



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
ESPECTROSCOPIA RAMAN Y SUS
APLICACIONES**

Autor: Daniel Cañamares Martín

Fecha: Julio 2020

Tutor: Emilio Fidel Llama Hurtado

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	3
2.1. La radiación electromagnética y el espectro electromagnético.....	3
2.2. Fundamentos de la espectroscopia.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
4. MATERIAL Y METODOS.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
5.1. La espectroscopia Raman.....	5
5.2. Aplicaciones de la espectroscopia Raman.....	9
a. Aplicación en el campo de las ciencias biomédicas.....	9
b. Aplicación en los campos de las ciencias y la industria farmacéutica.....	12
En el desarrollo de fármacos.....	12
En el control de calidad.....	13
c. Aplicación en el campo de las ciencias forenses.....	14
d. Aplicación en el campo de la nanotecnología.....	15
e. Aplicación en los campos de la arqueología y el arte.....	16
f. Otras aplicaciones.....	18
6. CONCLUSIONES.....	18
7. BIBLIOGRAFÍA.....	19

1. RESUMEN

El descubrimiento del efecto Raman y sus aplicaciones al campo de la espectroscopia supusieron una revolución en este ámbito de la ciencia ya que por un lado permiten la obtención de lo que denominan las 'huellas dactilares' de los compuestos químicos y por otro sus ventajas, como la sencillez de la técnica, la no invasividad ni destrucción de las muestras o la rapidez de los análisis, la hicieron postularse como una técnica muy prometedora, sin embargo algunos de los inconvenientes que presenta como el problema con la fluorescencia en la detección frenaron el desarrollo de la tecnología y las aplicaciones cuya base fuera este efecto de la luz. Con el paso de los años, nuevos avances en la espectroscopia Raman permitieron ir solventando los problemas referentes a esto, aunque a día de hoy no todos se hayan solucionado, y con ello se iniciarían los estudios de las posibles aplicaciones del efecto Raman. Entre estas aplicaciones surgidas encontramos que en la biomedicina la espectroscopia Raman ha permitido el diagnóstico de multitud de enfermedades como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas, en la industria farmacéutica ha permitido avances en la investigación de nuevos fármacos, en su producción e incluso en la mejora de los controles de calidad de los procesos industriales; dentro de las ciencias forenses ha permitido mejorar la obtención de pruebas forenses de diferente índole o incluso e arqueología o en el arte puede usarse como herramienta de análisis en obras pictóricas o en hallazgos arqueológicos, aun así se espera que el desarrollo de esta técnica en el futuro genere nuevas aplicaciones y hallazgos científicos de gran relevancia.

ABSTRACT

The discovery of the Raman effect and its applications to the field of spectroscopy represented a revolution in this field of science since on the one hand they allow obtaining what they call the 'fingerprints' of chemical compounds and on the other their advantages, such as the simplicity of the technique, the non-invasiveness or destruction of the samples or the speed of the analyzes, made it postulate as a very promising technique, however some of the drawbacks that it presents, such as the problem with fluorescence in detection, slowed the development of technology and applications based on this light effect. Over the years, new advances in Raman spectroscopy allowed solving the problems related to this, although today not all have been solved, and with this, studies of the possible applications of the Raman Effect would begin. Among these emerging applications we find that in biomedicine Raman spectroscopy has allowed the diagnosis of different diseases such as cancer, in the pharmaceutical industry it has allowed advances in the investigation of new drugs, their production and even the improvement of quality controls Of the industrial processes, within forensic sciences it has allowed to improve the obtaining of evidence in crimes of different nature or even and archeology or art can be used as an analysis tool in works of art or archaeological findings, even so it is expected that the development of this technique in the future will generate new applications and scientific findings of great relevance.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. La radiación electromagnética y el espectro electromagnético

La naturaleza de la radiación electromagnética fue objeto de estudio por parte de la comunidad científica, sobre todo para los físicos, a lo largo de muchos años. Este concepto pasaría por las manos de multitud de científicos célebres como Newton, Maxwell (a través de las llamadas 'ecuaciones de Maxwell'), Planck y un largo etcétera. Actualmente las características de la radiación electromagnética se explican a través del electromagnetismo y la mecánica cuántica.

La radiación electromagnética se podría definir como una forma de energía que se caracteriza por presentar una doble naturaleza como onda y como partícula, puesto que expresa comportamientos de ambas. Como onda, la radiación electromagnética se compone de un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre sí y que se propagan en el espacio y el vacío (es decir, no requieren de un medio físico para su propagación) de forma oscilante transportando esa energía en forma de fotones, de ahí su comportamiento como partícula.

La relación de ambas naturalezas se establece a través de la relación 'Planck-Einstein' (Fig. 1), expresándose la relación entre la frecuencia de onda y la energía propagada por la misma.

$$E = h\nu$$

Figura 1: Relación Planck-Einstein, donde E es igual a la energía del fotón, h es la constante de Planck ($h = 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$) y ν es la frecuencia (inversamente proporcional a la longitud de onda).

Las características de las ondas electromagnéticas dependerán de la fuente que las genere, de modo que podemos encontrar diversos tipos de radiación electromagnética como la luz, las ondas de radio o la radiación térmica entre otros.

Una de las características más importantes a tener en cuenta dentro de la radiación electromagnética será la longitud de onda, que matemáticamente se describe como se observa en la fig.2

$$\lambda = \frac{1}{F}$$

Figura 2: relación entre la longitud de onda y la frecuencia, donde λ es la longitud de onda y F es la frecuencia de la onda.

Esta característica es la que se emplea para clasificar a las ondas dentro del espectro electromagnético (cada una de ellas presentará unas características), de este modo en el espectro electromagnético se pueden observar distintas franjas en función de la longitud de onda como se puede ver en la figura 3.

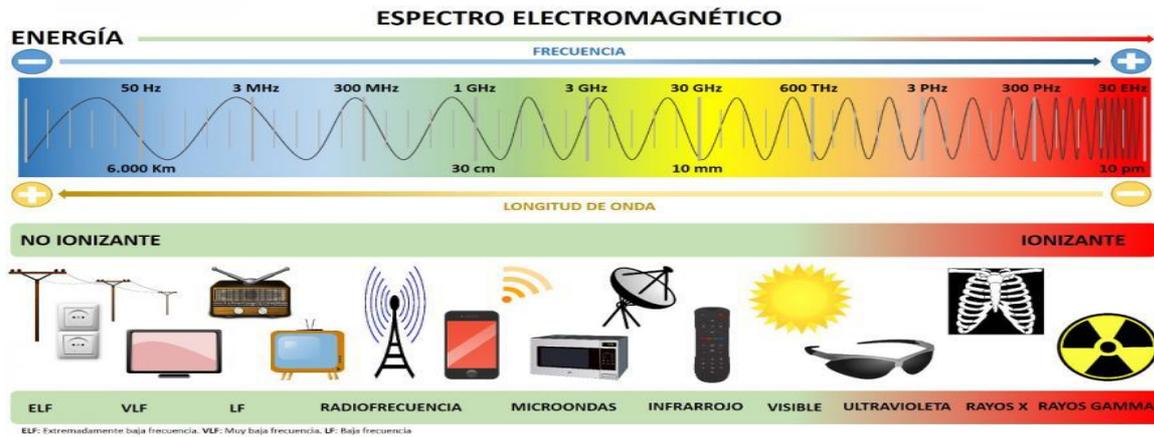


Figura 3: espectros electromagnético (Fuente: adaptado de 'Servicios e información' de la Comunidad de Madrid).

Estos conceptos sobre la radiación electromagnética y la luz son necesarios para entender tanto las técnicas espectroscópicas como el efecto Raman, descrito por Chandrasekhara Venkata Raman en 1928 y que le valdría el Nobel de física unos años más tarde, en 1930. (1,2)

2.2. Fundamentos de la espectroscopia

Actualmente la espectroscopia incluye multitud de técnicas cuya base es la medición de la variación de la energía de una radiación electromagnética que ha sido puesta en contacto con una sustancia, de manera que la energía será absorbida o emitida. Estas técnicas pueden dar información cuantitativa o cualitativa de la estructura atómica o molecular, de modo que se posicionan como herramientas de suma importancia en multitud de disciplinas científicas. La interacción de la radiación electromagnética será diferente si hablamos de átomos o si lo hacemos de moléculas.

A nivel atómico, al poner en contacto energía con un átomo se produce un fenómeno de excitación, proceso en el que un electrón del átomo pasa de un nivel energético a otro de mayor energía, influyendo el número de electrones que presente el átomo. Este paso es el que se detecta y mide con la espectroscopia.

En cambio, si hablamos de moléculas su relación y comportamiento con la energía son más complejos. Al hacer incidir energía sobre una molécula las transiciones que ocurren no son solo a nivel de electrones como en el caso de un átomo, sino que también puede ocurrir transiciones vibracionales o rotacionales en la molécula. A través del análisis espectroscópico de una molécula se puede obtener información estructural muy variada de ella como por ejemplo las características de sus enlaces, su geometría en el espacio pero además se pueden obtener otros datos como sus propiedades químicas.

Actualmente existen multitud de técnicas espectroscópicas entre las que se pueden citar la espectroscopia ultravioleta, espectroscopia visible o colorimetría, espectroscopia de microondas o la espectroscopia Raman, la cual se tratará con más detalle en el apartado de resultados. (1,2)

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son, en primer lugar, dar a conocer de forma más profunda la espectroscopia Raman, no solo su base teórica y sus fundamentos sino también sus ventajas con respecto a otras técnicas que utilicen los fundamentos de la espectroscopia. Con todo ello se presentan además una serie de aplicaciones de esta técnica de análisis espectroscópica en multitud de campos científicos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder llevar a cabo los objetivos de este proyecto se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se han consultado diferentes bases de datos como Pubmed, Google Académico, Biblioteca de la universidad Complutense de Madrid o ScienceDirect (Elsevier) usando palabras clave como 'Raman spectroscopy', 'Raman Effect' 'Spectroscopy basis' o 'Raman spectroscopy applications', usando en la mayoría de los casos artículos de revistas científicas, artículos de revisión, tesis doctorales y libros especializados tanto en español como en inglés. Toda la bibliografía se realizará a través del método Vancouver.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica que se asienta en el principio de la dispersión inelástica que sufren los fotones al incidir sobre un material descubierto por Raman. La dispersión de la luz es un fenómeno físico que ocurre cuando se hace incidir un haz de luz sobre un sistema, de modo que la trayectoria original de la luz se modifica. De forma general la luz se puede dispersar de dos formas, de forma elástica en el que la longitud de onda o, lo que es lo mismo, la frecuencia no se modifican respecto a la del haz de luz original, a este fenómeno se le conoce como **dispersión de Rayleigh**. Por otro lado, en la dispersión inelástica sí se producen modificaciones en la frecuencia del haz de luz, pudiendo verse disminuida o aumentada, a esto es a lo que se conoce como **dispersión o efecto Raman**. (1,2,3)

Dentro de la dispersión Raman en función de la modificación de la frecuencia, la energía de la luz dispersada también se modifica al incidir sobre una molécula acorde a la relación Planck-Einstein (Fig.2), así por un lado puede ocurrir que la frecuencia de la luz dispersada disminuya y con ella disminuya la energía a lo que se denomina **dispersión Raman Stokes** o puede ocurrir lo contrario, que la frecuencia de la luz cuando se dispersa aumente, lo que aumenta de igual manera la energía y se genera la llamada **dispersión Raman anti-Stokes**. Estos dos conceptos son importantes ya que la luz dispersada presentará tanto dispersión de Rayleigh como dispersión Raman, pero solo una pequeña proporción de los fotones sufrirán dispersión Raman en comparación con los que experimentan la dispersión de Rayleigh por lo que la señal que se detecta tiene una intensidad muy baja. La distribución de las líneas Stokes o anti-Stokes dependerá de la temperatura a la que se encuentre el sistema, de este modo si la temperatura es baja el número de líneas a baja frecuencia o líneas Stokes que aparecen serán más numerosas a comparación de las anti-Stokes, ocurriendo lo inverso si la temperatura es elevada, esto se debe a que a bajas temperaturas las moléculas presentan niveles vibracionales bajos por lo que en este caso ocurrirán más transiciones vibracionales de tipo Stokes. (1,2,3)

En cualquier caso, en la espectroscopia Raman no se registran estados de excitación en los electrones, porque la energía que incide a través del haz de luz es insuficiente para generar un estado de excitación, lo que si se produce es un **cambio en el estado de rotación o de vibración del sistema** a consecuencia de la interacción de éste con los fotones que se transportan en el haz de luz, por tanto lo que se registra es información sobre cambios en el estado vibracional a través de las ligeras modificaciones de la frecuencia del haz de luz dispersada inelásticamente, pero para que se pueda dar el efecto de la dispersión Raman en un sistema, se requiere que esa molécula a estudiar exprese un cambio en su momento dipolar. (2,3)

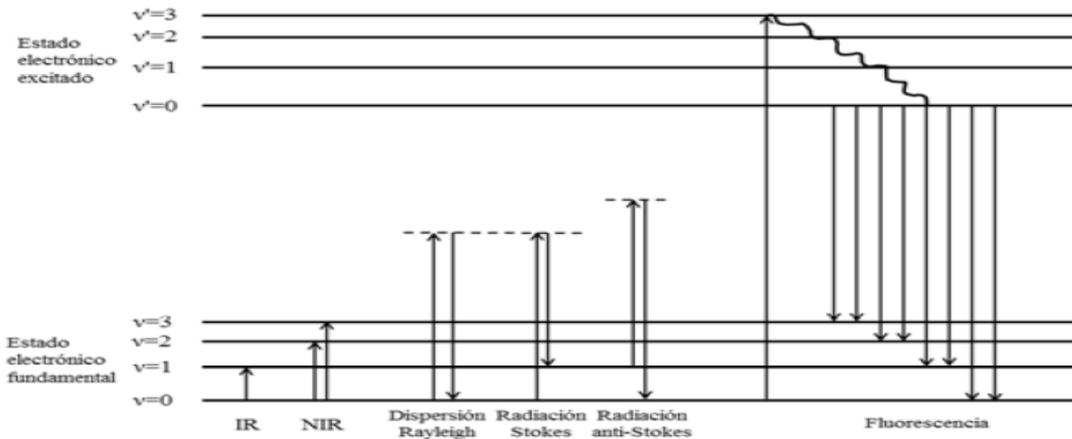


Figura 4: comparativa entre los efectos de la luz en diferentes técnicas de espectroscopía (5)

Las **ventajas** que presenta esta técnica con respecto a otras dentro de la espectroscopia es que es una técnica muy sencilla de realizar y bastante rápida ya que permite obtener un gran número de datos e información de gran relevancia de la muestra que se analiza, además la naturaleza de las muestras que pueden analizarse es muy variable, pudiéndose analizar muestras sólidas, líquidas, gaseosas y disoluciones (además no se producen alteraciones ni interferencias por la presencia de agua en la muestra ya que es el efecto Raman que sufren las moléculas de agua es muy débil), estas muestras además no requieren de ningún tipo de preparación o manipulación previas, se puede mencionar también que la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo un ensayo con espectroscopia Raman es muy pequeña. También es importante destacar en este apartado de ventajas, que los avances en los equipos de espectroscopia Raman han permitido reducir sus tamaños de forma considerable haciendo a muchos de ellos lo suficientemente pequeños para que sean portátiles. (2,3)

A pesar de estas ventajas que pueden hacer de la espectroscopia Raman una técnica de gran importancia, lo cierto es que en un principio quedó bastante relegada a un uso escaso y tan solo en algunos campos de investigación a consecuencia de algunos problemas que presentaba a la hora de obtener las lecturas como por ejemplo la baja intensidad de la señal que se generaba, lo que hacía que muchas veces la señal de ruidos que se recogían en los espectros ocultará la señal de interés y no se podían llevar a cabo las lecturas de los espectros, lo que sumado a que los detectores de canal único eran los únicos que se habían desarrollado hasta ese momento obligaba a que los ensayos se tuvieran que hacer de forma secuencial para minimizar estos problemas, lo que provocaba que los tiempos que se tenían que invertir

en los ensayos eran enormes. Otro problema muy importante eran los derivados de la fluorescencia; si en la muestra había impurezas que provocaban fluorescencia, la señal de la dispersión Raman quedaba oculta bajo la señal de la fluorescencia, algo que era un problema bastante común en la espectroscopia Raman dado que los equipos no podían reducir este efecto y de nuevo las interpretaciones de los espectros eran imposibles de llevarse a cabo. Todo esto junto con el gran desarrollo que tuvo la espectroscopia infrarroja hizo que no se le diera a la espectroscopia Raman la importancia que merecía hasta la aparición de nuevos láseres como fuentes de radiación y detectores y su implementación en los equipos Raman. (2,3,4,5)

Entre algunas de las **mejoras** incluidas en los espectrómetros Raman encontramos varios como por ejemplo **los equipos FT-Raman**. En la espectroscopia Raman convencional se da el problema de la interferencia en las lecturas a consecuencia de la producción de fluorescencia en la muestra, esto se consiguió solucionar con la inclusión de los interferómetros de Michelson, en los cuales se sirven de un sistema de espejos a través de los cuales el haz de luz original se divide en dos haces iguales que retornan al interferómetro para dirigirse a la muestra. Se obtiene lo que se llama un interferograma. Este interferograma es transformado en un espectro Raman común cuando se aplica la transformación de Fourier inversa. (3)

Otro ejemplo para la mejora de la espectroscopia Raman es la técnica **SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy)** en la que se emplea una superficie rugosa compuesta por una estructura metálica que permite aumentar la señal de la dispersión Raman en varios ordenes con respecto a la técnica normal. El efecto por el cual ocurre esto se cree que se debe a que el campo electromagnético incidente se ve intensificado al llegar a la molécula por la propia dispersión del metal, que variará en función del tamaño de las partículas esféricas de metal que componen la superficie y por la transferencia de carga entre la superficie metálica y la muestra. Los espectros generados con esta técnica son distintos a los originados por la espectroscopia Raman convencional, ya que las bandas sufren desplazamientos o ensanchamientos y también se pueden generar bandas que en el espectro por técnica convencional no aparecerían o incluso algunas que sí aparecerían, no lo harían para este procedimiento, por lo que es necesario reinterpretar el espectro. La técnica SERS presenta, con respecto a la espectroscopia Raman normal, ventajas como por ejemplo la posibilidad de analizar disoluciones acuosas de muy baja concentración. (6)

Se puede destacar también la **microscopía confocal Raman**, en la que el haz de luz generado se enfoca a la muestra y tras sufrir difracción al incidir en la muestra se reenfoca a través de un punto confocal para ser recogida en el detector. Esta técnica permite analizar sólidos sin manipularlos ni alterarlos de ninguna manera. (5)

Equipos de espectroscopia Raman

En general, los equipos para poder llevar a cabo ensayos por espectroscopia Raman presentan unos componentes generales en todos ellos que son: una fuente de energía, generalmente de luz, capaz de generar un láser, un sistema de dispersión y un sistema de detección de la señal. Hay que destacar que actualmente existen multitud de equipos de espectroscopia Raman y cada uno presenta sus propias ventajas e inconvenientes, además estos componentes generales presentaran características distintas en función de las muestras y actividades que se vayan a hacer con ellos. A continuación se hablará brevemente de cada uno de los

componentes mencionados y de algunos de los equipos más representativos de espectrómetros Raman:

La **fente de energía** debe ser generada por un láser que sea capaz de producir un haz de luz monocromático lo suficientemente potente y de una frecuencia estable para poder desencadenar la dispersión Raman en la muestra y que esta pueda ser captada por el detector, además debe ser un láser que experimente una baja divergencia y con pocas bandas laterales para reducir al máximo las posibles interferencias. En concreto los láseres utilizados en este tipo de espectroscopia son láseres con una longitud de onda entre los rangos del ultravioleta y del infrarrojo cercano, incluido el espectro del visible (es decir, entre los 2500 nanómetros y los 200 nanómetros), por ejemplo los espectrómetros de transformación de Fourier (FT-espectrómetros) suelen emplear longitudes de onda de en torno a los 1064 nanómetros. De nuevo, dependiendo de la muestra a analizar el láser utilizado será distinto, algunos de los más utilizados hoy en día son por ejemplo los láseres de Helio/Neón (láser He/Ne) con una longitud de onda de 632,8 nanómetros.

Los **sistemas de dispersión** van a permitir separar en función de la longitud de onda el haz de luz que ha incidido en la muestra para que de este modo puedan llegar las diferentes señales al detecto de forma separada y el espectro que se genere sea más fácilmente interpretable, de manera general se pueden encontrar sistemas de dispersión que emplean el fenómeno de la dispersión para separar la luz o los sistemas de transformación de Fourier que a través de un sistema de espejos permiten separar y guiar el haz de luz hasta el detector.

Sobre los **detectores**, lo más común es encontrarse con detectores de un canal o con detectores multicanal (en función del número de señales que pueden detectar), estos además deben ser lo suficientemente sensibles para detectar la baja señal de la dispersión Raman, evitándose la detección de interferencias o de ruido como por ejemplo la fluorescencia que se puede generar en la muestra es de las más comunes y de la que se hablará más adelante, pero existen detectores especiales como los detectores semiconductores empleados en algunos equipos como los de FT-Raman que eliminan la fluorescencia. (3,5)

5.2. Aplicaciones de la espectroscopia Raman

Aplicaciones en el campo de las ciencias biomédicas

La espectroscopia Raman se presenta como uno de los métodos de análisis más importantes en la investigación biomédica puesto que presenta multitud de ventajas en este campo, ya que permite estudiar tejidos biológicos in-vivo e in-vitro sin necesidad de destruir la muestra, algo que en medicina especialmente es una cualidad de gran importancia.

Como una de las utilizaciones de esta técnica más importante dentro de este campo se encuentra el diagnóstico del cáncer. El cáncer es una de las enfermedades de mayor relevancia e impacto de nuestro tiempo, situándose como la principal causa de muerte en el mundo, pero dada su base patológica y el tiempo que puede tardar en presentarse la sintomatología hace que esta enfermedad se convierta en uno de los mayores retos de la medicina.

Hay que decir que el diagnóstico definitivo siempre viene dado por una biopsia, siendo éste un método caro, lento y que, para el paciente, supone un proceso traumático al tener que

pasar por una cirugía. Además en la actualidad se trata de realizar procesos de cribado para el diagnóstico precoz de ciertos cánceres, como el de mama o el de colon y en general con cánceres de elevada incidencia en la población, por lo que la biopsia no puede ser esa prueba de cribado. En cuanto a otras técnicas de diagnóstico como el TAC, el RMN o la ecografía presentan los inconvenientes de que consumen mucho tiempo y recursos y que además dependen plenamente de la experiencia y el manejo del clínico que realice la prueba y la interpreta.

En los últimos años ha habido un incremento de los estudios sobre las aplicaciones de la espectroscopia Raman en la investigación de tejidos y como técnica de diagnóstico, ya que esta permite obtener, con rapidez y con menos, coste información sensible y específica sobre la composición de la muestra a nivel molecular, esto es importante ya que en las células cancerígenas se dan diferencias con respecto a las células normales de un tejido en cuanto a la composición como a la conformación estructural de los distintos componentes de la célula (lípidos, proteínas o ácidos nucleicos) de tal modo que un diagnóstico analítico empleando esta técnica, que en clínica se le denomina como 'biopsia óptica' permite conocer por comparación de los espectros esas distinciones. También presentan la ventaja de poder analizarse zonas de elevado riesgo o de difícil acceso (como el sistema nervioso) por cirugía las veces que se necesiten, eliminando el daño que puede sufrir el paciente a través de una o varias biopsias en esas zonas.

Los trabajos actuales van encaminados al futuro diagnóstico de otros tipos de cáncer (como el cáncer de útero, distintos tipos de leucemia,...) utilizando equipos que utilicen espectroscopia Raman. Por ejemplo en casos de melanoma las técnicas de diagnóstico que emplean espectroscopia Raman han permitido distinguir células sanas de células malignas a través de los cambios ocurridos en los lípidos o en la melanina o también se han utilizado aparatos de endoscopia Raman para la identificación in-vivo de tumores en el tracto gastrointestinal por modificaciones en los ácidos nucleicos, fosfolípidos o las histonas de las células. (7,8,9)

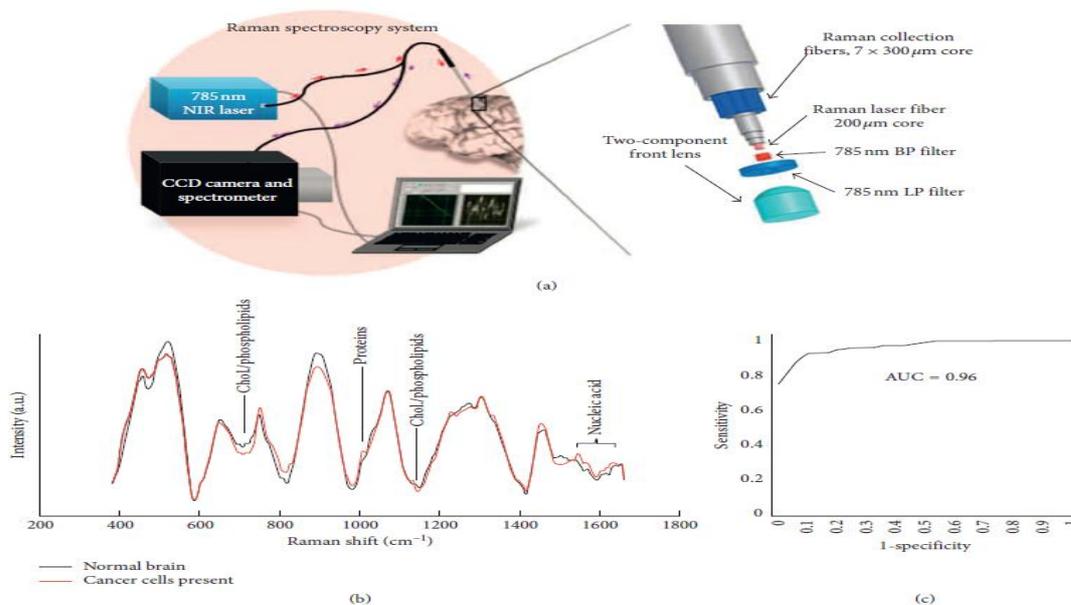


Figura 5: ejemplo de análisis de tejido cerebral por espectroscopia Raman (9)

Las aplicaciones en biomedicina de la espectroscopia Raman no se limitan al diagnóstico del cáncer, también permiten realizar el diagnóstico de otras enfermedades como la aterosclerosis, donde esta técnica se ha posicionado como una técnica de diagnóstico in-vivo de esta patología permitiendo conocer el estado de la pared del vaso obstruido obteniendo la información de su composición y comparándola con el espectro de un vaso sano. (10)

También esta técnica ha permitido conocer el estado y los cambios de la composición mineral y de la matriz del hueso ante cambios por deformaciones elásticas permitiendo saber más sobre el comportamiento de la estructura cristalina del hueso. (11)

Además de esto, la espectroscopia Raman también ha sido ensayada para ser utilizada en el diagnóstico y detección de enfermedades neurodegenerativas ya que dado el aumento de edad de supervivencia en la población se ha visto un aumento con ello de la incidencia de enfermedades neurodegenerativas en la población. Entre estas enfermedades se encuentran algunas como el Alzheimer o el Parkinson cuyos efectos en el organismo humano son altamente incapacitantes, lo que hace que un diagnóstico temprano para instaurar un tratamiento precoz permite mejorar enormemente la calidad de vida de estos pacientes. En estas patologías, las rutas bioquímicas a través de las que ocurren, surgen una serie de biomarcadores que permiten su diagnóstico.

En el Parkinson, la técnica de actividad óptica de Raman ha permitido estudiar y conocer que la α -sinucleína presenta una variedad de conformaciones en su estructura en función del entorno en el que se encuentre, identificando las diferencias estructurales entre las conformaciones espaciales en las que se puede encontrar así como los agregados proteicos que se generan. En cuanto al diagnóstico de esta enfermedad por espectroscopia Raman, la tecnología SERS es capaz de medir la disminución de los niveles de dopamina en los pacientes, lo que es un signo claro de la destrucción de neuronas dopaminérgicas, base etiológica de la enfermedad de Parkinson.

En cuanto al Alzheimer los estudios han ido en rutas parecidas a las del Parkinson pues los autores se han centrado en utilizar la espectroscopia Raman para el estudio del péptido β -amiloide (principal causa de la neurodegeneración en el Alzheimer) y en las formas en las que ocurre la agregación entre distintas unidades de estos péptidos. Entre todas las formas de agregación la espectroscopia Raman ha sido útil en los estudios de agregación de péptido β -amiloide a través de metales de coordinación como el Zn, el Cu o el Fe. Se han intentado emplear técnicas de espectroscopia Raman para el diagnóstico pero debido a la falta de biomarcadores solo ha sido útil la detección de bajos niveles del neurotransmisor GABA (bajos niveles de este neurotransmisor son signo de degeneración neuronal). (12)

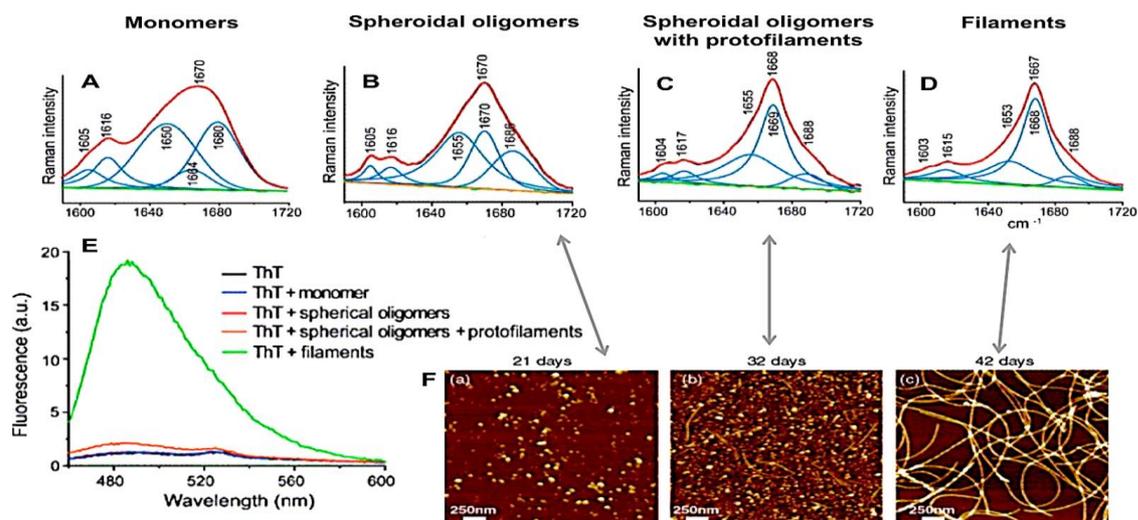


Figura 6: Análisis de biomarcadores del Parkinson por espectroscopia Raman (12)

Otro ejemplo de enfermedad neurodegenerativa donde la espectroscopia Raman se puede convertir en una opción para el diagnóstico es en la enfermedad de Huntington, enfermedad caracterizada por alteraciones motoras que generan movimientos involuntarios que el paciente no puede controlar. Estos movimientos involuntarios dificultan mucho el diagnóstico por imagen, ya que estas pruebas requieren que el paciente este quieto. Es por ello que los investigadores se están centrando en la detección de biomarcadores en fluidos biológicos como el suero, donde la espectroscopia Raman y el SERS han permitido a los investigadores observar tanto la predisposición genética del paciente a expresar la enfermedad como a detectar de forma precisa algunos marcadores biológicos propios de la enfermedad. (12,13)

Aplicaciones en los campos de las ciencias y la industria farmacéuticas

Uso de la espectroscopia Raman en el desarrollo de medicamentos

El inicio del desarrollo de cualquier medicamento presenta una serie de retos no solo por el comportamiento de éste en el organismo, sino también a la hora de incorporar el principio activo en una forma farmacéutica que sea estable y segura. En estas fases de preformulación la espectroscopia Raman tras muchos ensayos y pruebas llevadas a cabo por multitud de investigadores ha presentado multitud de ventajas y aplicaciones nuevas con respecto a otras técnicas.

En el desarrollo de la forma farmacéutica cobran importancia los pasos iniciales, las llamadas etapas de preformulación, ya que cualquier error en ellos puede suponer inconvenientes en etapas más avanzadas de la formulación que harían retrasar todo el proceso. Entre estos pasos previos, uno de los más importantes es el identificar las distintas formas en las que se puede presentar una forma sólida así como saber cuál es la más adecuada y estable para esa formulación, por lo que se hace fundamental conocer los cambios que ocurren en el sólido por influencia por ejemplo de la humedad y la temperatura. En esto la espectroscopia Raman permite conocer la disposición estructural de una forma sólida rápidamente y a través de ella poder predecir cuales van a ser los cambios que se van a producir en el material, como por ejemplo transformaciones en un polimorfo por cambios en la temperatura o cambios en la estructura a consecuencia del paso de la forma anhidra a la forma hidratada del sólido, en

esto último se ha demostrado que el análisis de las muestras con este tipo de espectroscopia han otorgado información relevante sobre las cinéticas de transformación.

Otro de los aspectos importantes a tener en cuenta durante las etapas previas de la formulación es la posible degradación del principio activo al entrar en contacto con los excipientes o con el ambiente. Con la espectroscopia Raman se han identificado los diferentes procesos de degradación que sufren distintas isoformas de un sólido con una enorme sensibilidad. En algunos casos como en el de los flavonoides, se ha podido estudiar las rutas de degradación que sufren como por ejemplo la autooxidación a través de la técnica SERS.

La espectroscopia Raman también puede haber comenzado a ser usada dentro de la industria farmacéutica como una herramienta más dentro del desarrollo de medicamentos, siendo empleada para la monitorización de algunas de las complejas estructuras que siguen ciertos sistemas de liberación modificada de fármacos, ya que en estos se necesita conocer con mucha exactitud la distribución de principio activo o la interacción de este con los excipientes, algo que se ha conseguido a través de equipos de microscopía Raman, siendo un sistema que ha resultado altamente efectivo para este motivo. Las técnicas de imagen por efecto Raman y la espectroscopia Raman también han permitido obtener información útil sobre los parámetros de penetración de los principios activos en la piel en el caso de medicamentos dermatológicos de administración tópica, los depósitos pulmonares de principio activo en aquellos medicamentos en los que esto ocurra o también los sistemas de actividad óptica Raman han permitido la caracterización de proteínas nativas que serán empleadas como sistemas de liberación de fármacos.

Además de estas aplicaciones también se plantea como un método de análisis. Dado que en la industria el análisis de todos los procedimientos es de gran importancia y la espectroscopia Raman permite obtener mediciones en el momento y de forma rápida se está implementando su uso en procesos de síntesis o incluso de fermentación de moléculas de interés como los antibióticos.

Algunos equipos de SERS han permitido incluso la elección de cultivos celulares más óptimos para la obtención de biofármacos. (4)

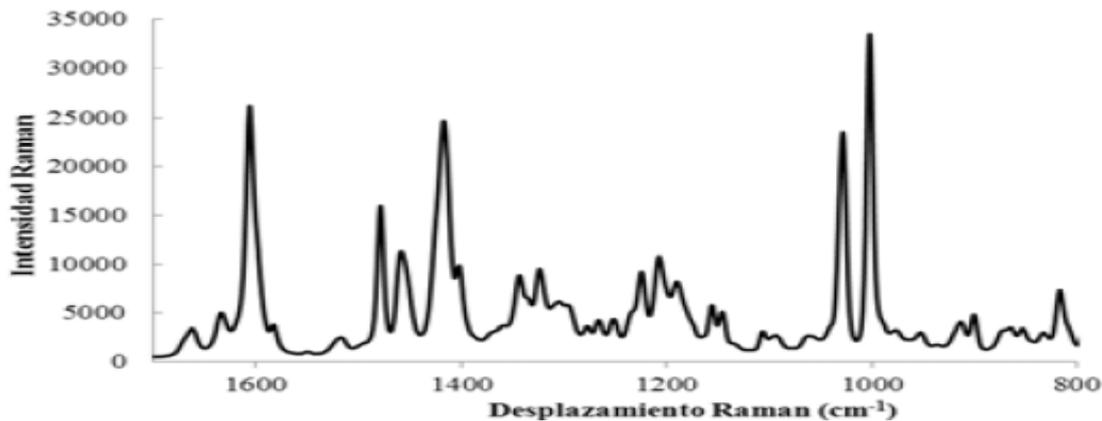
Control de calidad de la industria farmacéutica

La industria farmacéutica es una de las más reguladas e intervenidas del mundo, no solo a nivel económico sino también por su actuación directa sobre la salud de las personas por lo que, desde hace unos años, los procesos de control de calidad de la industria farmacéutica han evolucionado a nuevos modelos más estrictos y regulados por marcos legales y en los que se ha pasado, de analizar solo el producto final, a realizar un control del producto a lo largo de todo el proceso ya que se ha visto que a lo largo de este se pueden generar alteraciones en las sustancias que forman parte del medicamento y que pueden suponer un riesgo para la salud. Estos cambios han llegado de la mano de nuevas iniciativas promulgadas por parte de diferentes organizaciones como la FDA.

En este aspecto la espectroscopia Raman ha destacado a partir de la solventación de los problemas que presentaba como la emisión de fluorescencia que ocurre por la incidencia del

láser sobre la muestra que produce alteraciones en los espectros, solucionada gracias a la implantación de la transformada de Fourier (reduce los órdenes de magnitud para hacerlos más sensibles y puedan captarse las medidas sin interferencia por la fluorescencia) en los espectrofotómetros o mediante 'bleaching'. La información que aportan los ensayos con esta técnica es complementaria a la que aportan otras como la NIR (Espectroscopia del Infrarrojo Cercano).

Uno de los ejemplos de utilización de la espectroscopia Raman en la industria farmacéutica es en el análisis de uniformidad de contenido en las formulaciones sólidas como los comprimidos (donde se busca conocer si la distribución de los principios activos y los excipientes está dentro de los parámetros de calidad establecidos en Farmacopea) sin necesidad de tratamientos previos de la muestra. Además una de las aplicaciones más prometedoras de esta técnica es la evaluación de la uniformidad de contenido en comprimidos divisibles, tanto en la superficie como profundidad. En los comprimidos divisibles (aquellos que presentan una hendidura para su división) una vez partidos, las partes deben presentar un reparto homogéneo del contenido en principio activo en todas ellas, en esto la espectroscopia Raman ha demostrado, por comparación con otras técnicas como HPLC, ser una herramienta útil, no solo porque permita obtener información sobre la homogeneidad del contenido, sino porque el área de iluminación donde va la muestra se puede adaptar al tamaño de las muestras pequeñas. (5)



Lote	Masa (mg)	HPLC	AV	PLS (Raman)	AV	t _{exp}
A	256±6	9,52±0,26	9.5	9,34±0,45	17,9	1,03
B	256±6	9,75±0,24	6.8	9,99±0,49	11,7	1,42

Figura 7: ejemplo de utilización de espectroscopia Raman en análisis de rutina de la industria farmacéutica (5)

Aplicaciones en el campo de las ciencias forenses

La ciencia forense es una disciplina en la que se utilizan conocimientos de diferentes ramas de la ciencia y de la tecnología (medicina, química, biología,..) y en la que las muestras, también llamadas 'vestigios', tomadas de un escenario de un crimen o un accidente son fundamentales para obtener información y esclarecer los hechos sucedidos. Por ello, uno de los mayores problemas en este campo es la destrucción de esas muestras durante ciertos procedimientos ya que esto impide, en caso de cometer un error o de ser necesario, volver a hacer el análisis.

La aplicación de la espectroscopia Raman en la ciencia forense ha supuesto grandes avances y mejoras en los procedimientos e investigaciones de este campo, de nuevo por tratarse de una técnica que no requiere de contacto y que no destruye la muestra además de que permite trabajar tanto con compuestos orgánicos como inorgánicos y con propiedades fisicoquímicas diferentes (solubilidad, volatilidad,...) por lo que la especificidad de la espectroscopia Raman se convierte en algo de gran valor para este sector.

En este aspecto la espectroscopia Raman se utiliza para la detección de sustancias químicas (como drogas, explosivos, sustancias inflamables), la identificación de personas (a través del análisis de alguna muestra del cuerpo como pelo o uñas) o incluso determinar objetos y materiales (a través del análisis de tintas, pintura, fibras, agua, suelo...). (14,15)

Sobre el análisis de residuos de un disparo con un arma de fuego, esta técnica ha permitido conocer la composición de la munición así como de los estabilizantes que se utilizan junto con esa pólvora con lo que se ha constado que los perfiles de los espectros de la munición disparada y de la munición sin disparar son semejantes con lo que se puede establecer una trazabilidad. La espectroscopia Raman permite obtener unos resultados afectados mínimamente por la contaminación generada por el llamado 'efecto memoria' del arma, este efecto se produce cuando se realizan disparos con el mismo arma pero con distinta munición con lo que los restos que quedan en el arma se pueden confundir, con lo que esto es una ventaja añadida.

En cuanto a los residuos de explosivos la espectroscopia Raman presenta el beneficio de que puede identificar sustancias oxidantes inorgánicas (muy utilizadas por delincuentes dada su facilidad de obtención) y las sales con las que se ha elaborado el explosivo (otras técnicas instrumentales solo permiten identificar aniones o cationes). El problema es que no se han podido realizar un gran número de pruebas debido a que tras la propia explosión es muy difícil obtener residuos del material empleado para el explosivo. (15)

La espectroscopia Raman también ha demostrado ser una herramienta muy útil para conocer los hechos ocurridos en torno a un accidente de tráfico. Para ello, basta con analizar a través de esta técnica una muestra de pintura de un vehículo para identificar la marca y modelo, ya que las empresas de automóviles utilizan unas mezclas propias para la elaboración de las capas de color (pigmentos, aditivos,...) al igual que los materiales que utilizan para hacer el resto de las capas y los acabados, de manera que el espectro que se genera de una muestra de pintura de un modelo de coche de una marca concreta es prácticamente únicas. (16)

Aplicación en el campo de la nanotecnología

El desarrollo de la nanotecnología es considerada por muchos como 'la próxima revolución industrial' dadas las características de algunos de los materiales desarrollados en este campo. Hablando de las características, hay que decir que la nanotecnología concentra sus esfuerzos no solo en el estudio de la estructura o del tamaño de estos sistemas (ya que no todos los materiales nanotecnológicos presentan un tamaño del orden de los nanómetros) sino que también se investigan sus características termodinámicas, destacando sobre todo el estudio de la entropía para determinar y conocer las propiedades y la estabilidad que van a presentar estos materiales, entre ellos algunos de los más conocidos son los fullerenos o el grafeno. Los

espectros que se obtienen de estos son enormemente complicados y pueden variar, como por ejemplo en el caso de los fullerenos, en función del número de carbonos que presenten. (17) En el caso del estudio del grafeno, el cual presenta una estructura compuesta únicamente de átomos de carbono dispuestos en hexágonos lo que le atribuye esas características tan propias de este tipo de material (gran dureza a la vez que es flexible o su conductividad tanto térmica como eléctrica). La espectroscopia Raman es prácticamente esencial ya que permite el análisis de los distintos estados vibracionales que éste presenta en su estructura y que permiten caracterizar por ejemplo si existen defectos en ella (los defectos provocan que se den dispersiones Raman diferentes a las esperadas). A esto se añade que a través de los espectros obtenidos por espectroscopia Raman se pueden observar las interacciones de una capa de grafeno con otras capas e incluso con otras sustancias que van en contacto como por ejemplo los llamados dopantes. También con esta técnica espectroscópica se pueden observar los cambios en la intensidad de las bandas del grafeno en función de la corriente eléctrica que se aplica. (17,18)

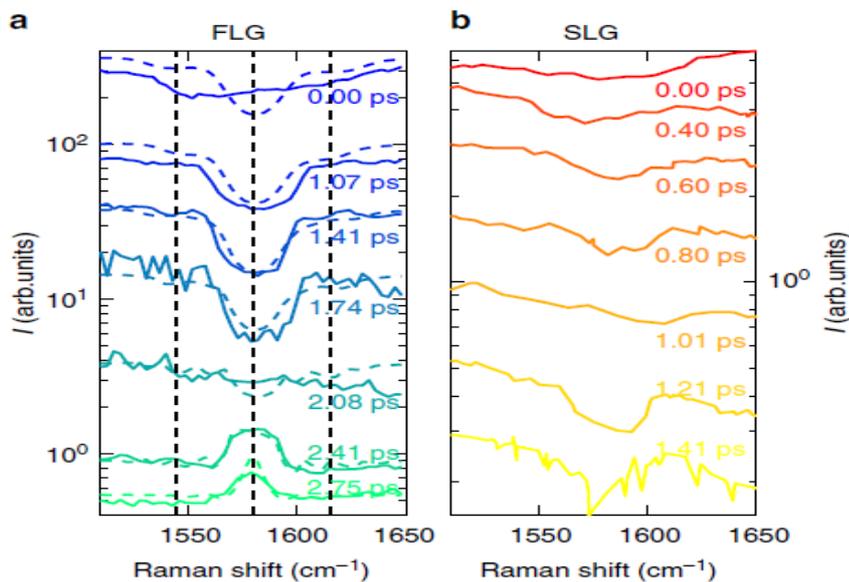


Figura 8: ejemplo de estudio por espectroscopia Raman de tipo CARS del grafeno (18)

Sobre los fullerenos se puede decir además de lo anterior que algunas de sus características y propiedades como su comportamiento termodinámico han sido esclarecidas gracias a la espectroscopia Raman, puesto que sus estructuras presentan características vibracionales detectables gracias a la dispersión Raman. Además de esto, con la espectroscopia Raman se puede investigar el comportamiento de los fullerenos en soluciones, y observar así qué ocurre al entrar éste en contacto con distintos solventes y que interacciones de interés pueden darse que mejoren aún más las propiedades de este material, e incluso comprobar las alteraciones de la estructura de este material ante alteraciones físicas externas como la presión. (17)

Aplicación en los campos de la Arqueología y el Arte

En la Arqueología, de un mismo yacimiento se pueden extraer infinidad de muestras óseas con orígenes distintos cada una. En esto la espectroscopia Raman, a partir del espectro y las bandas obtenidas, permite conocer cuál es la composición, estructura y densidad mineral en las distintas partes del hueso y así poder determinar, en conjunto con análisis

complementarios llevados a cabo por otras técnicas que permitan cotejar la información obtenida a través de Raman, el origen de esos restos óseos además de los procesos (como los procesos diagenéticos) que han sufrido durante su permanencia en los estratos edáficos en los que han estado. En este caso las limitaciones que se suelen encontrar a esta técnica es el escaso número de bases de datos con los que comparar las bandas obtenidas tras la realización de la técnica. (19)

Región espectral (cm ⁻¹)	Asignación	
~1200-1320	Orgánico	Amida III
~1595-1700		Amida I
~1400-1470		Grupos C-H
~2800-3100		
~960-961	PO ₄ ³⁻	ν ₁
~430-450		ν ₂
~1035-1048		ν ₃
~1070-1075		ν ₄
~587-604		
~1063-1094	CO ₃ ²⁻	ν ₁
~1415-1437		ν ₃
~680-711		ν ₄

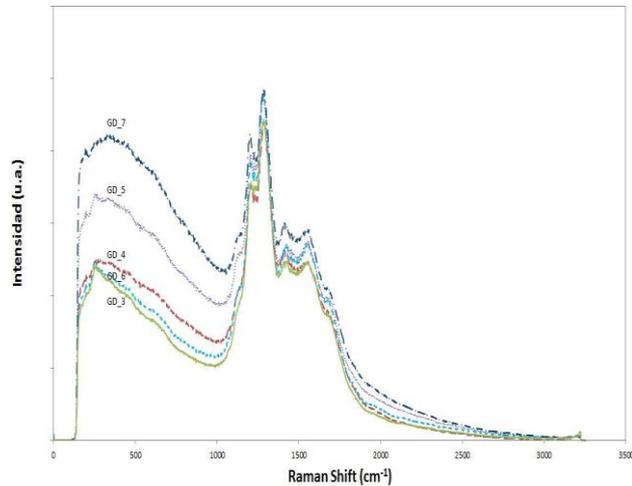


Figura 9: Tabla de la región espectral y ejemplo de espectro de una muestra arqueológica (19)

En cuanto a la pintura, esta técnica se ha aprovechado para analizar los componentes de los pigmentos de pinturas antiguas para así identificar los materiales que se utilizaban para su elaboración y así según el procedimiento de elaboración y la composición de pigmentos, se puede datar con exactitud la obra y encuadrarla dentro de un periodo o también se utiliza para analizar las herramientas empleadas para elaborar obras de arte e incluso para identificar las técnicas de restauración que se aplicaron con anterioridad en la obra. Todo esto le añade valor a la espectroscopia Raman dentro de este campo porque al tratarse de una técnica que no destruye la muestra se puede mantener la obra intacta sin necesidad de extraer material de la obra y se puede diferenciar perfectamente una obra real de falsificaciones, aunque el problema como en el anterior caso es que no se disponen de muchas bases de datos con las que contrastar la información obtenida. (20)

Además, la técnica SERS Raman permite conocer la composición de algunos pigmentos orgánicos complejos (POCN) en los que se encuentran multitud de moléculas complejas mezcladas como flavonoides y antraquinonas que no se pueden analizar con otras técnicas espectroscópicas como la espectroscopia infrarroja. (21)

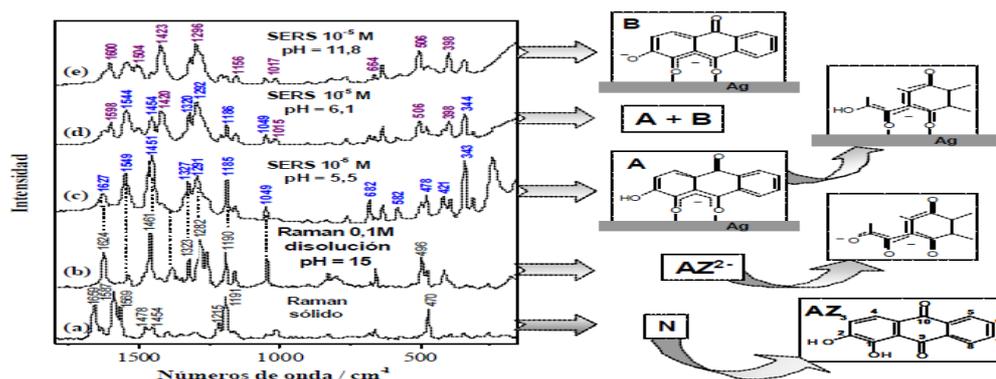


Figura 10: ejemplo de análisis con espectroscopia Raman de una muestra de pintura de una obra de arte (21)

Otras aplicaciones

Las aplicaciones expuestas en este trabajo son solo unas pocas de las que hoy en día tiene la espectroscopia Raman, además con el aumento de investigaciones que se realizan empleando este tipo de espectroscopia se observa que la espectroscopia Raman puede emplearse en otros ámbitos, como por ejemplo en la detección de microplásticos en el agua. Los microplásticos se han convertido en uno de los grandes problemas medioambientales en la hidrosfera, afectando enormemente a la biodiversidad y a los ecosistemas marinos, y que además se está convirtiendo en un problema de salud humana. Diferentes técnicas de espectroscopia Raman han sido empleadas para la detección e identificación de microplásticos de un rango entre 10-100 μm en océanos y mares. Esto ha permitido conocer en proporción los niveles de microplásticos en una muestra, el tipo de plástico que se presenta y conocer la efectividad de los métodos de eliminación con los que se intenta eliminar. (22)

Raman

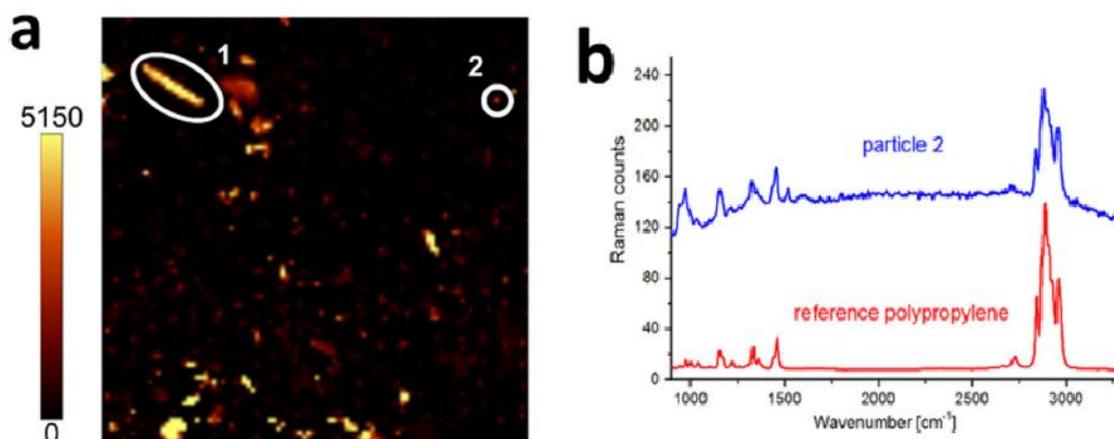


Figura 11: Análisis de agua para la detección de microplásticos (22)

Otras de las aplicaciones que tiene esta técnica son por ejemplo las aplicaciones que tiene en la industria petroquímica, en el estudio de materiales semiconductores, en geología, en

ciencias relacionadas con los alimentos y su control de calidad o en el estudio del medio ambiente entre otros. (23)

6. CONCLUSIONES

Desde el descubrimiento del fenómeno de la dispersión Raman, la espectroscopia Raman se ha desarrollado enormemente dadas sus grandes bondades y ventajas con respecto a otras técnicas, por ello su aplicación en diversos campos de la ciencia se ha visto incrementado. Hoy en día la espectroscopia Raman se utiliza como una técnica más en las distintas disciplinas, consiguiendo posicionarse en algunos ámbitos como una técnica de referencia pesar de algunas de las carencias que se han ido mencionando en este trabajo como por ejemplo la falta de bases de datos de espectros Raman, aun así con el incremento de los estudios con base en este tipo de espectroscopia permitirán solventar esos problemas además se espera que del aumento del manejo y el desarrollo de esta técnica surjan futuras aplicaciones y avances, como el diagnóstico in-vivo de enfermedades o el control y el seguimiento de procesos químicos complejos en distintas industrias como la farmacéutica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Linne, Mark A.. *Spectroscopic Measurement: An Introduction to the Fundamentals*, Elsevier Science & Technology, 2002. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=299535>.
- 2.- Chatwal, Gurdeep R., and Sham K. Anand. *Spectroscopy: Atomic and Molecular*, Global Media, 2008. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=3011280>.
- 3.- Vandenabeele, Peter. *Practical Raman Spectroscopy: An Introduction*, John Wiley & Sons, Incorporated, 2013. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=1272701>.
- 4.- Paudel, Amrit; Raijada Dhara; Rantanen, Jukka. 'Raman spectroscopy in pharmaceutical product design'. *Advanced Drug Delivery Reviews* nº 89. 2015. Pág 3-20. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com>
- 5.- Arrauabarrena Gamboa, J., MasPOCH Andrés, S. (dir), Coello Bonilla, J. (dir). 'Espectroscopia NIR y Raman para el control de calidad de la industria farmacéutica'. [Tesis doctoral en internet]. [Barcelona]: Universidad Autónoma de Barcelona. 2014. Recuperado a partir de: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2014/hdl_10803_284244/jag1de1.pdf
- 6.- García-Ramos, JV. Electromagnetic Mechanism of SERS Effect. *Opt. Pura Apl.* 2004. Vol. 37, pág.17-22. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/4212>

7.- Valdés Pons, R., González Fernández, PM. (dir), López Álvarez, M. (dir). *Técnicas de espectroscopia Raman para el estudio de la mucosa oral*. [Tesis doctoral en internet]. [Vigo]: Universidad de Vigo. 2016. Recuperado a partir de <https://is.gd/rzlm8R>

8.- González-Solís L., Martínez- Espinosa J. C., Martínez-Zerega B. E., Palomares-Anda P., Torres-González L. A., Vargas-Rodríguez H., Gallegos-Infante L. A., González-Silva R. A., Juárez-López H. A., Espinoza- Padilla P. B. (2012), *“Aplicaciones de la técnica de espectroscopia Raman de superficie amplificada en el diagnóstico del cáncer basado en el análisis de muestras de suero sanguíneo”*, *Ide@s CONCYTEG*, 7 (87). Pág 1091-1100.

9.- Cui S, Zhang S, Yue S. Raman Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnosis. *Journal of Healthcare Engineering*. 2018. 2018: 1-11. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jhe/2018/8619342/>

10.- H. P. Buschman, E. T. Marple, M. L. Wach, B. Bennett, T. C. B. Schut, H. A. Bruining, A. V. Brusckhe, A. van der Laarse, G. J. Puppels, *“In vivo determination of the molecular composition of artery wall by intravascular Raman spectroscopy”*, *Anal. Chem.* 72, 3771–3775 (2000). Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac000298b>

11.- M. D. Morris, W. F. Finney, R. M. Rajachar, D. H. Kohn, *“Bone tissue ultrastructural response to elastic deformation probed by Raman spectroscopy”*, *Faraday Discuss.* 126, 159–168 (2004). Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2004/FD/b304905a#!divAbstract>

12.- Devitt G, Howard K, Mudher A, Mahajan S. Raman Spectroscopy: An Emerging Tool in Neurodegenerative Disease Research and Diagnosis. *ACS Chem. Neurosci.* 2018. 9 (3): 404-420. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschemneuro.7b00413>

13.- Huefner A, Kuan WL, Mason SL, Mahajan S, Barker RA. Serum Raman spectroscopy as a diagnostic tool in patients with Huntington's disease. *Chem. Sci.* 2020. 11(2): 525-533. Disponible en: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9SC03711J>

14.- García Ruiz, C. *‘Análisis forense mediante técnicas espectroscópicas’* [Internet]. Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga. 2015. [Citado el 27 de abril de 2020]. Recuperado a partir de: <http://hdl.handle.net/10630/9773>

15.- Carnago Ramirez, M., Esteban Santos, S. *‘Química forense’*. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). 2016. ProQuest Ebook Central, <http://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=4508010>

16.- Gutiérrez-Fallas, D; Montero-Zeledón, E; Murillo-Quirós, N; Rojas-Rojas, L. Uso de la espectroscopia Raman en el análisis de fragmentos de pintura automotriz como evidencia forense. *Tecnología en Marcha*. Encuentro de Investigación y Extensión 2016. Pág 57-66.

17.- Amer, Maher S. *Raman Spectroscopy, Fullerenes and Nanotechnology*, Royal Society of Chemistry, 2010. ProQuest Ebook Central,

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/detail.action?docID=1186056>.

18.-Virga A, Ferrante C, Batignani G, De Fazio D, Nunn ADG, Ferrari Ac Cerullo G, Scopigno T. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy of single and multi-layer graphene. Nat Commun. 2019. 10 (1): 1-9. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-11165-1>

19.- Hernando-Alonso, I; Fesharaki O; Sánchez-Pastor N; Casado A.i; Astilleros J.M; Lobato, A; Taravillo, M; Fernández-Díaz L. *‘Análisis mediante espectroscopia Raman de huesos fósiles de micromamíferos del yacimiento paleontológico de Húmera’*. Revista de la sociedad española de mineralogía nº21 2016. Pág 56-58.

20.- P. Vandenberghe, “Raman spectroscopy in art and archaeology”, J. Raman Spectrosc. 35, 607–609 (2004). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jrs.1217>

21.- Domingo, C., Cañamares MV., Jurasekova Z., del Puerto, E., Sánchez-Cortés, S. Gracia-Ramos, JV. *‘Aplicaciones de la espectroscopia SERS a la detección de pigmentos orgánicos naturales en objetos de patrimonio cultural’*. Sociedad Española de Óptica. 2010. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/37561>

22.- Araujo C, Nolasco M, Ribeiro A, Ribeiro-Claro PJA. Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects. Water Research. 2018. 142: 426-440. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135418304421>

23.- Castro-Ramos, J; Villanueva-Luna, A.E; Ortiz-Lima, C.M; *‘Raman spectroscopy and its applications’*. Opt. Pura Apl. 2013. 83-95. Disponible en: http://www.sedoptica.es/Menu_Volumenes/Pdfs/OPA46-1-83.pdf