



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Análisis y Control de Calidad Químicos.**

**Utilización de espectroscopía SERS para la
detección de endotoxinas en polímeros de
elastina recombinante.**

Autora: Lidia Asenjo Estévez

**Tutores: Guillermo López Reyes y Mercedes Santos
García.**

Año 2025

Resumen.

En este trabajo se evalúa la técnica de espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS) como herramienta analítica para la detección de endotoxinas en polímeros de elastina recombinante (ELRs). Estos biomateriales, producidos mediante expresión bacteriana en *E. coli*, presentan un alto potencial en aplicaciones biomédicas, pero su uso requiere garantizar la ausencia de contaminantes como las endotoxinas, capaces de inducir graves respuestas inmunes. Se analizaron muestras de ELRs puras y contaminadas mediante espectroscopía infrarroja (FTIR), Raman convencional y SERS, utilizando sustratos con y sin recubrimiento ALD y diferentes longitudes de onda de excitación. Los resultados de FTIR y Raman confirmaron la estructura general de los polímeros, pero mostraron limitaciones para discriminar con claridad la presencia de endotoxinas. En cambio, SERS permitió observar la aparición, desaparición y desplazamiento de bandas específicas, con la configuración óptima en sustratos sin ALD y excitación a 633 nm. Aunque las diferencias detectadas no constituyen marcadores inequívocos, se identificaron variaciones reproducibles que refuerzan el potencial de SERS como técnica rápida y sensible para la caracterización de ELR y la detección preliminar de endotoxinas. Finalmente, se proponen líneas futuras centradas en el uso de nuevos sustratos, disolventes alternativos, análisis multivariante y mapeos espectrales que permitan aumentar la robustez y aplicabilidad de la metodología.

Abstract.

This work evaluates Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) as an analytical tool for the detection of endotoxins in elastin-like recombinamers (ELRs). These biomaterials, produced through recombinant expression in *E. coli*, hold great potential for biomedical applications, but their use requires strict control of contaminants such as endotoxins, which can trigger severe immune responses. ELRs samples, both pure and endotoxin-contaminated, were analyzed by infrared spectroscopy (FTIR), conventional Raman, and SERS, using substrates with and without ALD coating and different excitation wavelengths. FTIR and Raman confirmed the general structure of the polymers but showed limitations in discriminating the presence of endotoxins. In contrast, SERS revealed the appearance, disappearance, and shifts of specific bands, with optimal performance obtained using uncoated substrates and 633 nm excitation. Although the observed differences are not yet conclusive markers of endotoxin contamination, reproducible spectral variations were identified, highlighting the potential of SERS as a rapid and sensitive technique for ELR characterization and preliminary endotoxin detection. Future work should focus on testing alternative substrates and solvents, applying advanced multivariate analysis, and performing spectral mapping to enhance the robustness and applicability of this methodology.

Índice.

1.	Introducción.....	- 4 -
1.1.	Polímeros proteicos intrínsecamente desordenados.	- 4 -
1.2.	Recombinámeros de tipo Elastina.	- 5 -
1.3.	Endotoxinas.	- 7 -
1.4.	Métodos de detección de endotoxinas.	- 10 -
1.5.	Espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS).....	- 11 -
1.6.	Limitaciones de los sustratos SERS comerciales.	- 13 -
1.7.	Marco de trabajo.	- 15 -
2.	Objetivos.....	- 15 -
3.	Materiales y métodos.....	- 16 -
3.1.	Muestras.....	- 16 -
3.2.	Sustratos SERS.....	- 16 -
3.3.	Instrumentación.	- 17 -
3.4.	Tratamiento de datos.	- 18 -
4.	Resultados.	- 18 -
4.1.	Análisis espectral convencional.	- 18 -
4.1.1.	<i>Análisis espectral por Espectroscopía Infrarroja (IR).</i>	- 18 -
4.1.2.	<i>Análisis espectral por Espectroscopía Raman.</i>	- 22 -
4.1.2.A.	Análisis Raman de muestras liofilizadas.....	- 22 -
4.1.2.B.	Análisis Raman de muestras líquidas.	- 24 -
4.2.	Caracterización SERS.....	- 28 -
4.2.1.	<i>Optimización de las condiciones analíticas SERS: comparación de sustratos y longitudes de onda.</i>	- 28 -
4.2.2.	<i>Comparación espectral mediante SERS puntual.</i>	- 31 -
4.2.3.	<i>Evaluación de SERS.</i>	- 37 -
5.	Conclusiones y líneas futuras.	- 39 -
6.	Bibliografía.....	- 40 -

1. Introducción.

1.1. Polímeros proteicos intrínsecamente desordenados.

Los polímeros proteicos intrínsecamente desordenados (IDPPs, por sus siglas en inglés *Intrinsically Disordered Protein Polymers*) son polímeros biomiméticos con diseños similares a proteínas naturales, como la elastina o la resilina, que no adoptan una estructura fija, sino que son capaces de responder a estímulos externos (temperatura, pH o presión) cambiando su conformación gracias a su capacidad de autoensamblaje dando lugar a procesos reversibles de transición de fase. Los IDPPs, tienen un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas, biomédicas y en ciencia de materiales al ser capaces de autoensamblarse, responder a estímulos y formar estructuras jerárquicamente organizadas. Se pueden utilizar en la formación de condensados sintéticos, sistemas de liberación controlada de fármacos, andamiajes para ingeniería de tejidos y modelos biomiméticos para estudiar orgánulos celulares ^[1]. Se basan en las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, por sus siglas en inglés, *Intrinsically disordered proteins*), que podemos encontrar en la matriz extracelular dando soporte a los tejidos o interviniendo en funciones regulatorias, y que tampoco tienen una estructura definida, de forma que pueden plegarse o estirarse en respuesta a los mismos estímulos ^[1].

Podemos diferenciar dos tipos de IDPPs:

- *Polímeros similares a resilina (RLPs, por sus siglas en inglés, Resilin-Like Polymers)*: derivados de secuencias de resilina.
- *Polímeros similares a elastina (ELPs, por sus siglas en inglés, Elastin-Like Polymers)*: derivados de secuencias de elastina.

Tanto los IDPPs como los IDPs son capaces de sufrir transiciones de fase dependiendo de los estímulos que les rodean. Así, pueden separarse en dos fases líquido-líquido (LLPS, por sus siglas en inglés, *Liquid-Liquid Phase Separation*), una más rica en polímero que la otra, cambiando su conformación y condensándose. Es un proceso en el que la entropía del sistema cambia y el orden estructural aumenta, pero se mantiene cierto desorden manteniendo flexibilidad en el polímero.

En función de la temperatura y a concentración fija, los IDPPs pueden tener comportamiento *UCST* (*Upper Critical Solution Temperature, por sus siglas en inglés*) en la que la separación ocurre al bajar la temperatura; *LCST* (*Lower Critical Solution Temperature, por sus siglas en inglés*), al subir la temperatura se produce la separación mediante interacciones hidrofóbicas; o ambos, combinando bloques que alternan los dos comportamientos.

La UCST es la temperatura por encima de la cual una mezcla es completamente miscible y, por debajo, se favorece la agregación del polímero y su separación de fases. Este comportamiento se observa en los RLPs y es impulsada por interacciones atractivas fuertes entre cadenas (interacciones electrostáticas, p-p, p-cation) (Acosta et al., 2025; Ruff et al., 2018). En este caso, las interacciones moleculares entre los IDPPs predominan

sobre la entropía de la mezcla ^[1]. Los polímeros con residuos cargados y aromáticos se ven favorecidos para este comportamiento.

La LCST se puede definir como la temperatura por debajo de la cual tenemos una mezcla miscible que se separa en fases si aumentamos la temperatura del sistema por encima de la LCST. Se observa típicamente en ELPs y se explica por la entropía del disolvente. Así, al disminuir la temperatura se produce la organización de las moléculas del disolvente alrededor de las regiones hidrofóbicas, mientras que al aumentar la temperatura se liberan dichas moléculas, las cadenas colapsan produciendo la agregación del polímero y la separación de las fases. Los residuos hidrofóbicos, como Valina o Isoleucina, y una alta proporción en Glicina o Prolina favorecen este comportamiento (Acosta et al., 2025; Ruff et al., 2018).

En los casos de copolímeros de bloque, la UCST y LCST pueden coexistir, combinadas en regiones alternas. Como se puede observar en la Figura 1, UCST y LCST pueden generar dos tipos de diagramas de fases dependiendo del número de bloques y de la secuencia peptídica: si la $T_{UCST}^a < T_{LCST}^a$, se genera un diagrama con forma de reloj de arena; mientras que si $T_{UCST}^a > T_{LCST}^a$, entonces se obtiene un diagrama cerrado en bucle ^[1]. Con este tipo de sistemas, se consigue un control más preciso del ensamblaje de estructuras.

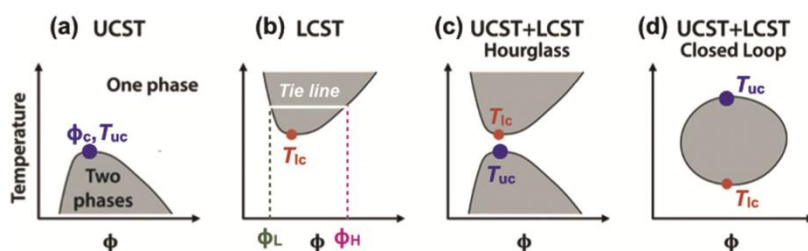


Figura 1. Tipos de transiciones de fase en respuesta a la temperatura para IDPPs. A) Curva para polímeros con comportamiento de tipo UCST; b) Curva para sistemas con comportamiento LCST; c) Curva de tipo reloj de arena para polímeros con ambos comportamientos; d) Curva de tipo bucle cerrado para polímeros con ambos comportamientos ^[2].

1.2. Recombinámeros de tipo Elastina.

Los Recombinámeros de tipo Elastina (ELRs, *por sus siglas en inglés, Elastin-Like Recombinamers*) son biomateriales considerados IDPPs que se basan en la elastina, una proteína fibrosa e insoluble que forma parte de la matriz extracelular siendo uno de sus componentes estructurales y funcionales más importantes (González-Pérez et al., 2022). La elastina dota de elasticidad a los órganos y tejidos, y en animales la encontramos en pulmones, piel, vasos sanguíneos y ligamentos. Pero su función no es únicamente estructural y mecánica, sino que también actúa como molécula señalizadora, pudiendo inducir y regular adhesión celular, proliferación o diferenciación celular ^[3,4].

Los ELRs se basan en la repetición de secuencias de pentapéptidos presentes en la elastina natural. El más estudiado es VPGXG, donde X puede ser cualquier aminoácido a

excepción de la prolina. Dependiendo de cuál sea el aminoácido en cuarta posición, algunas características como su temperatura de transición cambiarán. Los ELRs, como se ha descrito anteriormente, sufren un proceso reversible de transición inversa con la temperatura y poseen una LCST en disolución acuosa. Por debajo de esa temperatura de transición, la cadena polimérica se encuentra desordenada, hidratada y rodeada de estructuras de agua tipo clatrato, que podemos observar en la Figura 2. Por encima de la LCST, las estructuras de clatrato se excitan y se pierden por agitación térmica, las cadenas poliméricas se pliegan hidrofóbicamente sufriendo la transición conformacional y separándose en dos fases. Ahora, el polímero se encuentra ordenado con estructura de Espiral β [5]. Este cambio no conlleva una pérdida de energía.

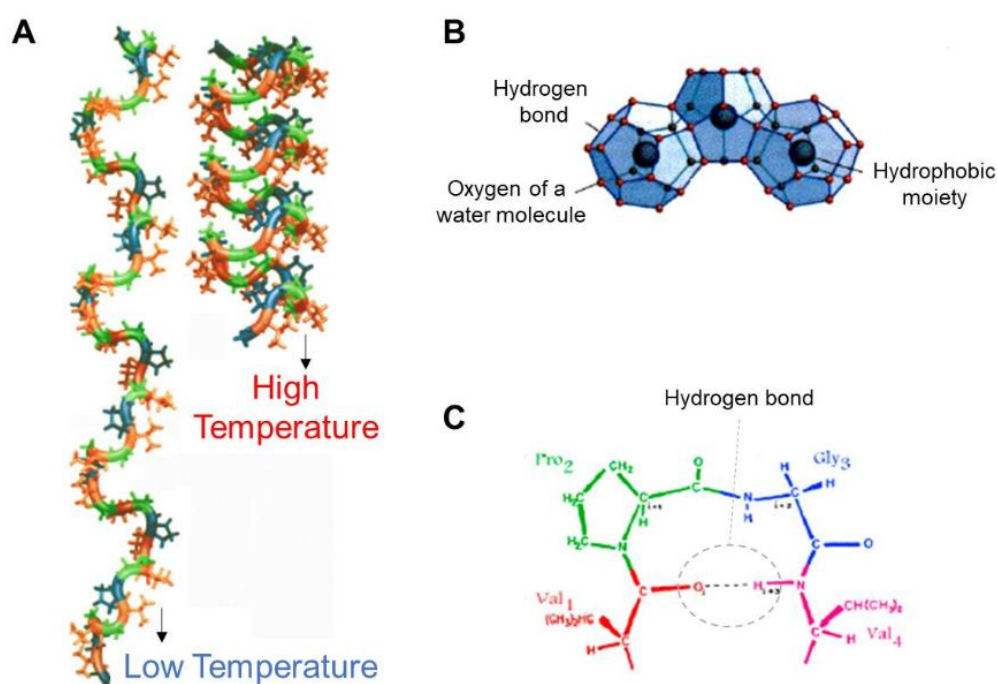


Figura 2. Cambios estructurales de los ELRs. A) Conformaciones estirada y plegada, por debajo y por encima de la temperatura de transición, respectivamente; B) estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de los polímeros; C) horquillas beta donde observamos los puentes de hidrógeno que se forman al plegarse la cadena polimérica.

La temperatura de transición es característica de cada polímero y depende de la secuencia de pentapéptidos, pero esta temperatura de transición se puede ajustar dependiendo de la aplicación si se modifica el tipo de aminoácido en la posición X, longitud del segmento, la concentración de ELR, el pH o la concentración salina del medio [6].

En los últimos años, las investigaciones en ELRs han aumentado debido a su potencial aplicabilidad en biomedicina al tratarse de biomateriales que pueden cambiar su estructura en función del ambiente que les rodea, son sensibles a estímulos del medio y biocompatibles. Un campo especialmente relevante es el de la liberación de fármacos controlada y dirigida como propone Rodríguez-Cabello [3] en su trabajo, donde describen el uso de ELRs como sistemas de administración inteligentes, diseñados en forma de

hidrogeles, depósitos macroscópicos o micelas, capaces de liberar principios activos mediante estímulos como el pH o la temperatura. Otra de sus aplicaciones la encontramos en el campo de la ingeniería de tejidos y su reparación, empleando los ELRs como estructuras biomiméticas que favorecen la regeneración celular y tisular. A la derecha, en la Figura 3B, encontramos la imagen de una válvula venosa [7] desarrollada para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica, diseñando una válvula compuesta por un stent de magnesio bioabsorbible que incorpora una malla textil reforzada con ELRs. Esta válvula demostró ser hemocompatible, capaz de soportar presiones superiores a las fisiológicas y, además, favorecer la endotelización. Por otro lado, Rodríguez Cabello et al., 2018, proponen el uso de ELRs en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas, especialmente las del cartílago articular, como en la ilustración que aparece en la Figura 3A, utilizando los hidrogeles como matrices extracelulares inyectables que promuevan la regeneración del tejido. Una de las aplicaciones más prometedoras, es el uso de estos recombinámeros en vacunas y terapias génicas. Ibáñez-Fonseca et al., 2019, revisan en su trabajo varios enfoques en los que los ELRs se han empleado como vectores no virales para la entrega de genes y antígenos, destacando su potencial gracias a su diseño modular, biocompatibilidad y capacidad de estimular respuestas inmunes específicas.

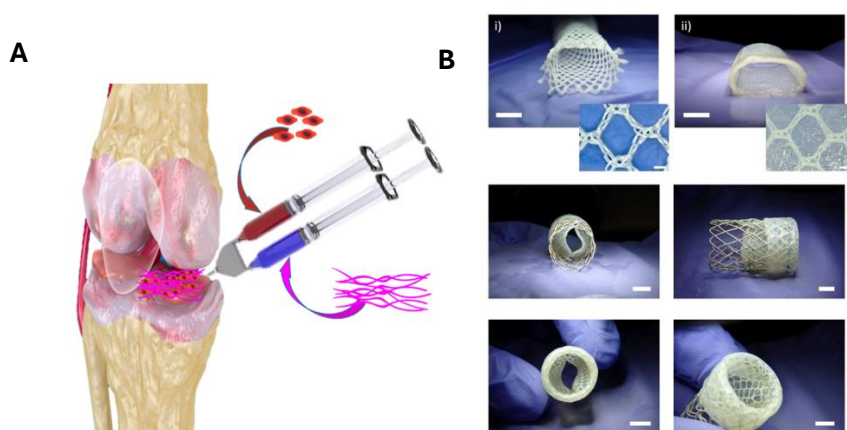


Figura 3. Ejemplos de aplicaciones de polímeros de tipo ELR. A) A la izquierda, posible aplicación de un hidrogel de ELR inyectable para lesiones osteocondrales ^[6]. B) A la derecha, el uso de ELR para recubrimientos en stent de magnesio, aportando elasticidad al mismo ^[7].

1.3. Endotoxinas.

Los polímeros ELRs se obtienen mediante tecnología de ADN recombinante. Un esquema del proceso se puede observar en la Figura 4, haciendo uso de plásmidos de ADN que contienen los genes que permitan codificar la secuencia de aminoácidos que se quiera producir, una vez introducidos en bacterias de *Escherichia Coli*. Estas bacterias se cultivan en fermentadores y, tras la bioproducción, se produce la ruptura celular y se extrae el polímero, el cual se somete a distintos procedimientos para su purificación por medio de ciclos de calentamiento-enfriamiento seguido de centrifugación.

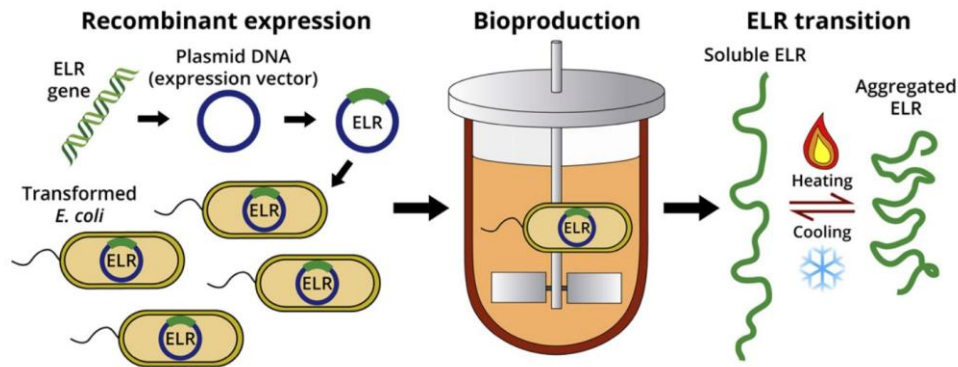


Figura 4. Representación de la producción de ELRs mediante tecnología de ADN Recombinante.

Uno de los contaminantes más importantes del proceso son las endotoxinas, lipopolisacáridos que se encuentran en las membranas externas de bacterias Gram-negativas como la *E. Coli* o la *Salmonella*. Las endotoxinas están compuestas por tres dominios estructurales, que podemos visualizar en la Figura 5:

- Oligosacárido central
- Antígeno-O: su secuencia es diferente entre especies y determina la especificidad serológica de la bacteria
- Lípido A: responsable de la actividad endotóxica.

En animales y humanos, las endotoxinas provocan altas respuestas inmunes al tratarse de sustancias pirógenas, provocando fiebres muy altas. Son inductores de inflamación y activan la respuesta inmune innata mediante el receptor TLR4, desencadenando una tormenta de citoquinas que se observa en sepsis. Aún en concentraciones muy bajas, las endotoxinas se asocian a shock séptico e, incluso, mortalidad. Estas endotoxinas se liberan durante la infección y en la lisis de la bacteria. Por todo esto, es necesaria la detección de endotoxinas en ELRs para su uso en biomedicina; pero, además, una rápida detección puede ser crucial para la toma de decisiones en diagnósticos clínicos graves ^[8,9].

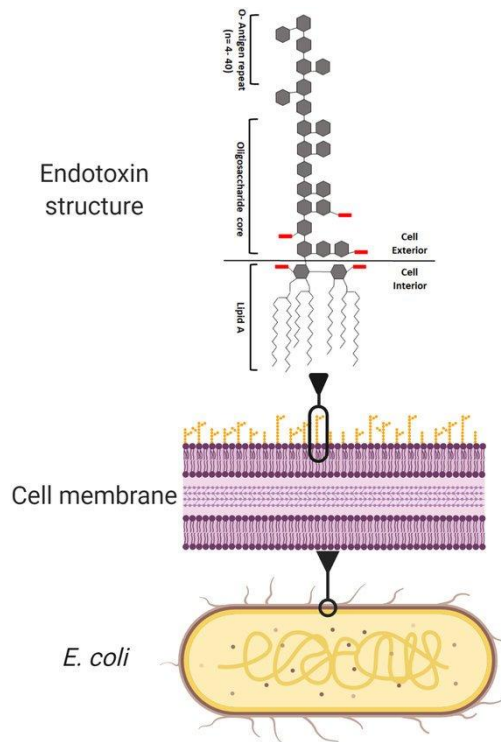


Figura 5. Estructura de endotoxinas de bacterias *E. Coli*.^[10].

Para eliminar las endotoxinas de los ELRs existen varios métodos:

- Cromatografía de intercambio iónico: las endotoxinas poseen carga negativa a pH fisiológico, lo que permite su eliminación selectiva mediante resinas de intercambio aniónico. Este método es eficiente para separar el LPS (*Lypopolisacharides*, por sus siglas en inglés) de las proteínas recombinantes sin comprometer la integridad de los ELRs. Actualmente, es la metodología estándar ^[8].
- Técnicas de separación por fases: Los ELRs presentan solubilidad reversible en función de la temperatura. Esta propiedad puede aprovecharse para separar endotoxinas, ya que permite precipitar selectivamente el ELR mientras las endotoxinas permanecen en solución. Se conoce como *Ciclo de Transición Inversa* y consiste en varios ciclos de secuencias de calentamiento, centrifugación, enfriamiento y solubilización ^[5].
- Lavados con detergentes: El uso de detergentes como Triton X-114 o polimixinas (como la B) facilita la eliminación de endotoxinas al desestabilizar sus interacciones con la proteína. Triton X-114, en particular, permite una separación por partición fase acuosa/fase micelar, concentrando el LPS en la fase micelar y dejando el ELR en la fase acuosa ^[8].
- Extracción con Fenol-Cloroformo-Petróleo (PCP): en este procedimiento, las bacterias se someten a sonicación para facilitar la liberación de LPS, seguidos de una extracción con una mezcla 1:1 de fenol y cloroformo. Tras centrifugación, los LPS se recuperan de la capa superior, evitando la fracción proteica contaminante.

Después, se lleva a cabo la precipitación mediante etanol y acetato sódico, y finalmente los LPS se purifican^[11]

1.4. Métodos de detección de endotoxinas.

Una vez los ELRs se han purificado, es necesario un protocolo de análisis que nos asegure que los polímeros están libres de endotoxinas. Para esto también existen varios métodos: desde más clásicos como los basados en LAL (*Limulus Ameobocyte Lysate*) y la Prueba de Pirógenos en Conejos (*Rabbit Pyrogen Test*, *RPT*) hasta los más innovadores aún en desarrollo.

Rabbit Pyrogen Test (RPT) es una técnica in vivo en la que se inyecta una muestra en conejos vivos y se espera el desarrollo de fiebre. Se basa en la similitud de patrones febriles entre humanos y conejos, y un aumento de 0.5°C en los 180 minutos posteriores a la inyección se considera fiebre. Es un método antiguo y sencillo con un límite de detección de 0.5 EU/mL (*Endotoxin Unit*, por sus siglas en inglés) pero se está reemplazando por técnicas más modernas, sensibles, reproducibles y más éticas, evitando el uso de animales.

En cuanto al método LAL, no es una técnica in vivo aunque utiliza un extracto de sangre del cangrejo herradura *Limulus polyphemus*. Presenta tres variantes: gel-clot (gelifica si hay endotoxina), cromogénico (usa un sustrato coloreado que se libera al activar coagulasa) y turbidimétrico (mide la turbidez para medir la concentración de endotoxinas) con límites de detección tan bajos como 0.005 EU/mL^[12].

Más recientemente, se ha desarrollado el *ensayo con factor C recombinante (rFC)*, que elimina la necesidad de utilizar productos de origen animal y ofrece alta especificidad (LOD: 0.005-0.01 EU/mL)^[13]. Mide la fluorescencia para detectar endotoxinas usando una proteína sintética derivada del gen del factor C del cangrejo herradura. También se han incorporado métodos celulares como el *Monocyte Activation Test (MAT)*, que utiliza monocitos humanos para medir la liberación de citoquinas proinflamatorias (LOD: 10EU/mL), y el *bovine Whole Blood Assay (bWBA)*, basado en la producción de prostaglandinas como respuesta a la endotoxina (LOD: 0.25EU/mL). Dentro de las técnicas más modernas podemos encontrar biosensores basados en enfoques electroquímicos, ópticos y de detección de masa que son mucho más sensibles, del orden de nano y pico gramo por mililitro^[14].

En este contexto, resulta especialmente relevante explorar nuevas herramientas analíticas que permitan una detección más directa, rápida, sensible y específica de endotoxinas. En los últimos años, se está evaluando el posible uso de la técnica de Espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS, por sus siglas en inglés, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) como una alternativa que supere los límites de detección de los métodos tradicionales. Diversos estudios han demostrado que SERS permite obtener espectros de huella digital únicos para distintos tipos de lipopolisacáridos (LPS), lo que posibilita no solo su detección, sino también su identificación específica^[9,15].

1.5. Espectroscopía Raman mejorada por superficie (SERS).

La espectroscopía Raman utiliza la dispersión inelástica de la luz que se genera al interactuar un haz de luz monocromática, como la propia de un láser, con una muestra. Esta luz excita los modos vibracionales de la molécula y la luz dispersada es direccionada hacia un detector que captura la intensidad de la luz en función de la longitud de onda, generando un espectro Raman único para cada molécula. Algunas de las ventajas que presenta la técnica son la posibilidad de analizar muestras en múltiples estados (sólido, líquido y gaseoso), no es destructiva, no es necesario un pretratamiento y es capaz de detectar todo tipo de moléculas en las que se da un cambio de polarizabilidad al ser excitadas. No obstante, una de las desventajas de esta espectroscopía es que las señales Raman son débiles generalmente, lo que impide que podamos observar espectros de algunas moléculas, en especial, moléculas orgánicas o sustancias que encontramos en bajas concentraciones.

Sin embargo, esto se hace posible con SERS, una de las técnicas emergentes más prometedoras al lograr una amplificación de la señal Raman en un factor de hasta 10^{10} . La tecnología SERS se observa por primera vez en el análisis de la piridina sobre un electrodo de plata en 1974. Desde entonces se ha ido desarrollando, hasta hoy en día cuando sabemos el gran potencial que tiene esta técnica en áreas muy diversas como la catálisis, electroquímica, análisis de macromoléculas biológicas, seguridad alimentaria, biomedicina, detección microbiológica e, incluso, en astrobiología, al tratarse de una técnica no destructiva, rápida, muy sensible, selectiva y específica ^[16,17].

Esta técnica ha experimentado un notable auge en los últimos 25 años, con un crecimiento en el número de publicaciones científicas importante, como podemos observar en la Fig.6.

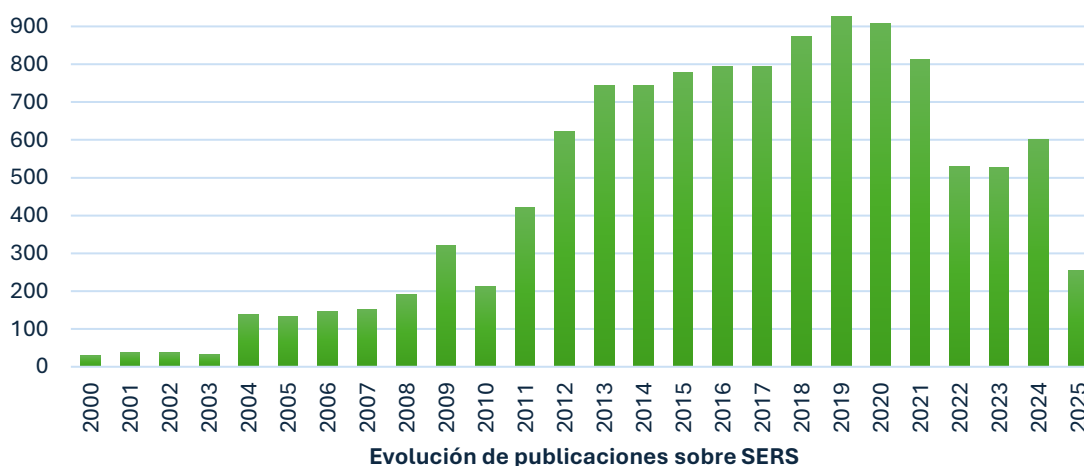


Figura 6. Publicaciones relacionadas con la técnica SERS desde el año 2000 hasta 2025.

SERS utiliza superficies de nanopartículas metálicas, generalmente de Au o Ag, que amplifican la señal gracias a sus propiedades de resonancia de plasmones de superficie localizada que se explica por la combinación de dos mecanismos:

- *Mecanismo Electromagnético*: este es el mecanismo principal. Ocurre al irradiar con luz monocromática el nanomaterial metálico que tiene propiedades plasmónicas. Esta luz excita las nanopartículas de manera que se forman plasmones, es decir, campos eléctricos localizados y amplificados cerca de las superficies metálicas, lo que intensifica la excitación de los modos vibracionales de las moléculas.
- *Mecanismo Químico*: es una amplificación menor que la anterior que se basa en interacciones electrónicas directas entre el analito y la superficie metálica. Se produce una transferencia de carga desde las nanopartículas a la molécula, de manera que aumenta el cambio en la polarizabilidad de la molécula, amplificando la señal Raman ^[16,18].

Las moléculas tienen que estar muy próximas a la superficie metálica (<10nm) y adsorbidas sobre ella. La proximidad nos permite acceder mejor a los hot spots (nanogaps entre las nanopartículas) donde la amplificación es máxima ^[18].

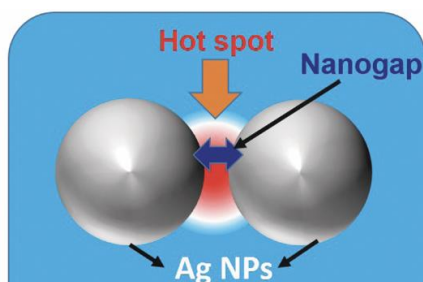


Figura 7. Representación de los hot spots que se forman entre los nanohuecos de las nanopartículas ^[19].

SERS permite analizar los analitos de forma directa e indirecta:

- *SERS intrínseco o directo*: obtenemos el espectro directamente de las moléculas que se adsorben al sustrato.
- *SERS extrínseco o indirecto*: se añaden ligandos específicos para los analitos que nos interesan a las nanopartículas del sustrato.

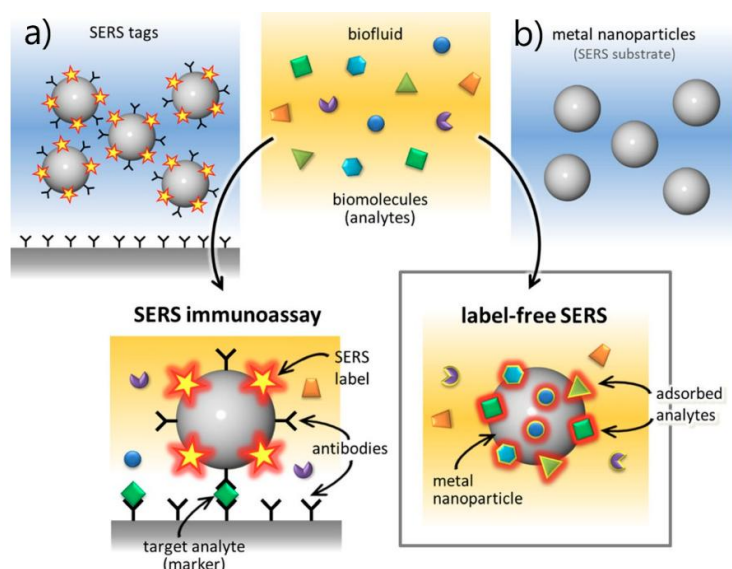


Figura 8. Representación de los dos posibles protocolos de actuación de la técnica SERS: a) Detección indirecta, se utilizan ligandos selectivos al analito de interés; b) Detección directa, el analito se adsorbe directamente al sustrato de nanopartículas ^[18]

Los sustratos que se utilizan tienen que tener alta actividad SERS, buena reproducibilidad, homogéneos, libres de contaminantes superficiales y ser estables ya que la precisión y sensibilidad de la técnica depende de ellos, en especial en el control de calidad ^[16]. En los últimos años, los avances en el campo de la estandarización de los métodos de fabricación de sustratos SERS ha llevado a la producción y comercialización de estos, con las características descritas anteriormente. Entre ellos, cabe destacar los sustratos de nanopilares de silicio recubiertos con plata u oro (Ag/Au NP) mediante grabado iónico reactivo sin máscara (RIE). Se fabrican rápidamente (<15min), son económicos y es un proceso escalable. El proceso de fabricación se lleva a cabo en tres etapas: primero, se generan nanopilares de silicio mediante RIE sobre obleas de silicio; después, se limpian los posibles residuos de la superficie con plasma de oxígeno; por último, se recubre la superficie con una capa continua de plata mediante evaporación por haz de electrones. El resultado son estructuras de alta densidad, ~20 pilares/ μm^2 con geometrías que se pueden variar. Estos sustratos exhiben resonancias plasmónicas de superficie localizada (LSPR) con modos de partícula y de cavidad diferenciados que generan campos eléctricos localizados alrededor de los pilares. El diseño de los sustratos permite que puedan optimizarse y adaptarse a varias longitudes de onda de excitación dependiendo de la aplicación del ensayo y son altamente reproducibles ^[20].

1.6. Limitaciones de los sustratos SERS comerciales.

A pesar de que los sustratos SERS actualmente en comercio garantizan una alta sensibilidad y reproducibilidad, todos ellos presentan un problema de durabilidad. Las nanoestructuras metálicas se oxidan en contacto con oxígeno o luz. Esto hace que la sensibilidad y reproducibilidad de los sustratos decaiga gradualmente a lo largo de unos pocos días o semanas de estar expuesto al ambiente exterior, lo que limita enormemente

su posible aplicación como método de caracterización estándar en aplicaciones biomédicas. Este problema se ha intentado resolver en los últimos años proponiendo proteger los sustratos con una capa protectora mediante el método Atomic Layer Deposition (ALD). Con ALD es posible diseñar con precisión nanoestructuras controlando el tamaño y composición a nivel atómico ajustando las condiciones de su síntesis. Es una técnica que se usa en diferentes campos de aplicación, como catálisis o medioambiente, pero en SERS se ha utilizado con éxito para fabricar sustratos de nanopartículas de Ag y Au, películas ultrafinas, nanogaps ajustables y zonas de alta densidad de hotspots, permitiendo una alta amplificación del campo electromagnético.

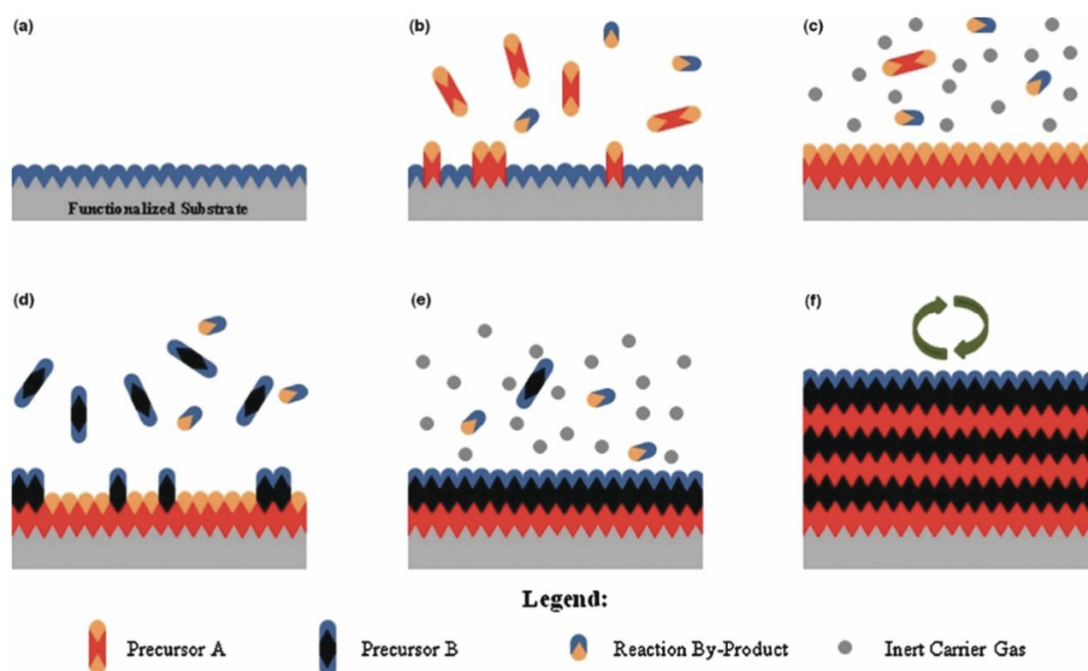


Figura 9. Esquema del proceso de deposición ALD. a) Superficie del sustrato; b) Se introduce el producto A y reacciona con la superficie; c) los subproductos de la reacción y el exceso de precursor A se eliminan con un gas inerte; d) Se introduce el precursor B y reacciona; e) el exceso y subproductos se eliminan con el gas inerte; f) se repiten los pasos hasta conseguir el grosor de la capa ALD que necesitamos ^[19].

En el proceso ALD, representado en la Fig.9, se usan dos precursores químicos que reaccionan secuencialmente de forma alterna con la superficie del sustrato, deteniéndose cuando han reaccionado por completo con la superficie, esto se conoce como ciclo de deposición. Se consigue formar una monocapa del producto final y puede ser tan gruesa como se desee repitiendo los ciclos de deposición. Normalmente, el espesor de las capas suele estar entre 1 y 5 nm, siendo lo suficientemente sutil como para garantizar que ocurra el efecto plasmónico pero, al mismo tiempo, es suficientemente gruesa como para evitar el proceso de oxidación de las nanoestructuras metálicas. Sin embargo, hay que destacar que al aumentar el grosor de la capa el efecto protector también es mayor pero el efecto plasmónico disminuirá, visualizando picos menos intensos respecto al sustrato SERS sin capa ALD, afectando así al límite de detección.

Para solventar el problema de la durabilidad, se utilizan finas capas de óxidos que recubren los sustratos, los tres óxidos más usados son Al_2O_3 , HfO_2 y TiO_2 que permiten estabilizar los sustratos nanoestructurados a lo largo del tiempo y a altas temperaturas, manteniendo la sensibilidad ^[19]. No obstante, el uso de la capa ALD provoca la emisión de fluorescencia en el visible generando, en función de la longitud de onda de excitación de la fuente láser empleada, un background que podría ocultar bandas del espectro SERS del compuesto analizado.

1.7. Marco de trabajo.

Este trabajo se encuentra dentro de una de las líneas de investigación conjunta entre el GIR ERICA y Bioforge, englobados en la unidad de excelencia LaDIS (*Laboratory for Disruptive Interdisciplinary Science*). En el grupo ERICA son expertos en el desarrollo de tecnologías Raman innovadoras para exploración espacial, liderando el desarrollo del RLS (*Raman Laser Spectrometer*) a bordo del rover Rosalind Franklin de la misión ESA/ExoMars, y Supercam, que encontramos en el rover Perseverance de la misión NASA/Mars 2020. El grupo apunta a transferir parte del conocimiento generado en misiones espaciales hacia el campo de las aplicaciones terrestres. Bioforge es el grupo de investigación que se encuentra al frente del desarrollo de los ELRs con numerosas publicaciones sobre el tema y sus potenciales aplicaciones. Por otro lado, el grupo ERICA está colaborando con el grupo IDUN (*center for Intelligent Drug delivery and Sensing Using Microcontainers and Nanomechanics*) que pertenece a la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU), especializados en la fabricación de sustratos SERS y pioneros en la fabricación de los sustratos SERS con capa ALD. De esta forma, el grupo IDUN es el encargado de la fabricación de los sustratos SERS y Bioforge de proporcionar las muestras de ELRs. En el grupo ERICA, se han llevado a cabo todos los análisis Raman y su interpretación.

2. Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es:

Evaluar el potencial de la técnica SERS como un protocolo analítico rápido y fiable para la discriminación de la contaminación de Elastina por Endotoxinas.

Para ello, se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar la afinidad de los sustratos SERS fabricados por IDUN con las longitudes de onda mayormente empleadas en espectroscopia Raman (532, 633 y 785nm).
- Comparar la sensibilidad de los dos tipos de sustratos SERS: con capa ALD y los convencionales, sin capa ALD.
- Analizar inicialmente el polímero de Elastina contaminado y el polímero puro, para comparar sus espectros SERS e identificar indicadores Raman para su diferenciación.

- Evaluar la capacidad de la tecnología SERS para identificar la presencia de endotoxinas en ELR contaminadas.

3. Materiales y métodos.

3.1. Muestras.

Las muestras analizadas son polímeros de tipo ELRs producidos por el grupo Bioforge mediante expresión bacteriana en *E. coli*. Tras la producción, las muestras fueron purificadas mediante cromatografía iónica a través de una “*Spin Column 1.0mL*” de Thermo Scientific, lo que permitió eliminar impurezas bacterianas. Además de la muestra purificada, se trabajó con una muestra de ELR sin purificar, que conservaba las endotoxinas.

Todas las muestras se recibieron en forma de polvo seco, obtenido por liofilización. Antes del análisis de muestras líquidas, se disolvieron en agua ultrapura a diferentes concentraciones: 50 mg/mL para la muestra de ELR contaminada y 100mg/mL para la muestra de ELR purificada. También se analizaron las muestras liofilizadas de ELR contaminada y pura.

Para la medición SERS, se depositaron 1 μ L de cada disolución sobre el sustrato SERS. Las gotas se dejaron secar al aire durante unos 5 minutos en condiciones ambientales favoreciendo la adsorción de las moléculas sobre la superficie activa y la formación espontánea de *hot spots*.

3.2. Sustratos SERS.

Los sustratos SERS empleados en este estudio fueron suministrados por el grupo IDUN (*Center for Intelligent Drug Delivery and Sensing Using Microcontainers and Nanomechanics*). Este grupo cuenta con una spin-off, Silmeco ApS, dedicada a la comercialización de estos sustratos bajo el nombre *SERStrates*, reconocidos por su alta calidad. Se han utilizado dos tipos de sustratos: sin capa ALD y con capa ALD.

Los sustratos están formados por nanopilares de silicio flexibles recubiertos con una capa de plata metálica. Su fabricación consta de dos etapas: en la primera, se lleva a cabo un grabado en seco sin máscara (maskless dry etching) para formar nanopilares verticales de silicio de alturas entre 600–1600 nm y 50–80 nm de ancho; y, a continuación, se recubren estos pilares con plata por evaporación electrónica, formando cúmulos metálicos en las puntas que favorecen la generación de hot spots al inducir la inclinación de los pilares como se representa esquemáticamente en la Figura 10 (Schmidt et al., 2012).

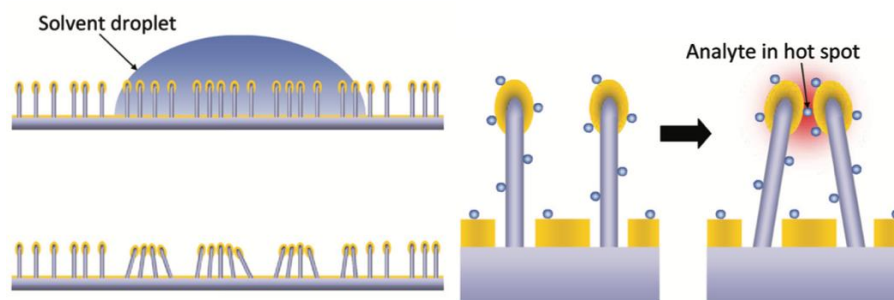


Figura 10. Esquema del mecanismo de inclinación. Al depositar la gota de muestra, el disolvente se evapora y debido a la tensión superficial hace que los nanopilares de silicio se inclinen unos hacia otros, atrapando el analito en el hot spot, aumentando la señal Raman ^[21].

La deposición de la capa ALD se lleva a cabo como se ha explicado en la sección anterior, mediante Atomic Layer Deposition ^[22]. En nuestro caso, se ha depositado una capa de HfO_2 con un espesor optimizado de 1.5nm.

3.3. Instrumentación.

Para la caracterización espectroscópica de las muestras se emplearon tres sistemas Raman con diferentes longitudes de onda de excitación: 532nm, 633 nm, y 785 nm. Además, se tomaron espectros IR.

- **Espectroscopía IR:** se utilizó un espectrómetro por Transformada de Fourier PerkinElmer Spectrum 100N FTIR. Se tomaron 3 espectros por cada muestra liofilizada. Las muestras líquidas no pudieron analizarse debido a que el cabezal del instrumento no lo permite.
- **Espectrómetro Raman 532nm:** Este equipo utiliza un láser BWTEK BWN-532-100-OEM, acoplado a un cabezal Raman BWTEK BAC100-532E. El sistema óptico incluye un espectrómetro Kaiser Optical Systems Inc. HoloSpec f/1.8-VIS y un detector CCD Andor Newton DU940N-BV. Se adquirieron entre 3 y 5 espectros por muestra, con tiempos de integración entre 51 y 90 s y de 3 a 5 acumulaciones, ajustando los parámetros en función de la intensidad y del fondo fluorescente.
- **Espectrómetro Raman 633nm:** El sistema, ensamblado por el propio grupo, se basa en un láser de helio-neón (LSRP-3501, Research Electro-Optics) con una longitud de onda de 633 nm, acoplado a una sonda HFPH (Kaiser Optical Systems Inc.), un espectrómetro Holospec 1.8i (KOSI) y un detector CCD (Andor DV420A-OE-130). Está montado sobre un microscopio Nikon Eclipse E600 y dispone de objetivos de larga distancia de trabajo de 5x, 10x, 20x, 50x y 100x ^[23]. Se analizaron entre 5 y 10 puntos por muestra, la potencia de medida se marcó en 1mW, un rango espectral de $130\text{--}3780\text{ cm}^{-1}$, tiempos de adquisición entre 30 y 90 segundos y 5 acumulaciones por espectro en función de la intensidad y fondo de las señales para cada muestra.
- **Espectrómetro Raman 785nm:** En este caso se utilizó un láser BWTEK BRM-OEM-785-0.30-100-0.22-FC junto a un cabezal Raman BWTEK BAC100-785E. El sistema cuenta

con un espectrómetro BWTEK Prime T BTC661E-785CUST y un detector CCD Hamamatsu S10141-1107S. El análisis se realizó utilizando una potencia de 5 mW, un rango espectral entre 0-3000 cm^{-1} , tiempo de integración de entre 5 y 25 segundos, de 3 a 10 acumulaciones y entre 3 y 12 puntos por muestra dependiendo de la intensidad y fondo.

3.4. Tratamiento de datos.

El análisis de los espectros Raman se realizó mediante dos enfoques diferenciados, en función del sistema de adquisición empleado.

Para los espectros obtenidos con el espectrómetro de 785 nm, se utilizó el software SpectPro, desarrollado por la Universidad de Valladolid. Este programa permite visualizar, procesar y comparar espectros Raman, y ofrece herramientas específicas como corrección de línea base, desplazamiento espectral, etiquetado de bandas, cálculo de SNR o ajuste de curvas, entre otras ^[24]. En este caso, el tratamiento de los datos incluyó la sustracción del espectro de borato de zinc, empleado como fondo de referencia para corregir los efectos de *etalonning* del espectrómetro, seguida de la corrección de línea base utilizando las herramientas disponibles en la interfaz del software.

Para los espectros registrados con los sistemas de 633 nm y 532 nm, el tratamiento se realizó en Matlab, debido a que estos espectrómetros generan los espectros en dos tracks separados, que deben ser combinados y calibrados. El protocolo consistió en: (1) calibración espectral de los datos crudos, (2) sustracción del espectro de borato de zinc como referencia de fondo, y (3) corrección de línea base.

En todos los casos, el objetivo del preprocesado fue mejorar la calidad espectral y minimizar artefactos instrumentales, asegurando así una interpretación más fiable de los resultados.

4. Resultados.

4.1. Análisis espectral convencional.

4.1.1. Análisis espectral por Espectroscopía Infrarroja (IR).

La identificación de los grupos funcionales característicos de las muestras de ELR se ha apoyado en la espectroscopía IR. Para ello, se analizó una muestra liofilizada de ELR contaminada con Endotoxina, que se presenta en la Figura 11 (A) y una muestra de ELR pura, mostrada en la Figura 11 (B).

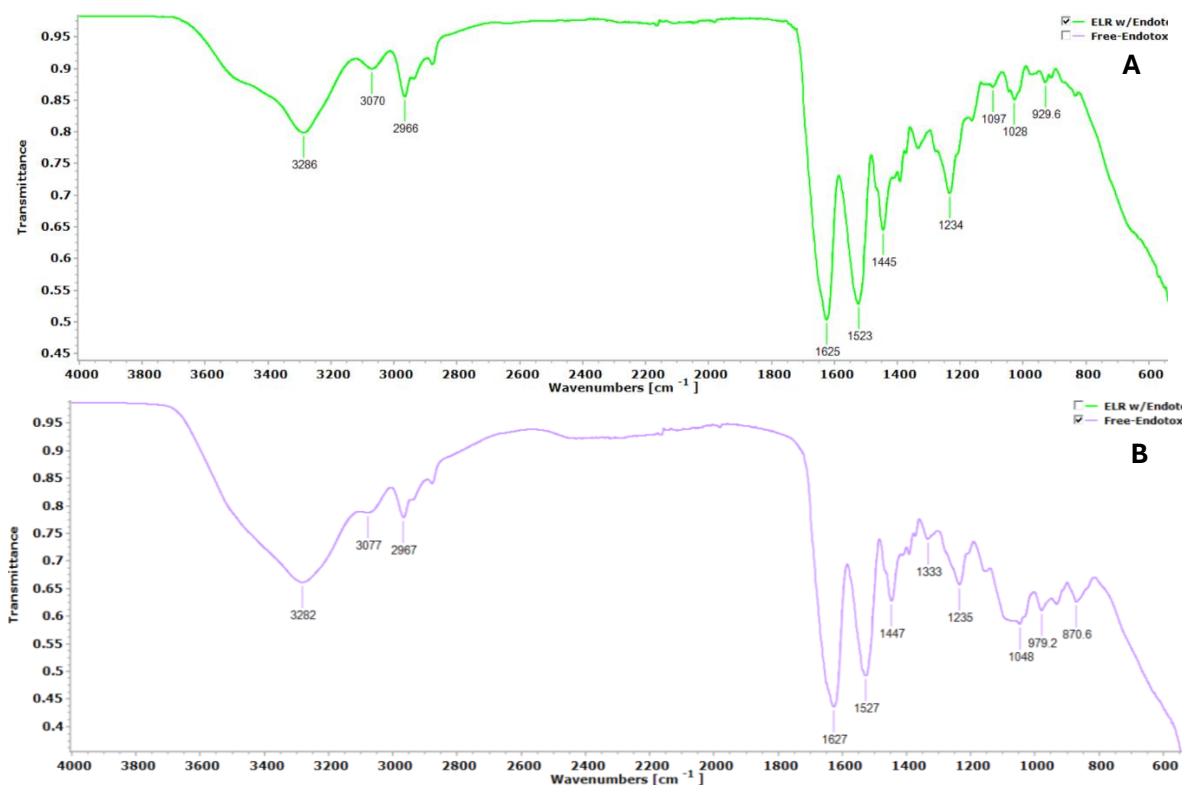


Figura 11. Espectros Infrarrojo característico de: A) ELR contaminado y B) ELR puro.

En la Tabla 1 se recogen las vibraciones características observadas experimentalmente para ambas muestras, junto con la asignación teórica reportada en la bibliografía para este tipo de polímeros.

En la tabla se observa que ambas muestras presentan las mismas bandas características, correspondientes a los grupos funcionales esperados en los polímeros de tipo ELR: la banda de estiramiento N-H en torno a $3280\text{--}3300\text{cm}^{-1}$, el estiramiento C-H de grupos metilo (CH_3) cerca de $2965\text{--}2970\text{cm}^{-1}$, y las bandas de Amida I y Amida II, propias de las estructuras peptídicas, entre $1600\text{--}1700\text{cm}^{-1}$ y $1520\text{--}1535\text{cm}^{-1}$, respectivamente [25]. Además de estas señales, se detectan otras contribuciones en diferentes regiones del espectro que, si bien son reproducibles, no han podido asignarse a modos vibracionales concretos debido a la falta de referencias bibliográficas para este tipo de materiales, lo que limita la posibilidad de realizar asignaciones más detalladas.

Al comparar los espectros, se observan pequeñas diferencias en el desplazamiento de las bandas, comprendidas entre 0.7 y 7.1 cm^{-1} . Sin embargo, dado que la sensibilidad instrumental se encuentra en torno a $3\text{--}4\text{ cm}^{-1}$, únicamente los desplazamientos que tengan una diferencia superior a ese umbral se podrían atribuir con cierta fiabilidad a los cambios producidos por contaminación de Endotoxinas. Si seguimos este criterio, las variaciones en torno a la región de 3070cm^{-1} y, aunque en menor medida, en la banda de estiramiento N-H a 3300 cm^{-1} podrían reflejar una mayor sensibilidad a perturbaciones locales inducidas por la presencia de Endotoxina. En cambio, las variaciones más pequeñas, como las observadas en la región de Amida I, en torno a 1650cm^{-1} , y el estiramiento C-H, en la franja entre 2965 y 2970 cm^{-1} , no pueden diferenciarse de la

variabilidad asociada al propio equipo. Por otro lado, tampoco se detectan bandas adicionales ni cambios espectrales que sean significativos como para atribuirse a componentes de la endotoxina.

Estos resultados sugieren que, aunque no es posible detectar directamente las bandas características debidas a las endotoxinas, al menos puede observarse que su presencia perturba los modos vibracionales de la elastina. Las perturbaciones más evidentes, aquellas superiores a 3 cm^{-1} , podrían emplearse como indicadores de posibles contaminantes en este tipo de polímeros.

	ELR w/Endotoxin				ELR Free-Endotoxin				Measured Shift	Vibration Mode
	<i>Spectrum 1</i>	<i>Spectrum 2</i>	<i>Spectrum 3</i>	<i>Average</i>	<i>Spectrum 1</i>	<i>Spectrum 2</i>	<i>Spectrum 3</i>	<i>Average</i>		
Peak 1	1233.6	1233.5	1233.9	1233.7±0.3	1235.4	1235.7	1235.2	1235.4±0.2	1.3	
Peak 2	1333.7	1333.6	1333.7	1333.7±0.1	1333.1	1332.6	1333.3	1333±0.3	0.7	
Peak 3	1445.3	1445.0	1445.6	1445.3±0.4	1447.1	1446.9	1446.4	1446.8±0.2	1.5	Amida II ^[25]
Peak 4	1523.3	1523.2	1523.5	1523.3±0.4	1527.9	1525.6	1526.6	1527.1±0.3	3.8	Amida I ^[25]
Peak 5	1625.2	1625.6	1625.1	1625.3±1.2	1626.6	1627.4	1626.1	1626.6±0.1	1.3	
Peak 6	2965.9	2966.0	2965.7	2965.9±0.4	2966.1	2966.8	2966.8	2966.6±0.2	0.7	CH3 str. ^[25]
Peak 7	3070.4	3069.5	3069.7	3069.9±1.5	3075.6	3078.3	3076.0	3077±0.5	7.1	
Peak 8	3286.2	3285.3	3286.4	3285.9±1.6	3283.3	3280.2	3281.3	3281.8±0.6	4.9	NH str. ^[25]

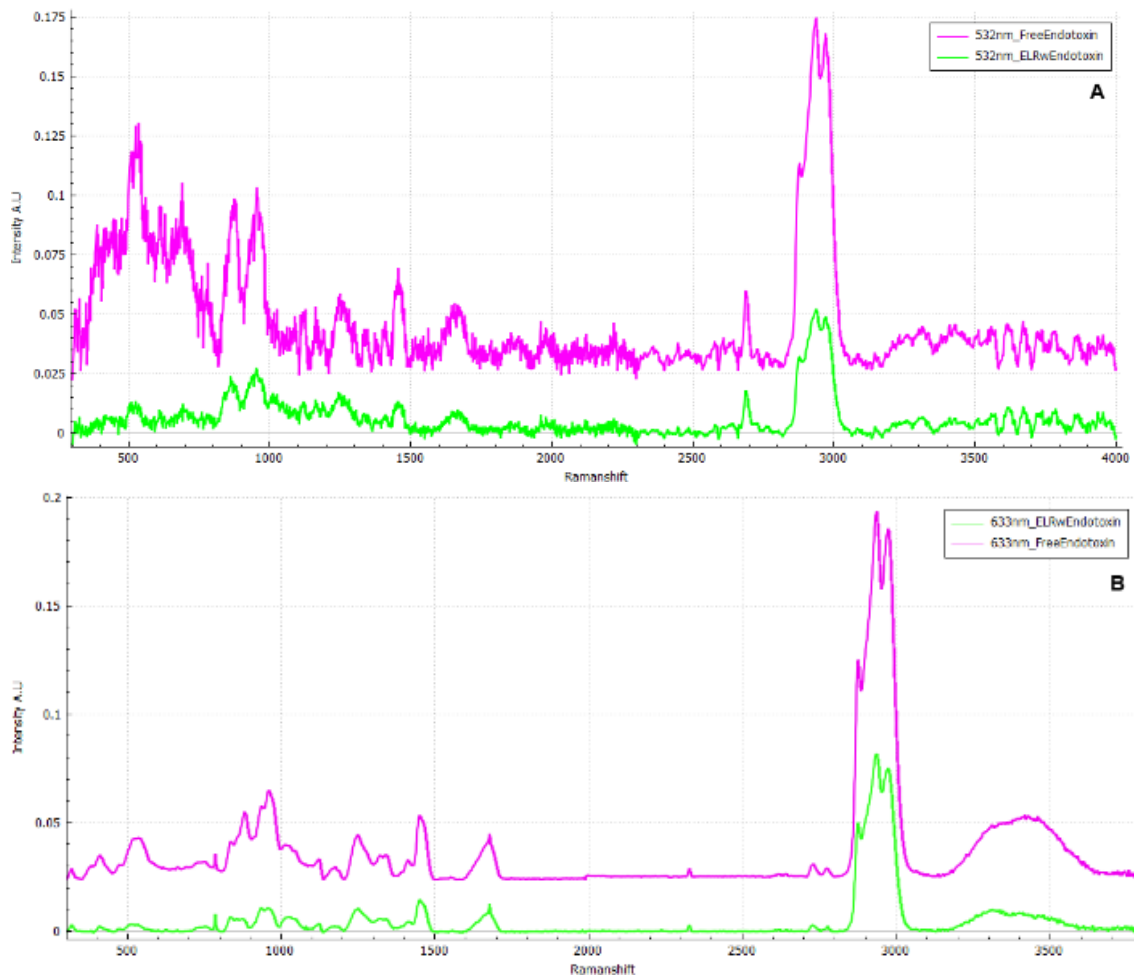
Tabla 1. Posiciones de banda observadas para ELR contaminado y ELR puro, comparadas con el rango teórico.

4.1.2. Análisis espectral por Espectroscopía Raman.

De manera complementaria a los análisis FTIR, se llevó a cabo un análisis por espectroscopía Raman convencional con el objetivo de valorar la capacidad de la técnica de diferenciar entre las dos muestras estudiadas: ELR pura y ELR contaminada. Se utilizaron tres longitudes de onda: 532nm, 633nm y 785nm. En este caso, se consideraron tanto muestras liofilizadas como muestras en disolución acuosa, de manera que se pudiera evaluar el efecto del estado físico en las bandas características observados. Para cada longitud de onda se adquirieron espectros de ELR pura, ELR contaminada y, en el caso de las muestras líquidas, también de agua Mili-Q.

4.1.2.A. Análisis Raman de muestras liofilizadas.

Los espectros que se obtuvieron en cada una de las longitudes de onda se presentan en la Figura 12: a) 532nm, b) 633nm y c) 785nm.



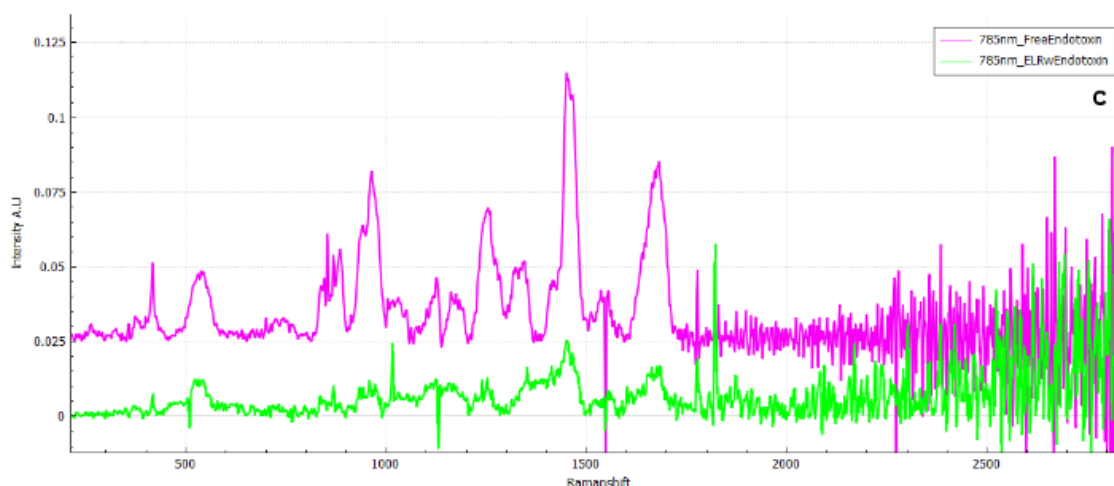


Figura 12. Espectros Raman convencional de las muestras de ELR contaminada (verde) y ELR pura (rosa) con las longitudes de onda: a) 532nm, b) 633nm y c) 785nm.

En conjunto, los resultados que se han obtenido para las muestras liofilizadas muestran señales de baja intensidad y, en el caso de las longitudes de onda de 532nm y 785nm, los espectros presentan un nivel de ruido elevado, llegando a enmascarar algunas bandas debido al fondo espectral. El láser de 633nm proporciona los espectros de mayor definición, permitiendo una identificación más fiable de las bandas características de ambas muestras. El desplazamiento de las bandas en 633nm se muestra en la Tabla 2 y el espectro más detallado en la Figura 13.

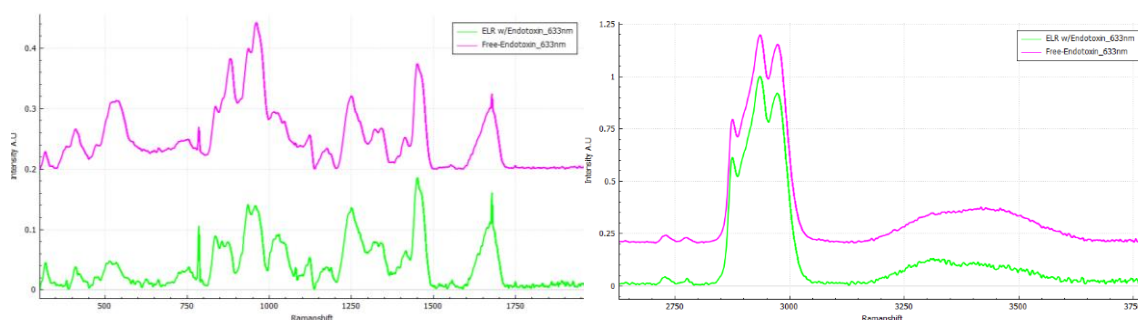


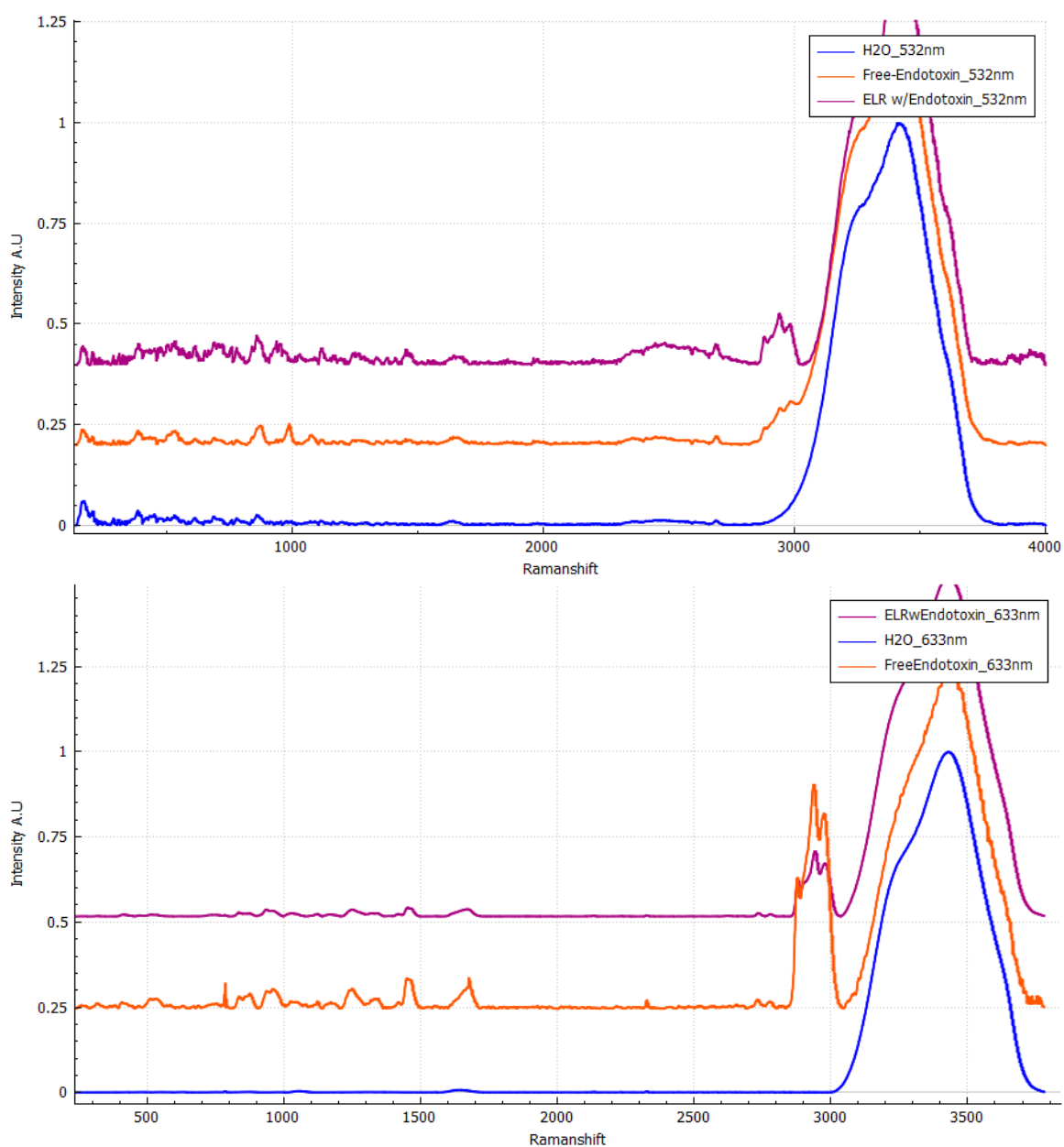
Figura 13. Espectro Raman de las muestras de ELR contaminada (verde) y ELR pura (rosa) registrado con longitud de onda 633nm. Derecha: región espectral entre 300-1950cm⁻¹. Izquierda: región espectral entre 2700-3750cm⁻¹.

Las diferencias en los desplazamientos que se observan entre la ELR pura y la ELR contaminada son pequeñas, entre 1 y 7 cm⁻¹, a excepción de la señal situada en torno a 836 cm⁻¹. Sin embargo, dado que la resolución de un espectrómetro sencillo se sitúa en torno a 3-4 cm⁻¹ también, solo las variaciones superiores se podrán atribuir a variaciones reales entre las muestras. De esta manera, la banda a 836cm⁻¹ que tiene una variación superior, en torno a 40cm⁻¹, y las variaciones en la región de 3430cm⁻¹, con variaciones cercanas a 7cm⁻¹, reflejarían el cambio estructural debido a la presencia de endotoxinas. Al contrario, las diferencias que se observan en las bandas a 1250, 1450, 1670 y 2940cm⁻¹, no superan la resolución instrumental y, por tanto, no pueden ser concluyentes.

En cuanto a la forma de las bandas, se observa que en todos los casos el espectro de ELR pura presenta señales más definidas y con mayor intensidad relativa que las de la ELR contaminada, aunque sin diferencias remarcables que permitan distinguir con claridad entre ambas muestras.

4.1.2.B. Análisis Raman de muestras líquidas.

En este caso, los espectros que se han obtenido se presentan en la Figura 14. Además de las muestras de ELR pura y contaminada, se incluyó el espectro del agua mili-Q para evaluar la influencia del disolvente.



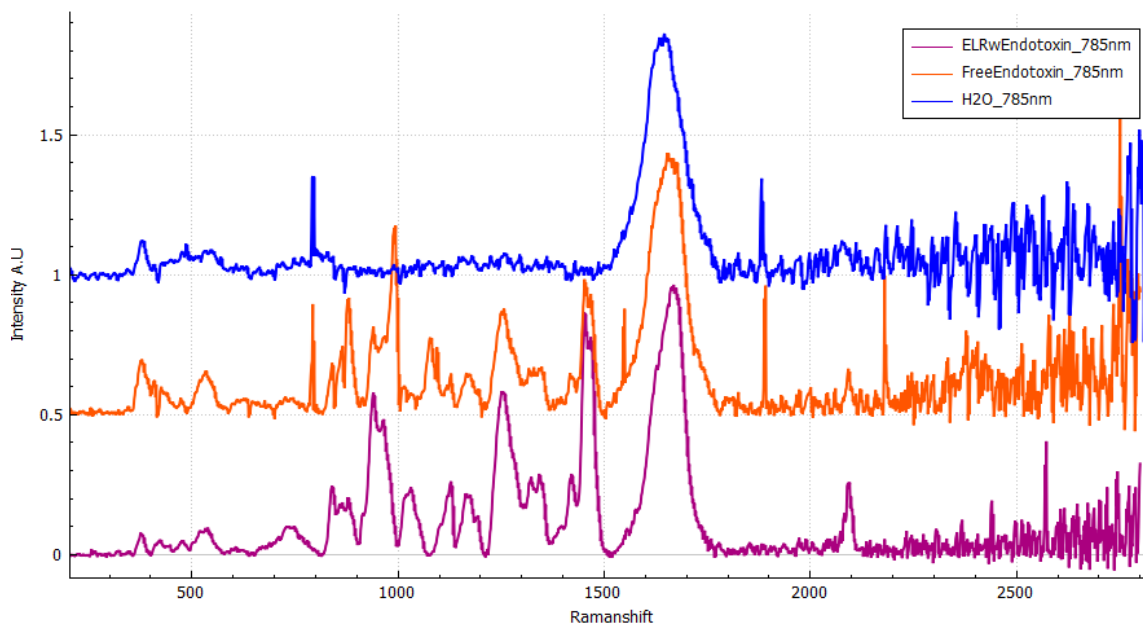


Figura 14. Espectros Raman convencional de las muestras líquidas de ELR contaminada (morado), ELR pura(naranja) y H2O (azul) con las longitudes de onda: a) 532nm, b) 633nm y c) 785nm.

En conjunto, los espectros de las muestras líquidas muestran una contribución significativa del agua que se observa en la región de 3100-3600 cm^{-1} , donde domina la banda de estiramiento O-H. El láser de 633nm proporcionó los espectros de mayor calidad y rango más amplio, permitiendo observar tanto las regiones de bajas frecuencias como la zona de estiramiento C-H y O-H situadas a desplazamientos más altos. Por otro lado, con el láser de 785nm se logran señales definidas entre 300 y 2000 cm^{-1} ; sin embargo, el espectrómetro empleado tiene un rango de trabajo más limitado alcanzando sólo hasta 3000 cm^{-1} y, a partir de 2100 cm^{-1} , el ruido aumenta considerablemente, lo que impide identificar la banda de estiramiento C-H y la banda propia del agua. Por estas razones, los espectros registrados a 633nm se utilizaron como referencia para el análisis más detallado.

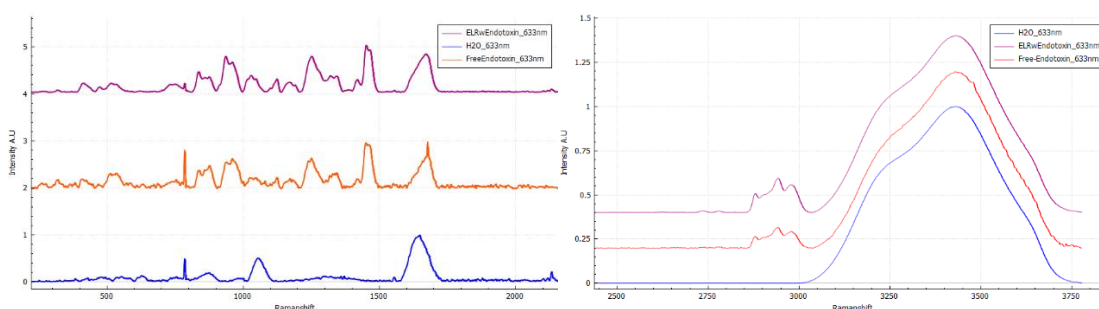


Figura 15. Espectros Raman convencional de las muestras líquidas de ELR contaminada (morado), ELR pura(naranja) y H2O (azul) registrado con longitud de onda 633nm. Derecha: región espectral entre 300-2100 cm^{-1} . Izquierda: región espectral entre 2500-3750 cm^{-1} .

En la Figura 15 se muestran más detallados los espectros de ELR pura y contaminada líquidas registradas a 633nm. En la Tabla 3 se recogen los picos característicos a modo de resumen y los desplazamientos medidos entre ambas muestras. Al comparar los espectros, se observa que la mayoría de las diferencias en los desplazamientos son

pequeñas, entre 0.4 y 2.8 cm^{-1} , y, por tanto, se encuentran dentro del margen de sensibilidad instrumental del equipo. La señal del modo de vibración del agua, en torno a 3430 cm^{-1} , presenta un desplazamiento superior al umbral y que puede indicar como afecta la presencia de endotoxinas en estas muestras. Sin embargo, el estiramiento O-H se presenta como una banda ancha por lo que esta diferencia no resulta lo suficientemente clara como para afirmar que se debe a la presencia de endotoxinas. El resto de las bandas muestran diferencias menores que no permiten establecer conclusiones firmes.

Si nos fijamos en el perfil espectral de ambas muestras, son muy similares, aunque si podemos observar como en la zona entre 800 y 1100 cm^{-1} existe alguna variación en el desdoblamiento de las bandas. Sin embargo, estos cambios no son lo suficientemente intensos como para ser considerados significativos y poder identificar con claridad las muestras puras y contaminadas.

Con estos resultados, se plantea la necesidad de utilizar técnicas que puedan amplificar la señal de las moléculas orgánicas y nos permitan caracterizar muestras como las de este trabajo. Por ello, se analizaron las muestras de Elastina contaminada y pura por medio de Espectroscopía SERS.

Lyophilized Samples Raman Spectrum 633nm											
	ELR w/Endotoxin					ELR Free-Endotoxin					Measured shift
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Average	Intensity	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Average	Intensity	
Peak 1	951.6	954.8	957.6	954.7±3	m	961.9	960.4	960.1	960.8±1	m	6.1
Peak 2	1249.6	1249.8	1251.3	1250.2±0.9	m	1250.0	1251.9	1250.3	1250.7±1	m	0.5
Peak 3	1451.8	1448.9	1450.6	1450.4±1.5	m	1450.1	1450.1	1451.1	1450.4±0.6	m	0.0
Peak 4	1677.0	1677.1	1677.0	1677±0.1	m	1673.2	1673.0	1673.3	1673.2±0.2	m	3.8
Peak 5	2933.5	2934.7	2935.5	2934.6±1	s	2936.0	2935.5	2935.5	2935.7±0.3	s	1.1
Peak 6	3318.4	3318.3	3318.3	3318.3±0.1	m	3409.0	3407.6	3408.8	3408.5±0.8	m	90.2

Tabla 2. Posiciones de bandas más significativas observadas para ELR contaminada y ELR pura liofilizadas obtenidas para longitud de onda 633nm.

Liquid Samples Raman Spectrum 633nm											
	ELR w/Endotoxin					ELR Free-Endotoxin					Measured shift
	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Average	Intensity	Spectrum 1	Spectrum 2	Spectrum 3	Average	Intensity	
Peak 1	935.6	935.8	936.3	935.9±0.4	w	940.4	936.5	935.4	937.4±2.6	w	1.5
Peak 2	1251.4	1251.9	1251.7	1251.7±0.3	w	1251.5	1245.9	1249.2	1248.9±2.8	w	2.8
Peak 3	1452.5	1450.6	1451.2	1451.4±1	w	1449.8	1448.6	1452.8	1450.4±2.2	w	1.0
Peak 4	1672.4	1670.9	1670.1	1671.1±1.2	w	1673.1	1673.0	1673.4	1673.2±0.2	w	2.1
Peak 5	2942.5	2942.8	2942.5	2942.6±0.2	m	2942.4	2941.4	2942.9	2942.2±0.8	m	0.4
Peak 6	3429.0	3428.9	3428.7	3428.9±0.2	s	3437.4	3439.9	3433.9	3437.1±3	s	8.2

Tabla 3. Posiciones de bandas más significativas observadas para ELR contaminada y ELR pura en disolución obtenidas para longitud de onda 633nm.

4.2. Caracterización SERS.

Los resultados obtenidos mediante espectroscopía IR y Raman convencional han mostrado que, si bien ambas técnicas permiten confirmar la composición general del polímero localizando qué regiones espectrales son relevantes, carecen de la sensibilidad suficiente para diferenciar entre las muestras de ELR pura y contaminada con endotoxinas.

En este contexto, la técnica SERS se aplicó a las muestras de ELR contaminado y ELR puro con el objetivo de identificar bandas espectrales diferentes que permitan una identificación sensible y rápida de los polímeros contaminados por endotoxinas. Para ello, se han realizado medidas puntuales sobre sustratos SERS con y sin recubrimiento ALD, optimizando previamente la longitud de láser y el tipo de sustrato escogido.

4.2.1. Optimización de las condiciones analíticas SERS: comparación de sustratos y longitudes de onda.

Con el fin de establecer la configuración óptima para los análisis SERS, se evaluaron los dos sustratos (con recubrimiento ALD y sin él) bajo tres longitudes de onda de excitación (532, 633 y 785nm). Los resultados se presentan a continuación.

En primer lugar, se analizaron los sustratos SERS (con y sin recubrimiento ALD) en ausencia de muestra depositada, con el objetivo de identificar las señales de fondo asociadas exclusivamente al sustrato. Con esta comparación podremos discriminar posteriormente qué bandas corresponden al propio sustrato y cuáles provienen de las muestras analizadas.

Los espectros obtenidos a diferentes longitudes de ondas (532, 633 y 785nm) se representan en las Figuras 16, 17 y 18. En todos los casos, el sustrato sin ALD presentó una mayor intensidad de señal y mayor número de picos característicos respecto al sustrato con ALD, cuyas señales aparecen más atenuadas. Este comportamiento se debe a la capa ALD que reduce la eficiencia del campo plasmónico, limitando la interacción de los capilares metálicos con el analito provocando la disminución de la intensidad de la señal Raman que se registra.

Por tanto, para este tipo de análisis en el que no se requiere que el sustrato tenga una resistencia adicional a la degradación el sustrato sin ALD supone la opción más favorable, ya que permite obtener espectros SERS con mayor intensidad.

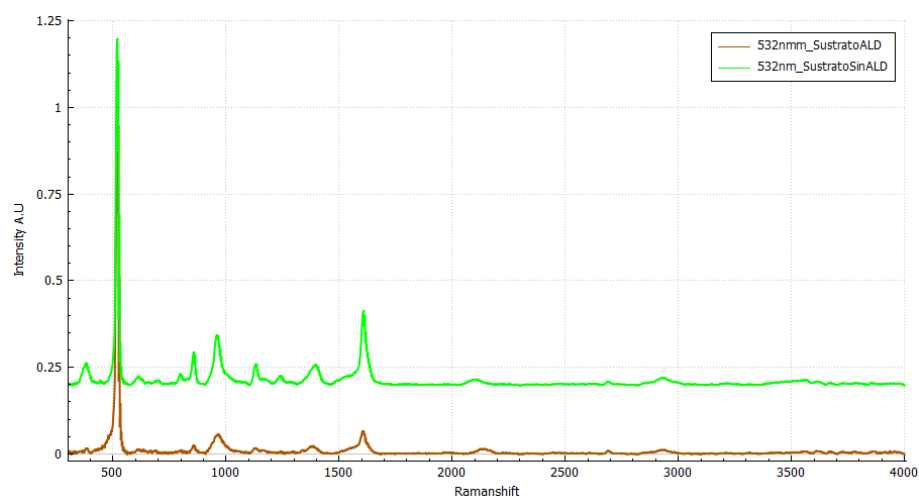


Figura 16. Espectros Raman de sustrato recubierto con una capa ALD (marrón) y sustrato sin capa ALD (verde) con un láser de longitud de onda de 532nm.

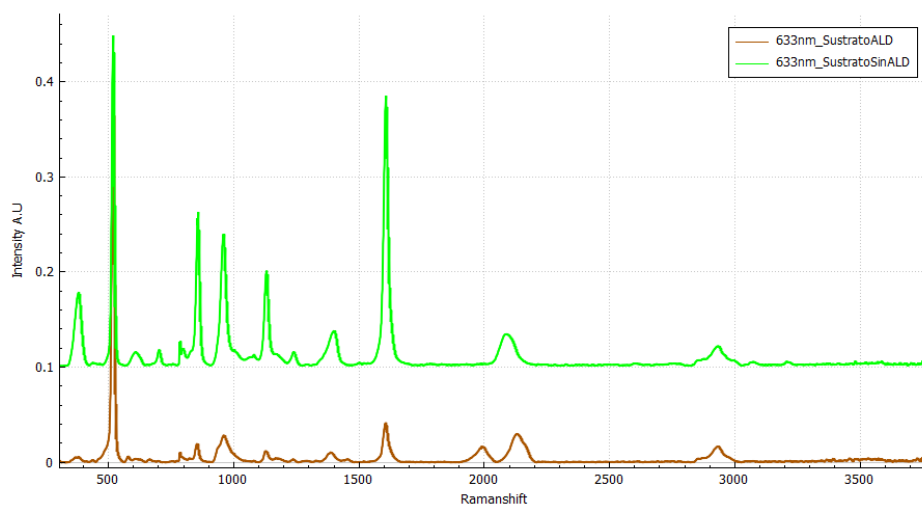


Figura 17. Espectros Raman de sustrato recubierto con una capa ALD (marrón) y sustrato sin capa ALD (verde) con un láser de longitud de onda de 633nm.

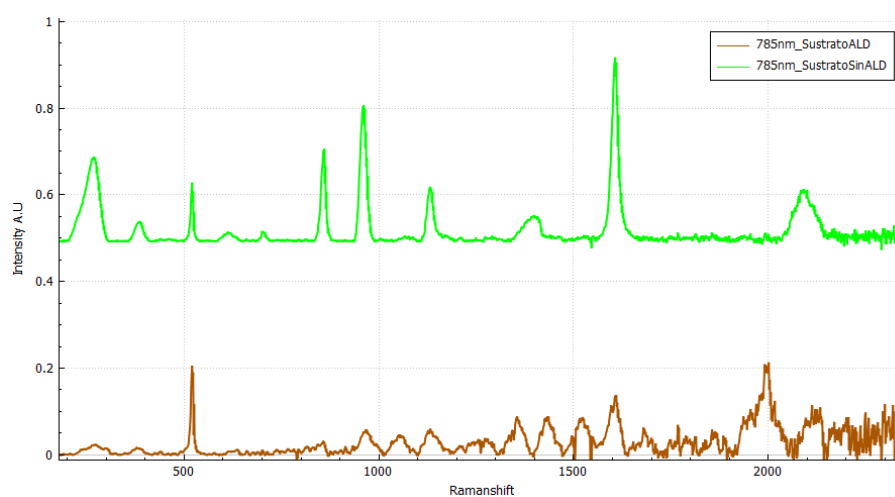


Figura 18. Espectros Raman de sustrato recubierto con una capa ALD (marrón) y sustrato sin capa ALD (verde) con un láser de longitud de onda de 785nm.

Además, se evaluó la influencia de la longitud de onda de excitación sobre la relación señal/ruido (SNR) calculada para dos bandas representativas (516 y 1606 cm^{-1}). Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 4 y 5 y en la Figura 19.

	Banda 516 cm^{-1}		
	532 nm	633 nm	785 nm
Sin ALD	421.387	399.74	76.8386
ALD	288.671	428.362	73.3726

Tabla 4. Valores de Relación señal/ruido (SNR) calculada para la banda situada a 516 cm^{-1} .

	Banda 1606 cm^{-1}		
	532 nm	633 nm	785 nm
Sin ALD	114.598	366.187	79.6322
ALD	36.4693	134.668	4.80756

Tabla 5. Valores de Relación señal/ruido (SNR) calculada para la banda situada a 1606 cm^{-1} .

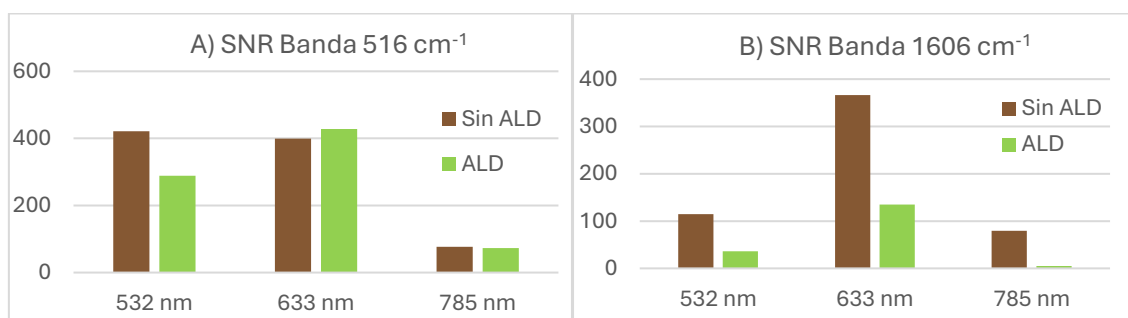


Figura 19. Relación señal/ruido (SNR) calculada para: A) la banda a 516 cm^{-1} y B) la banda a 1606 cm^{-1} en los sustratos con y sin ALD bajo excitación a 532, 633 y 785 nm

Las señales más intensas se registraron con la longitud de onda de 633nm que ofreció espectros claros y definidos, con un menor nivel de ruido de fondo. Este resultado se hace más notable en el sustrato sin ALD. Aunque los sustratos que se emplean están optimizados para la excitación de 785nm, en nuestras condiciones experimentales los espectros obtenidos a esta longitud de onda resultaron excesivamente ruidosos y, además, el instrumento ofrece menor rango espectral que para las otras dos longitudes de onda. En consecuencia, se optó por emplear el láser de 633nm, que proporcionó señales más limpias y con una SNR superior a la registrada con 532nm. Esta elección resulta además coherente, ya que la longitud de onda 633nm está más próxima al rango de optimización del sustrato que la de 532nm.

En conclusión, la combinación de sustrato sin ALD y excitación a 633nm se seleccionó como la condición óptima para los análisis SERS posteriores, al proporcionar espectros con mayor claridad, intensidad y reproducibilidad.

4.2.2. Comparación espectral mediante SERS puntual.

En este trabajo, el disolvente que se utilizó fue agua mili-Q, por lo que resultó necesario registrar también el espectro del disolvente depositado en un sustrato y del sustrato en ausencia de muestra. De esta forma, es posible discriminar qué señales corresponden al sustrato, al disolvente o a la muestra que se analiza.

En la Figura 20 se comparan los espectros para el sustrato sin recubrimiento ALD y para el mismo sustrato en presencia de agua mili-Q. Para facilitar la interpretación, se han marcado las bandas con símbolos diferenciados: las estrellas negras corresponden a las señales que son propias del sustrato, que mantienen la posición independientemente de que contenga agua o no y solo presentan variaciones de intensidad; las estrellas blancas indican bandas nuevas o que se han desplazado tras la adición del disolvente.

Algunas bandas características del sustrato se mantienen invariables y se pueden localizar en 518.5, 797.9, 856.0, 959.0, 1131.0, 1240.0, 1607.4 y 2929.0 cm^{-1} , confirmando que corresponden a señales intrínsecas del material. Por otro lado, hay varias bandas que se desplazan al añadir el agua. En la figura 20A localizamos la banda situada a 381.5 cm^{-1} en el sustrato que se desplaza a 374.6 cm^{-1} al añadir el disolvente, otra a 1401.5 cm^{-1} que pasa a 1390.3 cm^{-1} y la señal de 2088.9 cm^{-1} que aparece a 2117.8 cm^{-1} en el espectro con agua.

Asimismo, detectamos la aparición de nuevas bandas asociadas al agua. En el sustrato, se observan dos bandas a 608.7 y 701.8 cm^{-1} , que al añadir el disolvente desaparecen dando lugar a una banda ancha en torno a 644.8 cm^{-1} . Las nuevas contribuciones podemos localizarlas en la Figura 20B a 828.8, 1000.7, 1081.7 y 1281.7 cm^{-1} y, en la Figura 20A, a 3073.7 cm^{-1} .

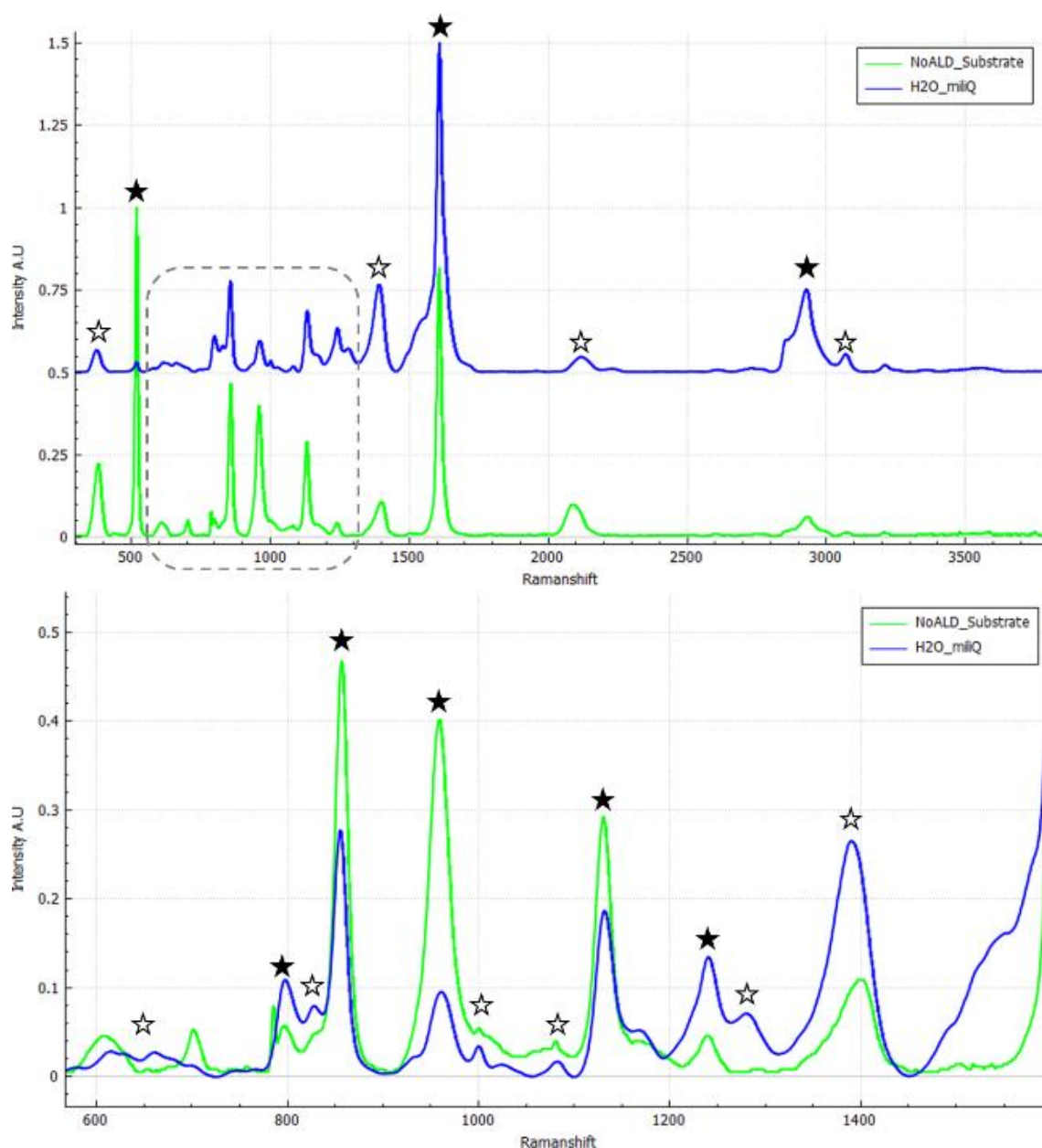


Figura 20. Comparación de espectros SERS de sustrato sin recubrimiento ALD (verde) y de sustrato con agua mili-Q (azul), medidos con longitud de onda de excitación de 633nm: A) espectro completo y B) ampliación de la región comprendida entre 600-1500 cm^{-1} .

En conjunto, este análisis permite discriminar qué picos son inherentes al sustrato y cuáles se deben al agua, un paso necesario para que en el análisis posterior de las muestras de ELR pura y contaminada podamos distinguir cuáles son las bandas asociadas a los modos vibracionales de cada molécula.

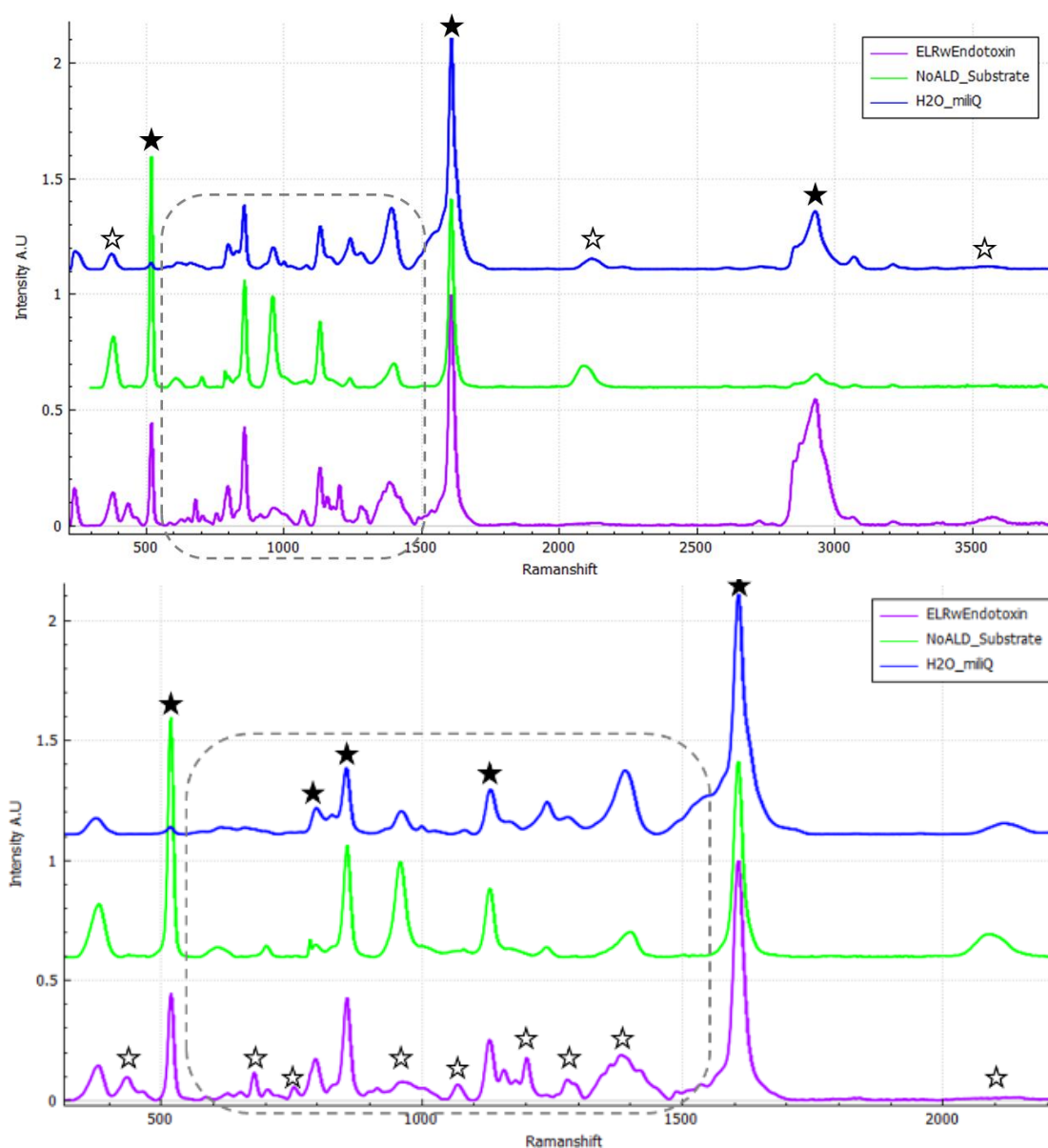


Figura 21. Comparación de espectros SERS de sustrato sin recubrimiento ALD (verde), de sustrato con agua mili-Q (azul) y muestra de ELR contaminada (morada), medidos con longitud de onda de excitación de 633nm: A) Espectro completo y B) rango entre 300 y 2200 cm^{-1} .

Una vez diferenciadas las señales del sustrato y el disolvente, podemos estudiar cuáles son las bandas SERS que generan los polímeros de ELR tanto puro como contaminado. En la Figura 21, se presentan conjuntamente los espectros SERS del agua (azul), el sustrato (verde) y la ELR contaminada (morada), lo que permite observar la aparición de nuevas bandas, desplazamientos y cambios en la forma de algunas vibraciones pertenecientes al polímero.

Siguiendo la misma dinámica que en el caso anterior, las bandas señaladas con una estrella negra son las que se mantienen sin desplazarse en los tres espectros y que, por tanto, podemos atribuir al propio sustrato. En este caso, las podemos visualizar en la Figura 21B a 518.5, 797.9, 856.0, 1131.0 y 1607.4 cm^{-1} y, en la Figura A, a 2929 cm^{-1} . Esta última señal se detecta en el espectro SERS del agua, por lo que podemos atribuirla a

contribuciones débiles del propio disolvente con el sustrato que se ven amplificadas por el efecto SERS. Sin embargo, en la muestra de ELR conrtaminada esta señal se ensancha y empieza a formar un triplete que recuerda a la vibración de estiramiento C-H, en concordancia con lo observado en la espectroscopía Raman convencional. Por lo tanto, esta banda se interpreta como una superposición de las vibraciones C-H del polímero y las alteraciones de su entorno.

Las bandas señaladas con una estrella blanca hacen referencia a aquellas que se han desplazado o han aparecido nuevas. En la Figura 21A, la señal a 1391cm^{-1} se desplaza a 1383cm^{-1} , acompañada de un ligero cambio de forma. La contribución a 1084.3cm^{-1} en los espectros de agua y sustrato como una banda muy débil, se desplaza y se intensifica apareciendo a 1069cm^{-1} . Además, aparece una señal en 679.4cm^{-1} en la zona del espectro donde encontrabamos una banda ancha en el caso del agua en torno a 644.8cm^{-1} , derivada de 2 bandas más débiles del sustrato.

Además de todo lo anterior, emergen bandas nuevas en 435.1 , 755.8 (débil), 914.0 , 968.7 , 1157.6 y 1204.9cm^{-1} , visibles en la Figura 21B. La banda definida en 959cm^{-1} para los espectros de agua y sustrato desaparece, dando lugar a una contribución más ancha en torno a 964.2cm^{-1} , junto a un pico adicional en 914cm^{-1} . En el rango de $1200\text{-}1300\text{cm}^{-1}$, la banda a 1240cm^{-1} , observada para el agua y el sustrato, desaparece en la muestra contaminada, mientras que la contribución en 1281cm^{-1} , asociada previamente al agua, comienza a desdoblarse. Finalmente, en la Figura 21A, la banda ancha del agua en torno a 3568cm^{-1} se intensifica notablemente.

Los resultados de estos análisis muestran cómo el espectro de la muestra de ELR contaminada combina señales propias del polímero que corresponden con las regiones de Amida I y estiramientos C-H y N-H, con modificaciones de bandas del agua y del sustrato. Este análisis nos permite establecer con mayor claridad las contribuciones atribuibles al ELR contaminado construyendo una base para su posterior comparación con la ELR pura.

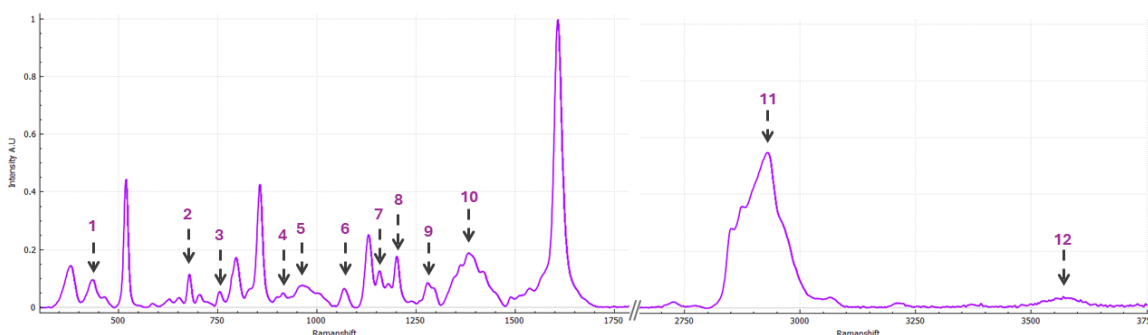


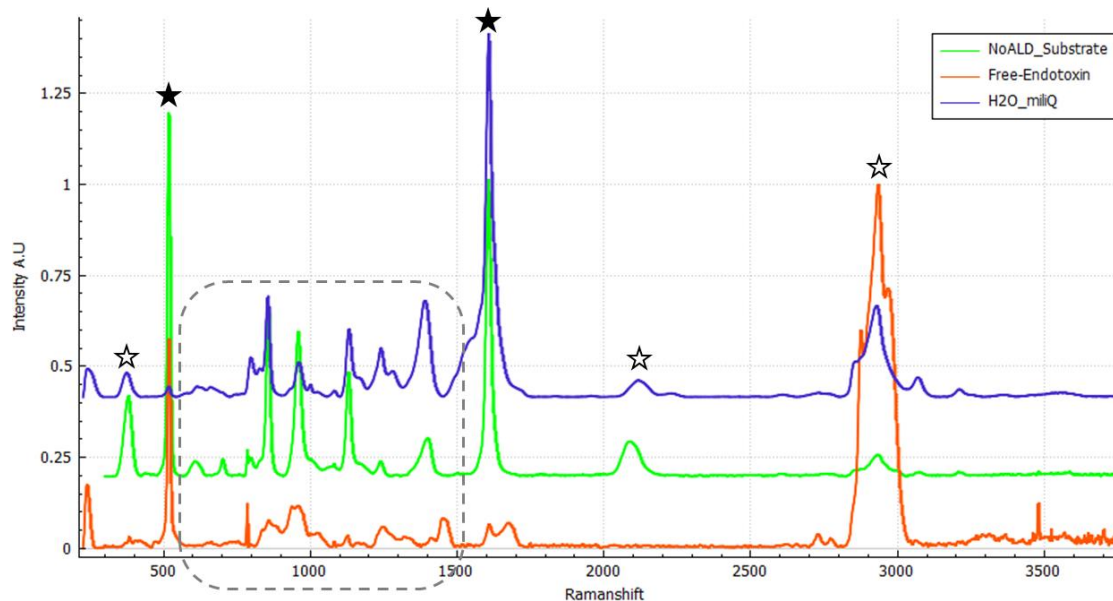
Figura 22. Identificación de bandas SERS propias de la ELR contaminada con Endotoxinas.

En la Figura 22 y Tabla 5, podemos ver un resumen de las principales bandas asociadas a la muestra de ELR contaminada.

	ELR w/Endotoxin	
	Ramanshift (cm ⁻¹)	Intensity
Peak 1	435.1	m
Peak 2	679.4	m
Peak 3	755.8	w
Peak 4	914.0	w
Peak 5	964.0	w (wide)
Peak 6	1069.0	m
Peak 7	1157.6	w
Peak 8	1201.9	m
Peak 9	1279.0	m
Peak 10	1383.1	m (wide)
Peak 11	2931.0	s
Peak 12	3568.0	w (wide)

Tabla 6. Posiciones de bandas más significativas observadas para ELR contaminada en disolución obtenidas para longitud de onda 633nm.

Una vez identificadas las contribuciones espectrales asociadas a la muestra de ELR contaminada, se aplicó el mismo procedimiento de análisis a la muestra de ELR pura. Así, al comparar de nuevo los espectros del sustrato, el agua y el polímero, fue posible discriminar qué señales se mantienen invariantes, cuáles se desplazan y qué nuevas contribuciones aparecen en el espectro del polímero puro.



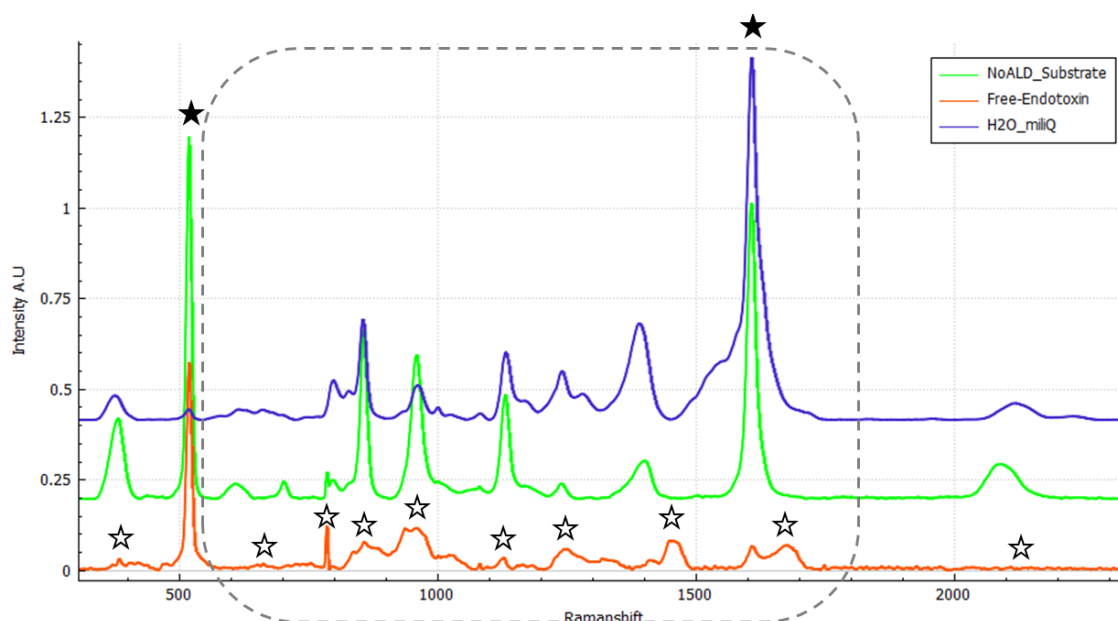


Figura 23. Comparación de espectros SERS de sustrato sin recubrimiento ALD (verde), de sustrato con agua mili-Q (azul) y muestra de ELR pura (naranja), medidos con longitud de onda de excitación de 633nm: A) Espectro completo y B) rango entre 400 y 2300 cm^{-1} .

En este caso, en la Figura 23 se observa la comparación de los espectros del sustrato, el agua y la muestra de ELR pura. En la Figura 23A, vemos las señales que se mantienen invariables situadas a 518 y 1607.3 cm^{-1} , correspondientes al sustrato. Otras señales presentan modificaciones relevantes al incorporar la muestra. La señal que aparece a 381 cm^{-1} en el sustrato y a 375 cm^{-1} en el agua, disminuye notablemente de intensidad y se transforma en una banda ancha y poco intensa en torno a 414.2 cm^{-1} . Las bandas en 608.7 y 701.8 cm^{-1} , visibles en el sustrato, desaparecen. La contribución en 784 cm^{-1} aparece como una señal única, mientras que en el sustrato se presentaba como parte de una banda desdoblada situada en torno a 794 cm^{-1} . Por otra parte, las bandas en 856.1, 959.0 y 1131.0 cm^{-1} se ensanchan y pierden intensidad. La banda a 1240.1 también se ensancha y pierde intensidad pero, además, se desplaza en torno a 1247.7 cm^{-1} .

En la región de 1300-1500 cm^{-1} , se observan cambios significativos: la banda que aparece a 1391 cm^{-1} en el agua y a 1401 en el sustrato desaparece surgiendo una nueva contribución a 1456 cm^{-1} . Además, la banda a 1607.4 cm^{-1} , aunque se mantiene, se atenúa y se desdobra, generando dos máximos en 1607.4 y 1675.1 cm^{-1} , que recuerda a la señal de la Amida I descrita en espectroscopía Raman convencional.

En la región de 2000-2150 cm^{-1} , las señales detectadas en agua y sustrato desaparecen completamente. En cambio, la banda situada a 2229.8 sufre un ligero desplazamiento a 2933.4 cm^{-1} , intensificándose y adoptando la forma de un triplete, característico de los estiramientos C-H. Finalmente, la zona de 3300-3500 cm^{-1} no permite detectar con claridad la señal del agua debido al nivel de ruido, aunque se puede intuir una banda ancha muy poco intensa en torno a 3335 cm^{-1} , quizá correspondiente al agua.

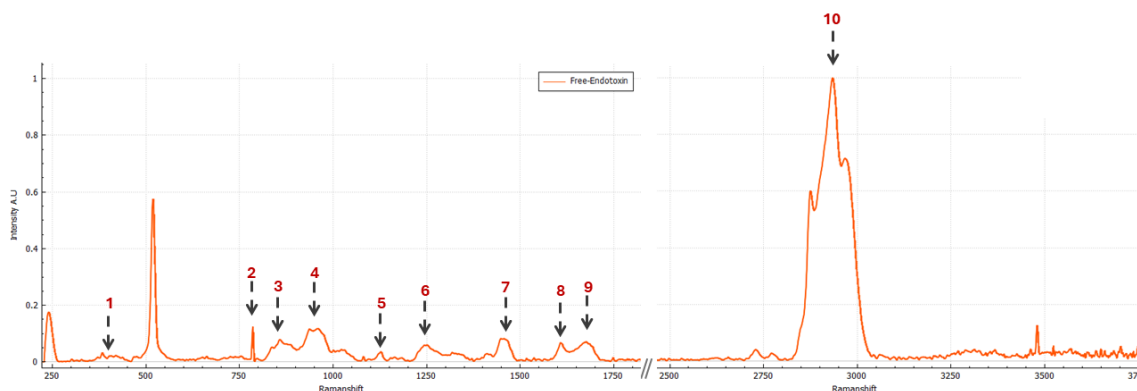


Figura 24. Identificación de bandas SERS propias de la ELR pura.

Por todo esto, el espectro de la muestra de ELR pura presenta un perfil que se caracteriza por la intensificación del triplete del modo de vibración de estiramiento C-H, la aparición de una nueva banda en 1456cm^{-1} y el desdoblamiento de la región atribuible a la vibración de la Amida I. además de la desaparición de varias señales propias del agua y sustrato. Las señales características aparecen reflejadas en la Tabla 7 y la Figura 24.

ELR Free-Endotoxin		
	Ramanshift (cm^{-1})	Intensity
Peak 1	414.2	w
Peak 2	784.0	m
Peak 3	856.1	w (wide)
Peak 4	959.0	m (wide)
Peak 5	1131.0	w
Peak 6	1247.7	w (wide)
Peak 7	1456.0	m (wide)
Peak 8	1607.4	m
Peak 9	1675.1	m
Peak 10	2933.4	s

Tabla 7. Posiciones de bandas más significativas observadas para ELR puro en disolución obtenidas para longitud de onda 633nm.

4.2.3. Evaluación de SERS.

Una vez identificadas las bandas características de ambas muestras, se procede a su comparación con el objetivo de evaluar la capacidad de la técnica SERS para diferenciar entre ambas entre elastina pura y contaminada con endotoxinas.

En la Tabla 8 se resumen las posiciones de estas bandas junto a las diferencias detectadas, en la Fig. 25 podemos observar ambos espectros. A primera vista, se aprecia que algunas señales se pueden considerar equivalentes, aunque presentan ligeras variaciones en desplazamiento o forma. Este es el caso de las bandas situadas en torno a 435.1 y 414.2cm^{-1} , para ELR contaminada y pura, respectivamente. En el caso de la muestra contaminada observamos una señal definida, mientras que en la muestra pura aparece

más débil y ensanchada. De manera similar, las bandas localizadas a 964 y 959 cm^{-1} son ambas bandas anchas, pero en el caso de la elastina pura podemos observar el inicio de un desdoblamiento que no aparece en la contaminada. Finalmente, en torno a 2931 cm^{-1} y 2933 cm^{-1} , donde encontramos la banda asociada a la vibración C-H, se observa un desplazamiento mínimo pero la forma de la banda varía notablemente observando un triplete definido en la muestra de ELR pura.

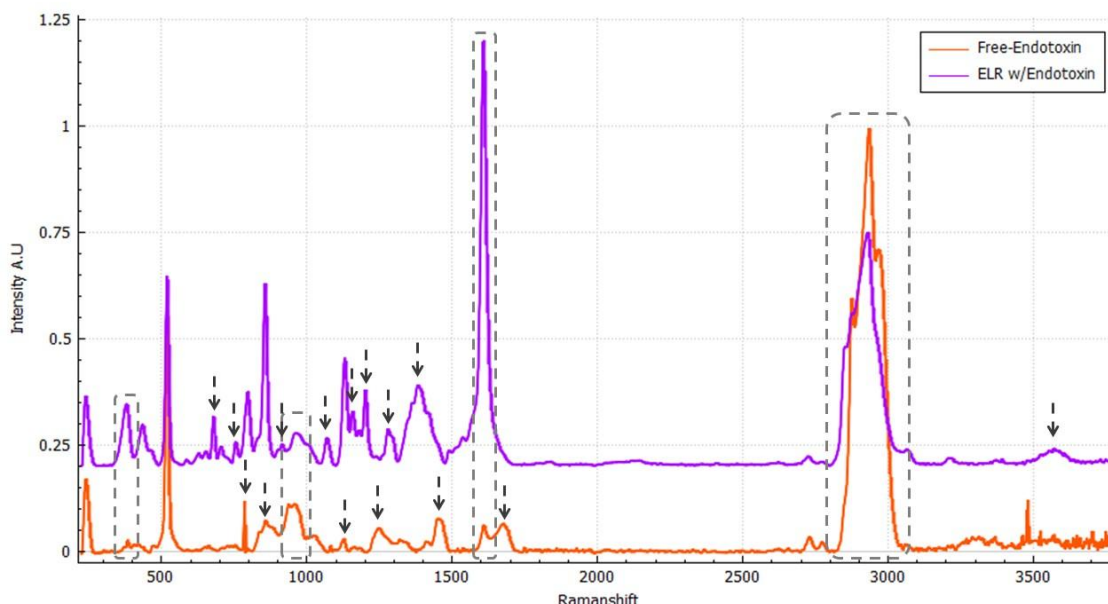


Figura 25. Comparación de espectros SERS de muestra de ELR pura (naranja) y ELR contaminada (morada), medidos con longitud de onda de excitación de 633nm. Con flechas se señalan las bandas que propias de cada muestra y recuadradas aquellas que son equivalentes, pero sufren un cambio de forma o desplazamiento.

Más allá de las similitudes, el resultado más destacable es la aparición y desaparición de bandas específicas entre ambas muestras. En la muestra contaminada las bandas que aparecen a 679.4, 755.8, 914.0, 1069.0, 1157.6, 1201.9, 1279.0 y 1383.1 cm^{-1} no aparecen en la pura. Por el contrario, la muestra de elastina pura presenta contribuciones en 784.0, 856.1, 1247.7, 1456.0 y 1675.1 cm^{-1} que no se detectan en el espectro de la contaminada.

Por último, cabe señalar una disminución de intensidad en la banda a 1607.4 cm^{-1} , atribuida al sustrato, en la ELR pura respecto a la contaminada. Asimismo, la banda ancha del agua en torno a 3500 cm^{-1} no puede verse en la muestra de ELR pura a causa de la resolución del equipo.

ELR w/Endotoxin	Free-Endotoxin	Diferencias
Ramanshift (cm ⁻¹)	Ramanshift (cm ⁻¹)	
435.1	414.2	Desplazamiento y cambio de forma en la banda
679.4	-	
755.8	-	
-	784.0	
-	856.1	
914.0	-	
964.0	959.0	Desplazamiento y cambio de forma en la banda
1069.0	-	
-	1131.0	Banda atribuida al sustrato pero disminución de intensidad
1157.6	-	
1201.9	-	
	1247.7	
1279.0	-	
1383.1	-	
-	1456.0	
1607.4*	1607.4*	Banda atribuida al sustrato pero se desdobla en la ELR pura
-	1675.1	
2931.0	2933.4	Desplazamiento y cambio de forma en la banda
3568.0	-	

Tabla 8. Posiciones de bandas más significativas observadas para ELR contaminado y puro en disolución.

En conclusión, la comparación de los espectros SERS de elastina pura y contaminada muestra que, aunque existen bandas comunes con ligeros desplazamientos o variaciones de forma, las diferencias más relevantes se encuentran en la aparición y desaparición de contribuciones específicas. En particular, la presencia de señales únicas en la ELR contaminada y en la ELR pura junto con los cambios de forma observados en la región de estiramientos C–H, en torno a 2930 cm⁻¹, y en la zona de 1607–1675 cm⁻¹, atribuida a la vibración de Amida I, sugieren que estas regiones espectrales podrían actuar como posibles marcadores de la contaminación por endotoxinas.

5. Conclusiones y líneas futuras.

Los resultados que se han obtenido en este trabajo muestran que la espectroscopía IR y Raman convencional ayudan a determinar la estructura de los polímeros de tipo ELR y evidenciar que la presencia de endotoxinas produce perturbaciones en los modos vibracionales. Con la espectroscopia SERS hemos logrado observar con mayor detalle la aparición, desaparición o modificación de bandas específicas en ambas muestras de ELRs, libres o no de endotoxinas, lo que refuerza su potencial como técnica de discriminación. Si bien las diferencias detectadas no son lo suficientemente intensas como para constituir marcadores inequívocos de endotoxinas, si se demuestra que existen variaciones espectrales reproducibles que no se deben ni al sustrato ni al disolvente.

Además, el mayor nivel de detalle que ofrece el SERS respecto a Raman y FTIR incrementa la confianza en la interpretación de los resultados.

No obstante, existen limitaciones significativas como las señales intensas del agua que enmascaran contribuciones del polímero, la baja definición de algunas bandas o el ruido de fondo, que dificultan la interpretación de los espectros y la evaluación de la pureza del polímero, impidiendo diferenciar de manera concluyente las muestras contaminadas.

Este estudio constituye un primer paso dentro de una línea de investigación todavía poco explorada. De cara al futuro, se plantean varias líneas de trabajo:

- Realizar una búsqueda bibliográfica más exhaustiva con el fin de asignar las diferentes bandas del espectro a su modo vibracional correspondiente en las tres técnicas usadas. Además, se podrían realizar cálculos computacionales con softwares como ORCA o Gaussian que nos permitan visualizar de forma teórica estas vibraciones.
- Probar otros tipos de sustratos SERS que permitan mejorar la intensidad de señal, reducir el ruido y aumentar la reproducibilidad.
- Evaluar disolventes alternativos que sean compatibles con los polímeros ELR y que, tras su evaporación, no interfieran en la señal espectral.
- Repetir el procedimiento en nuevas muestras para comprobar la repetibilidad y robustez de la técnica.
- Utilizar equipamiento más avanzado que permita realizar mapeos completos de los sustratos, incrementado el número de espectros y facilitando crear una base de datos para la identificación de contaminaciones.
- Estudiar las muestras a concentraciones menores para evaluar los límites de detección que se puede alcanzar para estas muestras con la técnica SERS.
- Implementar un mayor tratamiento espectral de datos, incorporando el uso de análisis multivariante o inteligencia artificial que sea capaz de reconocer patrones y variaciones sutiles en los espectros.

En conclusión, los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que con técnicas espectroscópicas somos capaces de detectar variaciones espectrales entre muestras que contengan o no endotoxinas, si bien no permiten identificar con total confianza la presencia de endotoxinas en polímeros ELR. Estas evidencias, junto a las propuestas planteadas de líneas futuras abren nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias más sensibles, fiables y rápidas en la detección de endotoxinas mediante espectroscopía vibracional.

6. Bibliografía.

- [1] S. Acosta, P. Rodríguez-Alonso, V. Chaskovska, J. Fernández-Fernández, J. C. Rodríguez-Cabello, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, DOI:10.1002/WNAN.70003.
- [2] K. M. Ruff, S. Roberts, A. Chilkoti, R. V. Pappu, *J Mol Biol* 2018, 430, 4619.

- [3] J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, M. A. Rodrigo, A. Girotti, *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97, 85–100.
- [4] J. C. Rodríguez-Cabello, I. Gonzalez De Torre, M. González-Pérez, F. González-Pérez, I. Montequi, *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9.
- [5] A. Girotti, A. Fernández-Colino, I. M. López, J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, *Biotechnol J* 2011, 6, 1174.
- [6] J. C. Rodríguez Cabello, I. G. De Torre, F. Cipriani, L. Poocha, in *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*, Elsevier Inc., 2018, pp. 309–327.
- [7] F. González-Pérez, S. Acosta, S. Rütten, C. Emonts, A. Kopp, H. W. Henke, P. Bruners, T. Gries, J. C. Rodríguez-Cabello, S. Jockenhoevel, A. Fernández-Colino, *Front Bioeng Biotechnol* , DOI:10.3389/fbioe.2022.988533.
- [8] S. Rezaia, N. Amirmozaffari, B. Tabarraei, M. Jeddi-Tehrani, O. Zarei, R. Alizadeh, F. Masjedian, A. Hassan Zarnani, *Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi*, vol. 3.
- [9] Y. Yang, B. Xu, J. Haverstick, N. Ibtehaz, A. Muszyński, X. Chen, M. E. H. Chowdhury, S. M. Zughaier, Y. Zhao, *Nanoscale* 2022, 14, 8806.
- [10] G. Hannon, A. Prina-Mello, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2021, 13.
- [11] I.-H. Chen, K. Vaglenov, Y. Chai, B. A. Chin, J. M. Barbaree, *Adv Microbiol* 2014, 04, 549.
- [12] L. R. Stromberg, H. M. Mendez, H. Mukundan, in *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, InTech, 2017.
- [13] D. H. Kang, S. Y. Yun, S. Y. Eum, K. E. Yoon, S. R. Ryu, C. Lee, H. R. Heo, K. M. Lee, *Microorganisms* , DOI:10.3390/microorganisms12030516.
- [14] M. Schneier, S. Razdan, A. M. Miller, M. E. Briceno, S. Barua, *Biotechnol Bioeng* 2020, 117, 2588.
- [15] M. Hassan, Y. Zhao, S. M. Zughaier, *Biosensors (Basel)*, 2024, 14.
- [16] S. R. Balasubramani, K. Nagappan, L. S. Ewe, K. Viswanathan, W. K. Yew, S. G. Thiraviam, S. Sadana, T. K. D. Samuel, K. Kamalakannan, *Int J Environ Anal Chem* , DOI:10.1080/03067319.2024.2339453.
- [17] M. Veneranda, *Appl Spectrosc Rev* 2024, 59, 883.
- [18] R. Pilot, R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, , DOI:10.3390/bios9020057.
- [19] J. Prakash, H. C. Swart, G. Zhang, S. Sun, *J Mater Chem C Mater*, 2019, 7, 1447–1471.
- [20] K. Wu, T. Rindzevicius, M. S. Schmidt, K. B. Mogensen, S. Xiao, A. Boisen, *Opt Express* 2015, 23, 12965.
- [21] M. S. Schmidt, J. Hübner, A. Boisen, *Advanced Materials* , DOI:10.1002/adma.201103496.
- [22] G.; Zappalà, A.; Abbaspourmani, T.; Rindzevicius, A. Boisen, *General rights Fabrication of Ag-capped Si nanopillar substrates with ultra-thin HfO₂ protective coatings for SERS applications*, 2022.
- [23] M. Veneranda, G. Lopez-Reyes, E. Pascual Sanchez, A. M. Krzesińska, J. A. Manrique-Martinez, A. Sanz-Arranz, C. Lantz, E. Lalla, A. Moral, J. Medina, F. Poulet, H. Dypvik, S. C. Werner, J. L. Vago, F. Rull, *Astrobiology* , DOI:10.1089/ast.2020.2265.

- [24] M. Veneranda, A. Sanz-Arranz, J. A. Manrique, J. Saiz, C. Garcia-Prieto, E. Pascual-Sánchez, J. Medina, M. Konstantinidis, E. Lalla, A. Moral, L. M. Nieto, F. Rull, G. Lopez-Reyes, *Journal of Raman Spectroscopy* , DOI:10.1002/jrs.6215.
- [25] P. Schmidt, J. Dybal, J. C. Rodriguez-Cabello, V. Rebotto, *Biomacromolecules* 2005, 6, 697.