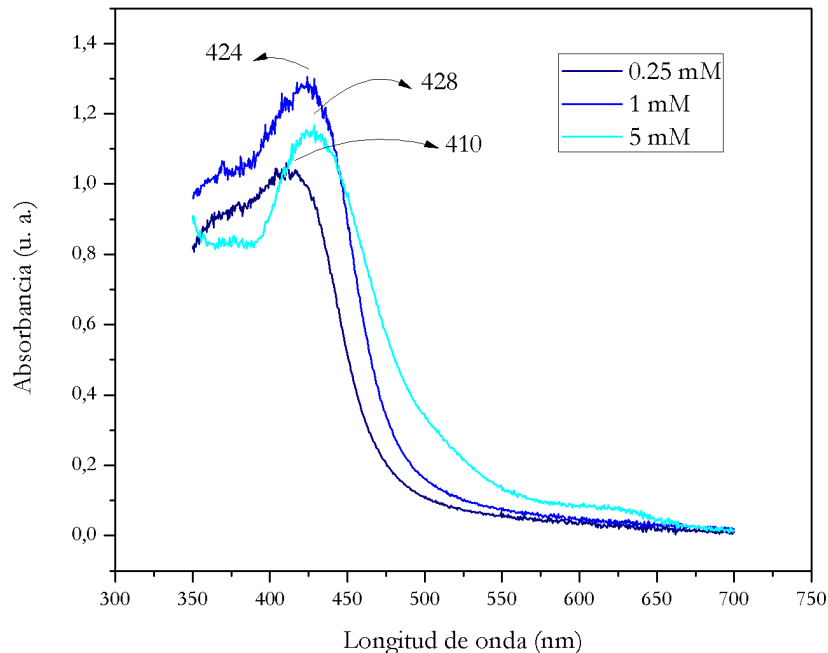


Figura 3b. Absorbancia de las nanopartículas sintetizadas con citrato de sodio para distintas concentraciones de ácido tánico.

En estas gráficas se aprecia que en un caso la mayor concentración de ácido tánico desplaza el máximo a menores longitudes de onda (Figura 3a), mientras que en el otro las desplaza a mayores longitudes de onda (Figura 3b). En términos microscópicos, las imágenes TEM señalan que cuando el máximo se desplaza a longitudes de onda mayores es porque el tamaño de la nanopartícula aumenta, pero cuando el reductor es borohidruro de sodio, las partículas se mantienen dispersas o forman pequeños racimos, de una a dos decenas de partículas (Figura 3a), mientras que, con el citrato de sodio, las partículas forman racimos medios y grandes, de una a dos centenas de partículas.

Para evaluar la forma y calidad de las nanopartículas sintetizadas, se utilizaron micrografías TEM (Figura 4), que fueron obtenidas en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología, CENAT-CONARE y el Laboratorio Institucional de Microscopia del TEC. A partir de estas imágenes se pudo analizar la forma de las nanopartículas y obtener la distribución de sus tamaños para las distintas metodologías de síntesis utilizadas. Para determinar el tamaño de las nanopartículas se utilizó un método de medición en cruz basado en la forma cuasi-esférica de la mayor parte de las partículas, pero también se desarrolló un método de procesamiento digital para clasificar las nanopartículas, utilizando Image J¹.

Como se verá en el apartado correspondiente, sobre el tema de caracterización de las nanopartículas sintetizadas, se presentó un póster en el SCiMAN del 2018, realizado en la Universidad de Costa Rica, titulado “Advances in morphological image processing of nanoparticles’ TEM micrographs”.

¹ Software gratuito de procesamiento de imágenes (<https://imagej.net/ij/>)

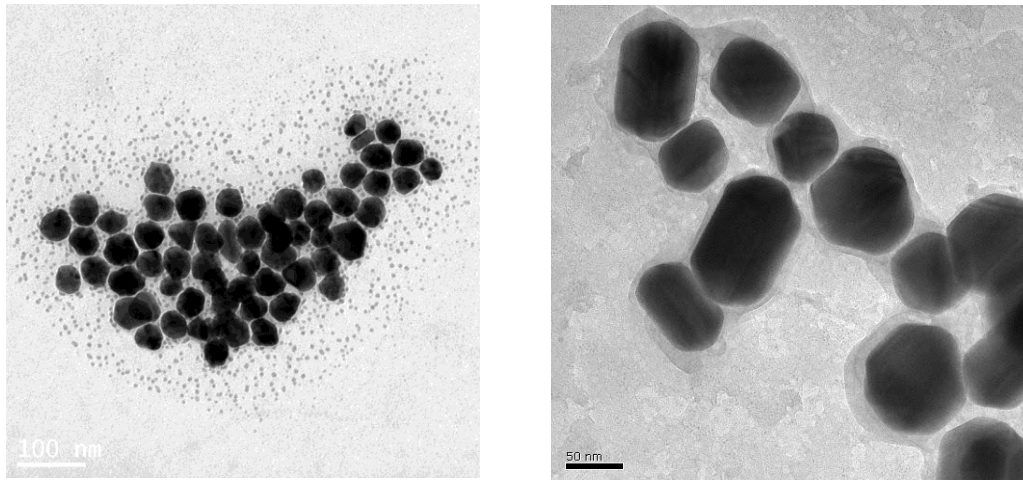


Figura 4. Micrografías TEM de nanopartículas de plata sintetizadas.

En la Figura 5 se muestra una distribución de tamaños de uno de los lotes de partículas sintetizadas. El tamaño y la forma de las nanopartículas se controló en el proceso de síntesis para que tuvieran una forma aproximadamente esférica y con diámetros entre 40 nm y 80 nm.

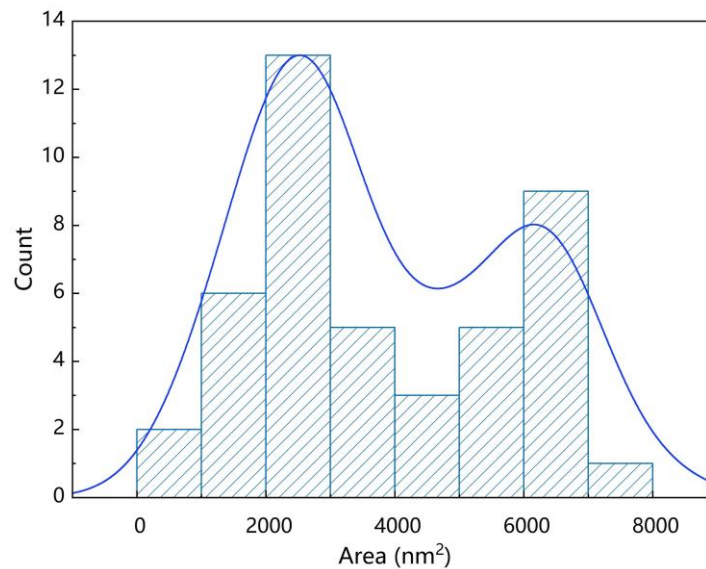


Figura 5. Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata sintetizadas.

En la Figura 6 se aprecia el color de las nanopartículas de plata, que es consecuencia de las diferencias en el tamaño de las nanopartículas en la disolución y de su agrupamiento. Se encontró que el tamaño (color) depende del agente reductor y de la concentración de ácido tánico, para el proceso de síntesis basado en el método de Lee & Meisel.

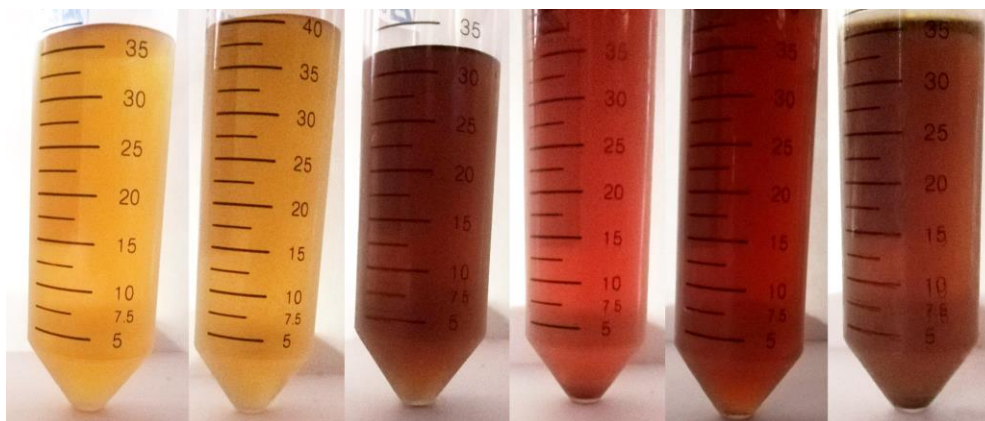


Figure 6. Nanopartículas de plata sintetizadas mediante borohidruro de sodio (tres de la izquierda) y citrato de sodio (tres de la derecha) con diferentes concentraciones de ácido tánico.

8.3 Resultados relacionados con el objetivo específico 3

A continuación, se presentan los resultados que corresponden con los productos esperados en el plan de acción.

8.3.1 Establecimiento del protocolo para la preparación del coloide acuoso proteína-AgNP

Para observar las proteínas se utilizaron diferentes técnicas: A través de superficies metálicas, en nuestro caso vidrios portaobjetos con substratos de oro sobre la cual se depositan las muestras de proteína pura. También se prepararon muestras *in situ* de nanopartículas-proteína, es decir, el crecimiento de las nanopartículas se realiza en presencia de las proteínas y posteriormente se coloca la muestra sobre vidrio portaobjetos y el método *ex situ*, en el que las nanopartículas se sintetizan separadamente de las proteínas y luego se mezclan con estas para realizar la medición sobre el vidrio. Para los ensayos con nanopartículas se utilizaron nanopartículas de plata y de oro, tanto compradas como preparadas en el laboratorio.

Dada la rápida degradación de las muestras con los tratamientos térmicos, con el tiempo, con la alta humedad de nuestro país y por su naturaleza biológica, se seleccionó finalmente la preparación de las muestras mediante el método *ex situ*, porque permite un mejor control del tamaño de las nanopartículas, evita la degradación de las proteínas por el calentamiento y requiere de menor tiempo para preparar las muestras proteína-AgNP (Figura 7).

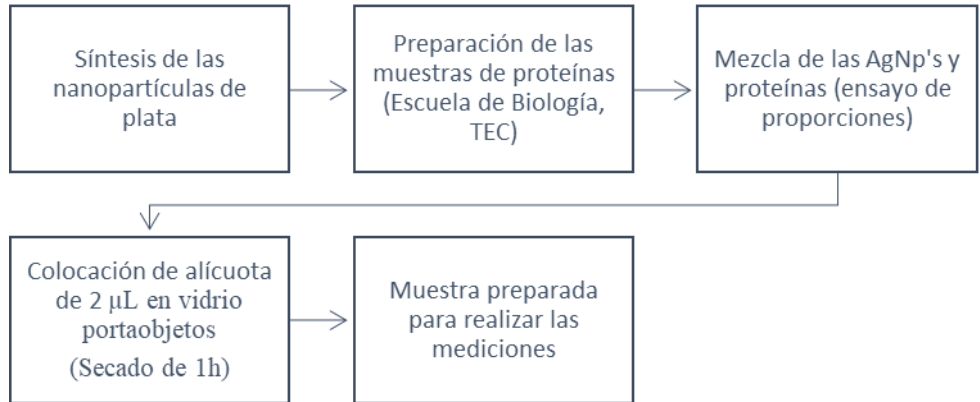


Figura 7. Protocolo de preparación del coloide acuoso proteína-AgNP.

Con respecto a las nanopartículas, se seleccionaron las nanopartículas de plata por su mejor respuesta para observar las vibraciones, como también el costo de los precursores para la preparación y la estabilidad en el tiempo, la cual podíamos inspeccionar a través de la observación del color en los recipientes y a la medición de su actividad utilizando la mezcla 1,2-Di(4-Piridil) Etileno + AgNp's (Haibo Zhou, 2014)(Figura 8).

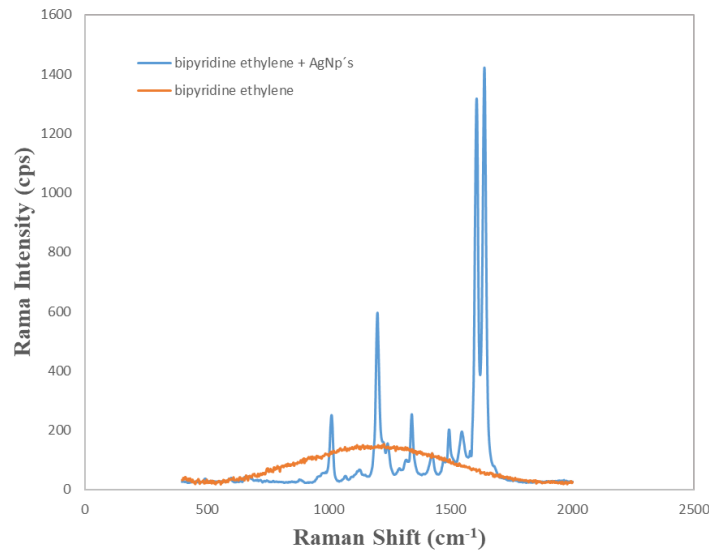


Figura 8. Espectro Raman de 1,2-Di(4-Piridil) Etileno + AgNp's obtenido en el control de la actividad de las nanopartículas de plata. Laboratorio de Espectroscopía Óptica, TEC.

8.3.2 Estudio de la relación óptima entre la muestra y las nanopartículas

Para el estudio de la relación óptima entre la muestra de material biológico y las nanopartículas se añadió a diferentes muestras de 2 µL del material biológico, cantidades volumétricas de las nanopartículas de 0,5 µL, 0,75 µL, 1 µL, 1,25 µL, 1,5 µL y 2 µL. De estas muestras proteína-

nanopartícula, se extrae un volumen de 1,5 μL , se deposita sobre un vidrio portaobjetos y se deja reposar dentro de una caja Petri, a temperatura ambiente, por un periodo de secado de al menos 1 h. Luego del periodo de secado, que se verifica por inspección visual, se realizan las mediciones en muestra, tanto físicamente (formación del anillo de las nanopartículas a lo largo del perímetro de la gota) y su espectro Raman (presencia de vibraciones) (Figura 9). En todos los casos, las muestras se analizaron por triplicado, en el mismo vidrio portaobjetos, pues las gotas son muy pequeñas. Estas mediciones de volúmenes tan pequeños se justifican porque las cantidades de muestra biológica son muy bajas, debido a su proceso de extracción, además, en la metodología SERS se requieren volúmenes muy bajos, pues se realiza mediante la observación con un microscopio y el enfoque del láser sobre un área muy pequeña. Comparado con las dimensiones macroscópicas de un vidrio portaobjetos, esta medición se realiza sobre un punto, que se selecciona en las zonas externas del anillo de la gota, en donde se observa la mayor concentración de las nanopartículas.

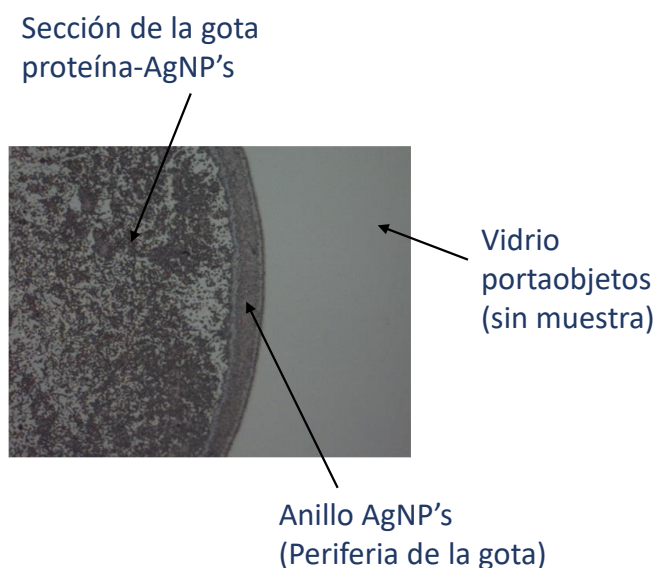


Figura 9. Formación típica del anillo de nanopartículas sobre el perímetro de la gota de la muestra proteínas-AgNP's. Laboratorio de Espectroscopía Óptica, TEC.

Del estudio de las mediciones preliminares con las muestras en diferentes proporciones proteína-AgNP's, se estableció que la proporción de trabajo sería 1:1 en volúmenes iguales de proteína y nanopartículas. Esta proporción es similar a la reportada en la literatura para el uso en SERS.

8.3.3 Tratamiento de los sustratos para la colocación de la muestra

Para realizar los ensayos de espectroscopia se utilizaron vidrios portaobjetos, lo que se justifica porque las muestras están compuestas de la mezcla de volúmenes pequeños tanto de proteínas como de nanopartículas (del orden de magnitud de los microlitros), que se secan a temperatura ambiente sobre

el vidrio portaobjetos, lo que implica que la muestra a ser analizada es plana, esto facilita y satisface el enfoque óptico que requiere la técnica de microscopia Raman.

El procedimiento de limpieza que se ha utilizado requiere primeramente el lavado con agua y jabón, para eliminar las grandes impurezas y grasas que contienen los portaobjetos. Luego, se realiza un enjuague con agua destilada. Posteriormente, dejamos reposando los vidrios, inmersos en alcohol de 90 %, por un periodo de 30 min. Nuevamente los portaobjetos se enjuagan con agua destilada y se someten a un baño ultrasónico, inmersos en acetona, por un periodo de 30 min (ver siguiente figura).

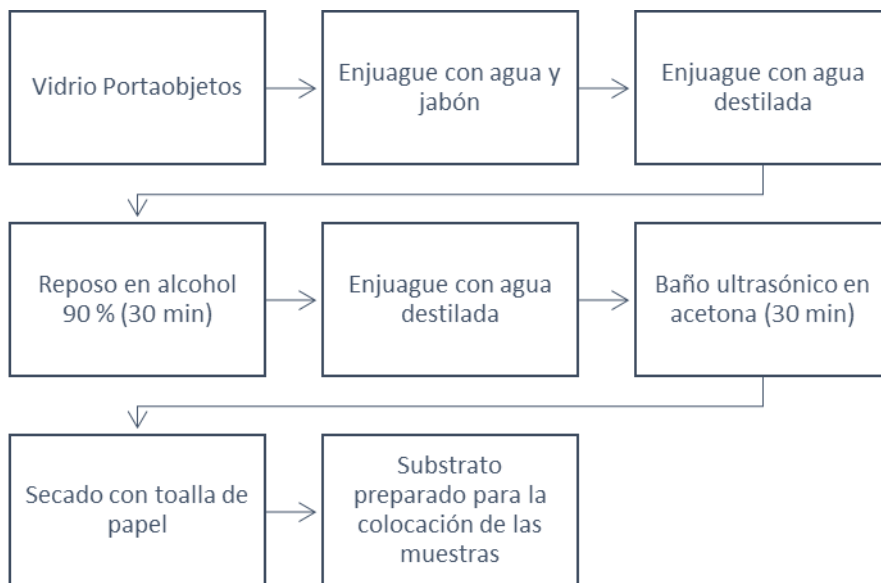


Figura 10. Proceso de limpieza de los vidrios portaobjetos utilizados para los ensayos SERS.

En la figura 9 se puede observar la zona del vidrio portaobjetos sin muestra, lo que indica que el procedimiento de limpieza es adecuado.

8.3.4 Preparación de la muestra para los ensayos

Para obtener los espectros Raman, las muestras de proteínas debían estar recientemente preparadas, almacenadas en recipientes térmicamente aislados a la temperatura aproximada de 4 °C y solo se extraían para prepararlas en su forma pura (proteína-AgNP'S), en las mezclas en proporciones entre ellas (trombina-Factor VIII-AgPN's), y posteriormente colocar la alícuota en el vidrio portaobjetos para realizar la medición del espectro Raman (Figura 11). Esto es necesario, pues las muestras biológicas se degradan muy rápidamente, lo que afecta las estructuras de los enlaces y por tanto las vibraciones características que se desea observar. Desde el punto de vista práctico, este procedimiento es muy limitante, pues las proteínas y los ensayos Raman se realizan en lugares diferentes y se requiere hacer la medición el mismo día en el que se reciben las proteínas. En todos los casos las muestras se prepararon por triplicado y el volumen de cada gota fue de 2 μ L. Las muestras analizadas

correspondían a una concentración que favorecería un exceso de las proteínas FVIIIa1 o FVIIIa3, en las cuales por cada mol de trombina se agregaban 10 moles del factor FVIII (1:10). La concentración promedio de las muestras fue de 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, y 0,5 mg/mL, con el propósito de observar el efecto en el fenómeno de interacción.

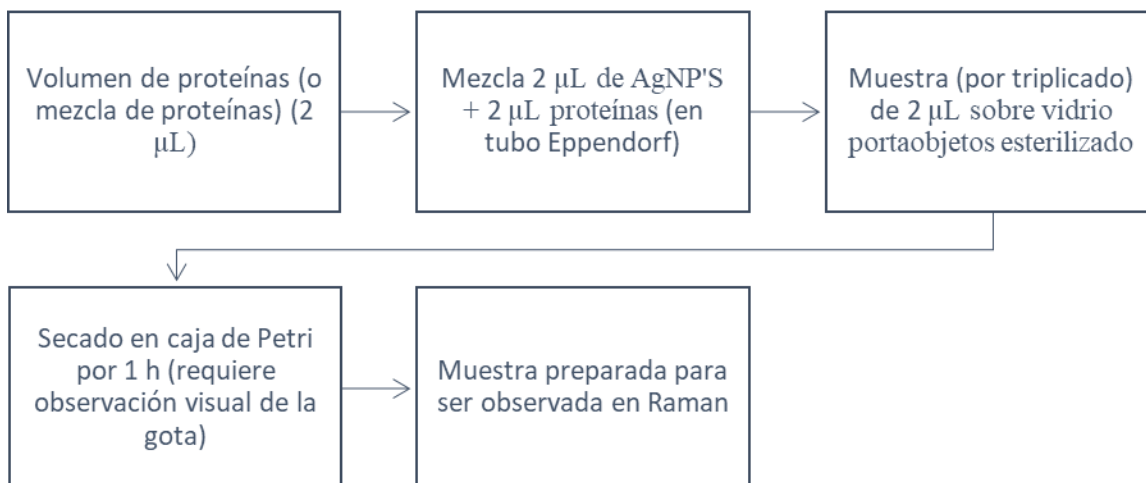


Figura 11. Proceso de preparación de la muestras para obtención de los espectros SERS.

8.3.5 Determinación de las condiciones experimentales óptimas de medición

Las condiciones experimentales se refieren a la longitud de onda del láser, tiempo de exposición, potencia, número de exposiciones, objetivo del microscopio. El establecimiento de los valores de los parámetros de medición está condicionado por el hecho de que se analizan muestras biológicas. Esto restringe los ensayos a potencias muy bajas, tiempos de exposición cortos como también un bajo número de repeticiones, de lo contrario la muestra se degrada. Con respecto a la longitud de onda del láser, se realizaron mediciones con el láser de longitud de onda de 633 nm y de 532 nm. La mejor respuesta para las nanopartículas de plata, regularmente sintetizadas en el laboratorio, se obtiene con el láser de una longitud de onda de 532 nm, pues la distribución promedio de tamaños de las nanopartículas es de aproximadamente 20 nm a 50 nm ($\lambda_{\text{láser}} \approx 10 \times \text{Tamaño}$ condición óptima) (Figura 12) (Israelsen, 2015).

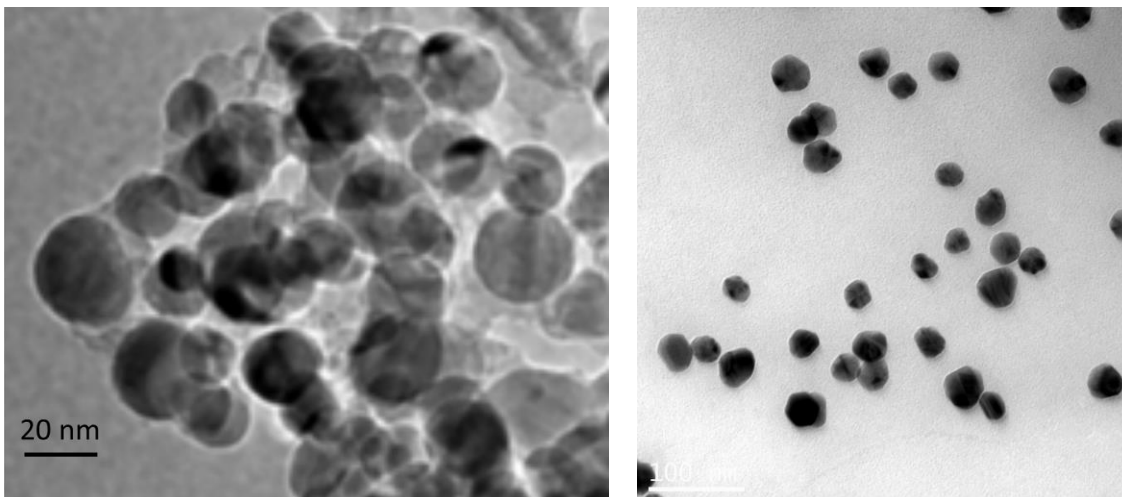


Figura 12. Micrografías típicas de las nanopartículas de plata sintetizadas con un tiempo de 45 min a partir del método de reducción de AgNO_3 con citrato de sodio.

Para determinar las condiciones óptimas, se parte de valores que han sido conocidos en el trabajo diario del laboratorio y realiza la variación de uno de los parámetros a la vez. Bajo estas condiciones, los mejores valores para los parámetros fueron los que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3. Valores de los parámetros para la determinación de los espectros Raman con equipo Raman DXR. Laboratorio de Espectroscopia Óptica, TEC.

Parámetro	Valor	Valor
Longitud de onda	532 nm	633 nm
Potencia	0,4–1,0 mW	0,5–3,0 mW
Tiempo de exposición	5 s	5 – 10 s
Repeticiones	25 exp	50 exp

En el proceso de medición mediante el microscopio Raman, regularmente es necesario realizar pequeñas variaciones. La potencia de trabajo depende tanto de la muestra como el tipo de láser, la óptica del equipo y los detectores. Algunos de los espectros que se determinaron con el microscopio Raman de la Universidad de Costa Rica se realizaron con potencias más altas (14,95 mW, 26,10 mW), en tiempos de exposición cortos.

8.3.6 Obtención de los espectros y valoración

Los espectros Raman de las muestras se determinaron partiendo de los valores establecidos para los diferentes equipos DXR Thermo Scientific (Tecnológico de Costa Rica) y ALPHA 300R WITec (Universidad de Costa Rica). La valoración se basa en criterios de calidad y pertinencia para los propósitos del proyecto. Las mediciones se realizaron para todas las concentraciones molares de las proteínas FVIIIa1, FVIIIa3 y trombina separadamente, además de las combinaciones trombina y los factores FVIII. En diferentes muestras se utilizaron tanto nanopartículas de plata como de oro, con diámetros diferentes (50 nm, 70 nm) que se justifican por la relación del diámetro de las nanopartículas y la longitud de onda del láser. La figura 13 y figura 14 muestran algunos de los perfiles de los espectros determinados.

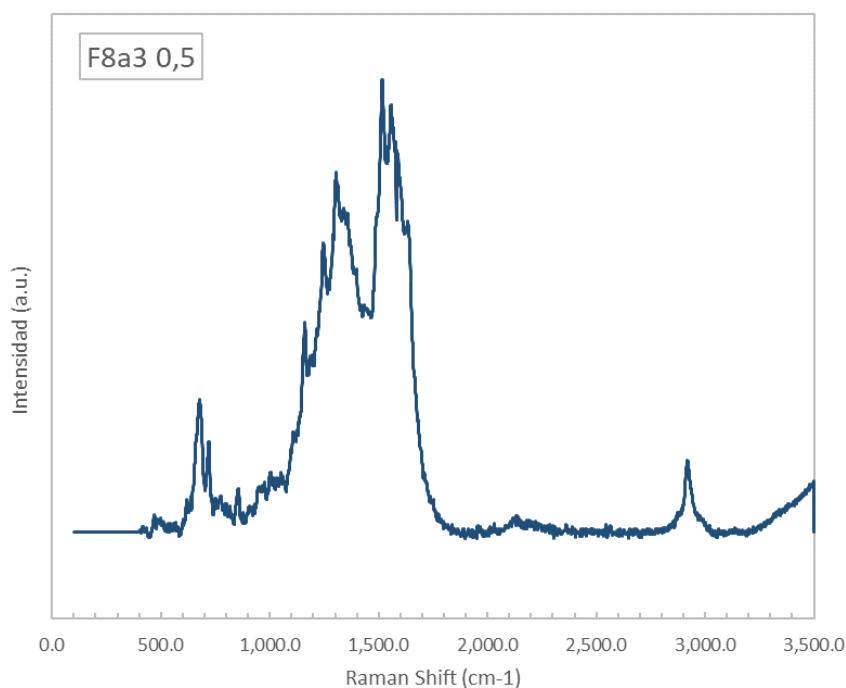


Figura 13. Perfil del espectro Raman de la proteína F8a3 a una concentración molar de 0,5 utilizando nanopartículas plata con longitud de onda del láser de 532 nm.

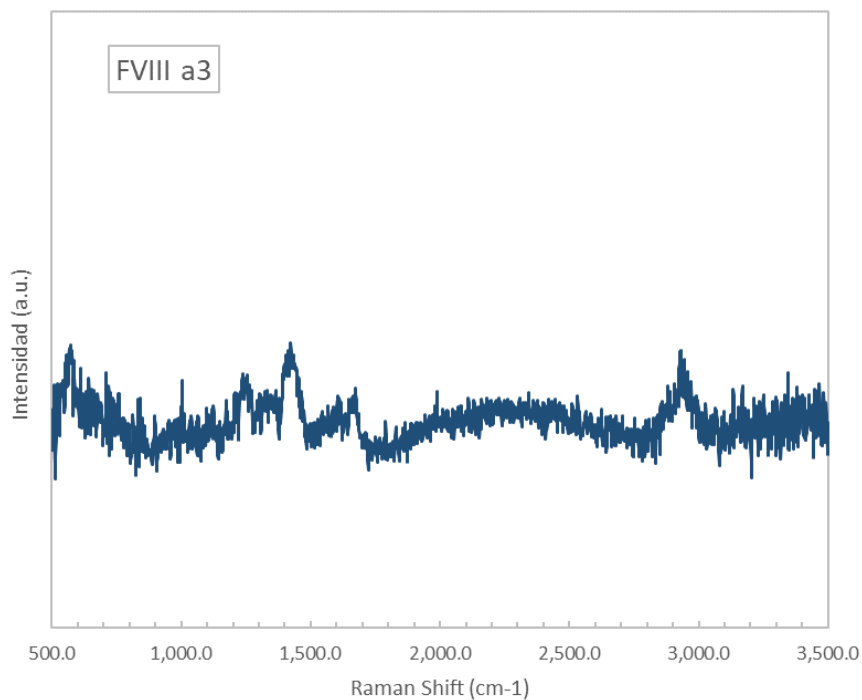


Figura 14. Perfil del espectro Raman de la proteína F8a3 a una concentración de 0,5 M utilizando substrato de oro con láser de longitud de onda de 633 nm.

Como parte de la preparación de las muestras de proteína se utilizó un buffer estabilizador que estaba compuesto de 50 mM Tris HCl y 150 mM NaCl en el cual se encuentran las proteínas inmersas en el momento de la preparación para la metodología SERS. Para evitar la influencia de estos compuestos salinos que afectan el perfil del espectro se procedió a dializar las proteínas con agua bidestilada estéril, hasta llevar a prácticamente cero la concentración de las sales (0,00001 mM de sales), lo que implica que las proteínas permanecían en un medio de agua destilada. Este hecho por una parte es conveniente en la espectroscopía Raman, porque la huella que identifica las proteínas se encuentra en una zona diferente al agua, sin embargo, puede afectar la estabilidad de las proteínas, influyendo en la desnaturalización o agregación de éstas, lo que podría afectar negativamente la observación de la estructura.

Las Figuras 15 y 16 son una muestra de los espectros Raman de las proteínas estabilizadas en un medio de agua destilada.

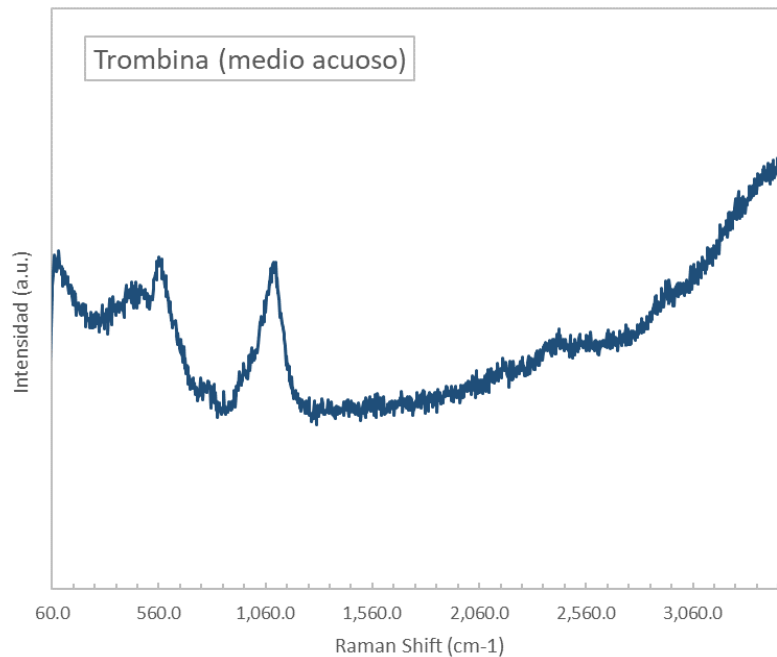


Figura 15. Espectro Raman de la Trombina utilizando AgNP's y láser de 532 nm.

8.3.7 Identificación de las vibraciones características de los espectros de las proteínas y relación de las vibraciones características con la composición de las proteínas

El perfil del espectro de las vibraciones de la figura 13 muestra la influencia de las sales utilizadas en la preparación y la estabilización de las proteínas, lo que interfiere en la identificación de las vibraciones características. En este caso, se puede observar la presencia del medio de cultivo utilizado para la obtención del FVIII (agar LB), pues estas proteínas son obtenidas a partir de estructuras de *E. coli*. Este fenómeno de influencia sobre el espectro Raman (debido a los restos del medio de cultivo) ya ha sido reportado en la literatura (Katarina Mlynáriková, 2015). Los perfiles del espectro Raman de las muestras obtenidas en el laboratorio FVIIIa1 y FVIIIa3 presentan este problema. Sin embargo, debe resaltarse dos factores importantes: se observa la intensificación de las vibraciones mediante SERS, pues claramente hay un espectro muy bien definido. El segundo factor es la zona en donde se presenta la mayor definición del espectro de las muestras. En el intervalo de 700 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} , se encuentra la zona característica (*fingerprint*) que identifica la naturaleza de estas estructuras de aminoácidos (Juan Hu, 2009). En el caso particular de la Trombina, esta proviene de proteínas humanas, adquiridas comercialmente.

Al considerar la preparación de las muestras de proteínas en la solución de agua destilada, se parte de la hipótesis de que las zonas características del agua y del material biológico son muy diferentes,

además de la naturaleza de los enlaces, por lo que esta técnica proporciona un medio para caracterizar el material biológico en solución acuosa (Stewart, 1999).

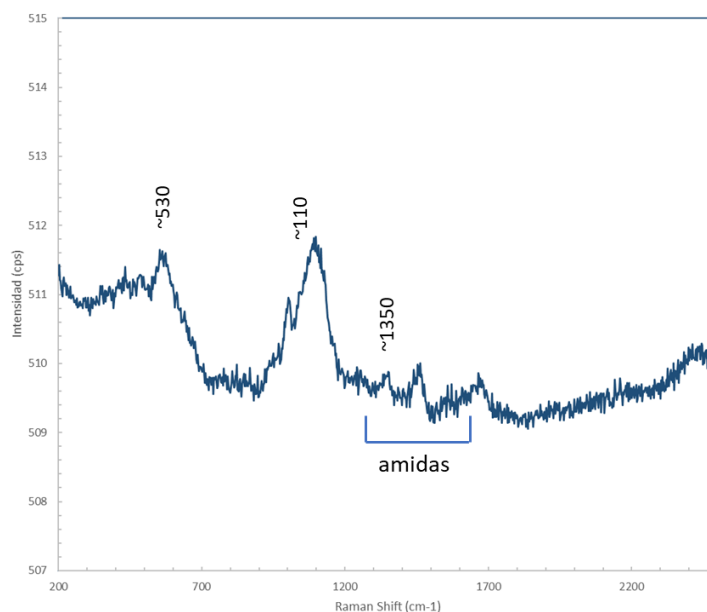


Figura 16. Espectro Raman de la Trombina utilizando AgNP's y láser de 532 nm.

En la figura 16 se presenta el espectro de la trombina estabilizada en agua destilada. Las intensidades que se observan son bajas gracias a la intensificación de la señal mediante SERS, de lo contrario no se apreciarían las bandas.

Se identifica una banda entre 520 cm^{-1} y 530 cm^{-1} , relacionada con los enlaces peptídicos asociadas al estiramiento del enlace S-S (J. Sundaram, 2013). También, como constituyente de muchas proteínas, la banda importante cercana a 1010 cm^{-1} se atribuye, entre otras, a la lisina (T. Yang, 2012). En el rango de 1220 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} se observan vibraciones de amidas. La banda que se sitúa cerca de 1350 cm^{-1} , generalmente se asocia al doblamiento del enlace C-H (Lednev, 2009).

9. Discusión y conclusiones

Una amplia discusión del objetivo específico 1 fue presentado en el informe final del Dr. Erick Hernández, presentado en 2021 ante el Comité Técnico de Investigación y Extensión de la Escuela de Física y ante la VIE, como ya se mencionó anteriormente.

Con relación al objetivo específico 2, se cumplió el objetivo, ya que se pudieron obtener las nanopartículas de plata según las necesidades del proyecto, pues como se mencionó, la literatura señala la importancia del tamaño de las nanopartículas para maximizar el efecto del método SERS. Se

obtuvieron nanopartículas utilizando dos agentes reductores y regulando la forma de las partículas mediante el ácido tánico. Se realizaron síntesis de nanopartículas utilizando distintas concentraciones de ácido tánico para controlar el procedimiento de síntesis de las nanopartículas buscadas. Como se puede apreciar en la sección de resultados, se generaron ensayos de síntesis de nanopartículas que permitieron comprobar la forma y tamaño de las nanopartículas.

Según la literatura, para incrementar el método SERS, se debe procurar que los tamaños de las partículas sean de una décima parte la longitud de onda del láser que se utiliza. De esta manera se obtuvieron las nanopartículas buscas, con tamaños entre 40 nm y 80 nm, pues el láser utilizado para el análisis fue de 532 nm.

Adicionalmente, se adquirieron nanopartículas comerciales de oro, pero lamentablemente no se pudo analizar su respuesta en SERS, debido a que estas llegaron al final del proyecto. Teníamos planes de analizar su efecto en el primer semestre de 2020, dentro del plazo para la presentación del informe final, pero no se pudieron concretar los ensayos debido al inicio de la pandemia.

Dado que los resultados obtenidos con nanopartículas de plata comerciales y las sintetizadas por nosotros fueron semejantes, pensamos que la causa del ruido del espectro y la presencia de algunos picos en los espectros, están asociadas con la presencia del buffer que controla el pH en la síntesis de las proteínas. Esto es así, porque el análisis de los buffers por aparte, presenta bandas Raman muy semejantes.

En cuanto al objetivo específico 3, podemos observar que la espectroscopía Raman puede tener un gran potencial como una herramienta rápida identificar y observar cambios en el material biológico, en nuestro caso, las proteínas. Este campo merece una atención particular porque estas estructuras realizan una gran variedad de funciones en el organismo, como la replicación del ADN, el transporte de moléculas de un lugar a otro, como también en el problema base de nuestra propuesta, observar la influencia en los mecanismos de la coagulación que se asocian a patologías que pueden causar la muerte y que son de alta incidencia en nuestro país. Las proteínas se diferencian por su secuencia de aminoácidos, de los cuales hay muchos esenciales para la salud del ser humano como la lisina, metionina, leucina, etc. (Zhu, 2011). Uno de los alcances importantes de este proyecto es introducir, en nuestro país, las bases de la espectroscopía Raman con el propósito de facilitar el diagnóstico de diversas patologías, principalmente a través de la observación de las causas y cambios que se podrían producir a nivel biológico en las células y que permitirían orientar el tratamiento que mejore la calidad de vida de los pacientes y los servicios que brinda nuestro sistema de salud, además, de vincular los proyectos de investigación de las Universidades con las necesidades reales de nuestro país.

Es claro que aún hay trabajo y detalles que resolver en la preparación de las muestras biológicas, como lo es el procedimiento de preparación, la naturaleza de los reactivos, la preservación de la estabilidad

de las muestras, la metodología SERS, el control del tamaño y la dispersión de las nanopartículas, la utilización de sustratos metálicos, la manipulación, el lugar de trabajo, el equipamiento, el software de análisis de los datos, las bases de datos de espectros (se debe pagar licencias) y la capacitación del personal, tanto en destrezas a nivel de laboratorio como en el conocimiento científico de la técnica.

10. Recomendaciones

A pesar de que se trabajó intensamente para obtener resultados, tanto en la producción de las muestras como en el análisis de los espectros Raman, los espectros mostraron resultados apenas aceptables, debido a las interferencias de las distintas sustancias que se encontraban en la disolución. Los resultados obtenidos sugieren que estas dificultades son producto de las condiciones requeridas para mantener las proteínas de forma adecuada dentro de la disolución acuosa (*buffer* junto con otras sustancias). Sin embargo, habría sido conveniente valorar otros disolventes y soluciones *buffer* para intentar mejorar los resultados. En todo caso, los resultados obtenidos son valiosos y suficientemente claros como para generar participaciones con congresos y hasta una un artículo que se ha enviado recientemente a la revista Tecnología en Marcha, “Caracterización de microorganismos de importancia médica mediante espectroscopía Raman”.

La línea de investigación en biofísica dentro de la Escuela de Física del TEC, utilizando técnicas espectroscópicas, es una línea de trabajo valiosa que debe continuarse apoyando y desarrollando.

11. Agradecimientos

Queremos agradecer a la VIE por la aprobación y el financiamiento del proyecto, a la Escuela de Biología por apoyar la participación de los investigadores del CIB y también a la Escuela de Física por el respaldo a los profesores, por la aprobación de los trámites y por la revisión de la propuesta y del informe.

También deseamos expresar nuestro agradecimiento al Laboratorio Nacional de Nanotecnología, CENAT-CONARE, el Laboratorio Institucional de Microscopia del TEC, al Laboratorio Institucional de Microscopia y al LEMIC del TEC por el apoyo en la ejecución.

Igualmente, deseamos expresar nuestro agradecimiento a los estudiantes asistentes Deyvis Alvarado-Cerdas, Ana C. Nororis-Ortega, Juan C. Rodríguez-Rufino, Abraham Lopez-Diaz, Jacqueline Hidalgo-Jiménez de la Escuela de Ciencia de Materiales, a Pablo Chaves-Alfaro de la Escuela de Electrónica y, finalmente, a Elizabeth Leiva-Mata, Paulo Roldán-Quirós y Diego Rojas-Gatjens, de la Escuela de Biotecnología.

12. Referencias

- Bastús, N., Merkoçi, F., Piella, J. and Puntès, V. (2014). "Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: kinetic Control and Catalytic Properties" *Chemistry of Materials* 26: 2836-2846.
- Dieing, T., Hollricher, O., & Toporski, J. (Eds.). (2011). *Confocal raman microscopy* (Vol. 158). Springer Science & Business Media.
- Fazio, B., D'Andrea, C. et al. (2016). "SERS detection of Biomolecules at Physiological pH via aggregation of Gold Nanorods mediated by Optical Forces and Plasmonic Heating" *Nature: Scientific Reports* 6, 26952.
- Haibo Zhou, D. Y. (2014). SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles. *analytical chemistry*, 1525-1533.
- Han, X., Chen, L., Guo, J., Zhao, B., Ozaki, Y. (2010) "Coomassie brilliant dyes as surface-enhanced Raman scattering probes for protein-ligand recognitions" *Analytical Chemistry* 82: 4102-4106.
- Israelsen, N. D., Hanson, C., & Vargis, E. (2015). Nanoparticle properties and synthesis effects on surface-enhanced Raman scattering enhancement factor: an introduction. *The Scientific World Journal*.
- J. Sundaram, B. P. (2013). Detection and differentiation of Salmonella serotypes using Surface-Enhanced Raman scattering (SERS) technique. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-12.
- Juan Hu, P.-C. Z.-H.-L.-Q.-k. (2009). Electrostatic Interaction Based Approach to Thrombin Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, 87-93.
- Katarina Mlynáriková, o. S. (2015). Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy. *Sensors*, 29635-29647.
- Lednev, K. V. (2009). Raman spectroscopic signature of blood and its potential application to forensic body fluid identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 525-534.
- Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3391-3395.
- Lyon, L. A., Keating, C. D., et al. (1998) "Raman Spectroscopy" *Analytical Chemistry* 70: 341-361.
- Nichols, M., Townsend, N., et al. (2012) "European Cardiovascular Disease Statistics 2012". European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis.
- Popp, J., Tuchin, V., Chiou, A. and Heinemann, S. (2011). *Handbook of Biophotonics. Volume 2: Photonics for Health Care*. Weinheim, Germany: Wiley-CH.
- Siddhanta, S., Narayana, C. (2012) "Surface enhanced Raman Spectroscopy of proteins: Implications for Drug Designing" *Nanomaterials and Nanotechnology* 2: 1-12.

- Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., & Boritz, C. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical education*, 84(2), 322-325.
- Song, K. C., Lee, S. M., Park, T. S., & Lee, B. S. (2009). Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean Journal Chemistry Engineering*, 26(1), 153-155.
- Stewart, S. a. (1999). Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectros.*, 1641-1660.
- Stöckel, S., Kirchhoff, J., Neugebauer, U., Rösch, P. and Popp, J. (2015). "The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms". *Journal of Raman Spectroscopy* 47, 89-109.
- T. Yang, X. L. (2012). Spectral analysis of human saliva for detection of lung cancer using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*.
- Tian, Z. Q. (2005). Surface-enhanced Raman spectroscopy: Advancements and applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(6-7), 466. doi:10.1002/jrs.1378.
- Vencesla, A., Corral-Rodriguez, M. A., et al. (2008) "Identification of 31 novel mutations in the F8 gene in Spanish hemophilia A patients: structural analysis of 20 missense mutations suggests new intermolecular binding sites" *Blood* 111(7): 3468-78.
- Zhu, G. Z. (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectros.*, 1187-1195.

13. Anexos

Durante el 2018, se logró la participación con tres carteles en el Congreso Internacional *Bilateral Workshop CR-Taiwan*, realizado en junio, más otros dos carteles en el XIII SCiMAN, organizado en diciembre, ambos en la UCR.

13.1 Certificados de participación en el *Bilateral Workshop CR-Taiwan*

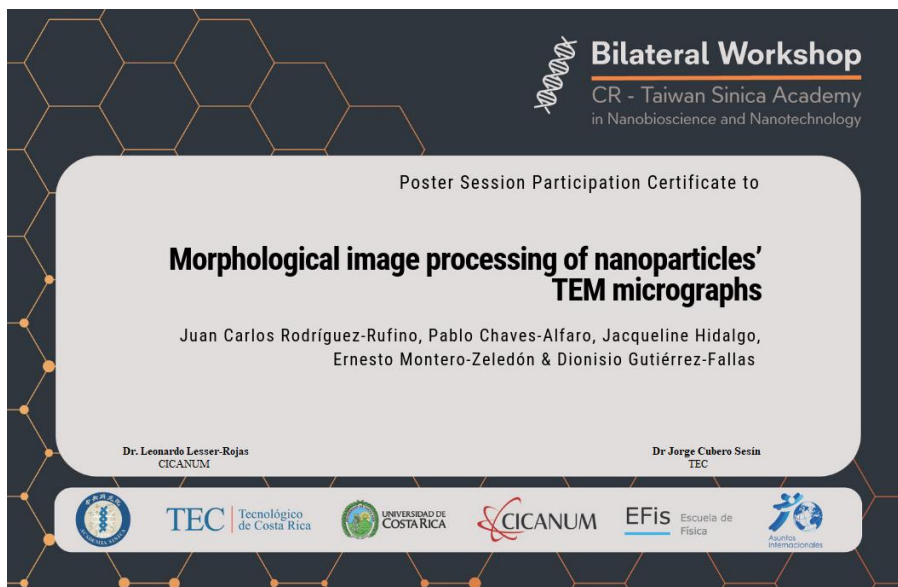


Figura 17. Certificado de participación en el Bilateral Workshop CR-Taiwan”, 2018.



Figura 18. Certificado de participación en el Bilateral Workshop CR-Taiwan”, 2018.

13.2 Resúmenes de la participación en el XIII SCiMAN

Se adjuntan los resúmenes de la participación en el XIII SCiMAN, realizado en el 2018 en la UCR.

SCiMAN2018

POSTER

Morphological image processing of nanoparticles' TEM micrographs

Pablo Chaves¹, Dionisio Gutiérrez¹, Abraham Lopez^{1,2},
Ernesto Montero¹ and Juan Carlos Rodríguez^{1,2}

¹Escuela de Física, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

²Escuela de Ciencia e Ingeniería de Materiales, Instituto Tecnológico de Costa Rica

Image processing techniques have become a relevant method for different materials characterization. In the synthesis of nanoparticles, it is important to determine the average size, its distribution and, in some cases, the shapes it presents. The determination of some of its characteristics is usually done with specialized techniques such as Z potential or transmission electron microscopy. The latter provides digital images that can be processed to obtain detailed information. However, there are difficulties with the software and the first results can be seen in figure 1. This research seeks to develop a method of image processing to quantify the number, size and shape of silver nanoparticles, considering that these characteristics play an important role to verify their correct synthesis.

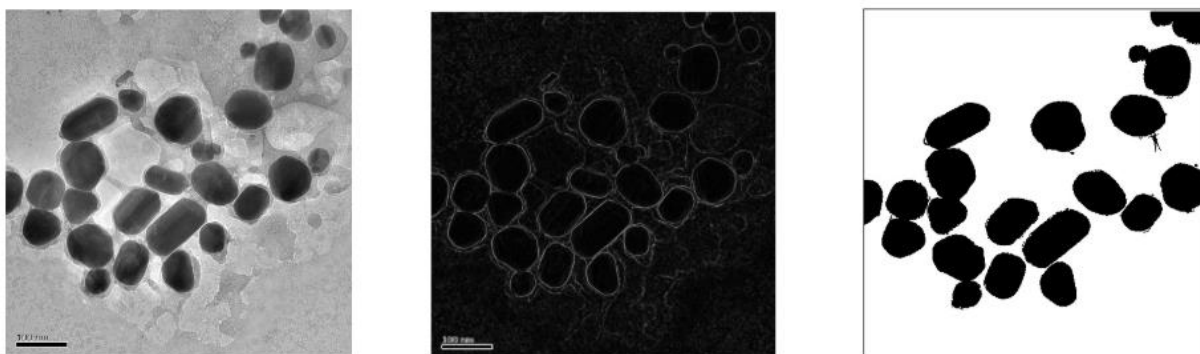


Figure 1. Process of TEM micrographs analyzed by the software

Synthesis and characterization of silver nanoparticles for analysis of biological materials by SERS

*Deyvis Alvarado Cerdas^{1,2}, Ana Catalina Nororis Ortega^{1,2}, Ernesto Montero Zeledón¹
and Dionisio Gutiérrez Fallas¹*

¹Escuela de Física, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

²Escuela de Ciencia e Ingeniería de Materiales, Instituto Tecnológico de Costa Rica

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized by chemical reduction of AgNO_3 , using sodium citrate and sodium borohydride in aqueous solution. Adding a few drops of tannic acid to the solution allow to control nanoparticles size. Optimal size of nanoparticles improve peaks intensity in Raman spectroscopy, through the application of SERS method (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy). The silver nanoparticles were characterized by means of transmission electron microscopy (TEM) to verify their shape and size (Fig. 1). Optical spectroscopy is used to corroborate some characteristics of AgNPs.

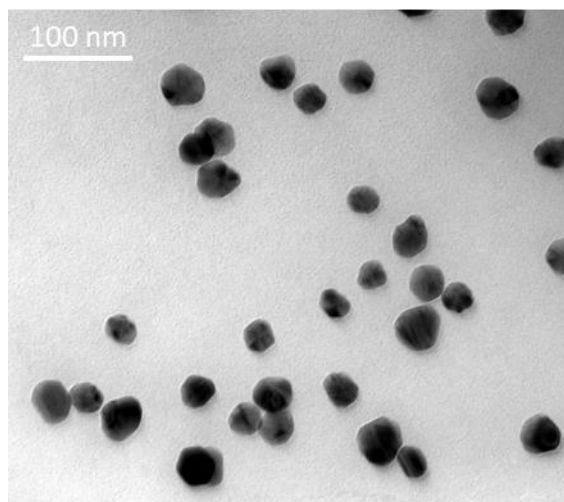


Figure 1. TEM of silver nanoparticles.