



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**ESPECTROSCOPIA RAMAN Y SU APLICACIÓN
EN MEDICINA**

Autor: Isabel M^a Peláez Lorente

Fecha: Julio 2020

Tutor: María Paz Sevilla Sierra

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | RESUMEN | 3 |
| 2 | INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 | <i>Funcionamiento y partes de un espectrómetro Raman</i> | 6 |
| 3 | OBJETIVOS | 7 |
| 4 | MATERIALES Y MÉTODOS | 8 |
| 5 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 8 |
| 4.1 | <i>Industria Farmacéutica:</i> | 8 |
| 4.2 | <i>Ciencia Forense:</i> | 13 |
| 4.3 | <i>Aplicaciones biomédicas:</i> | 15 |
| 6 | CONCLUSIÓN | 17 |
| 7 | BIBLIOGRAFÍA | 18 |

1 RESUMEN

La espectroscopía Raman se basa en la interacción de un fotón incidente y las moléculas de una muestra, haciendo que una pequeña parte de los fotones sean dispersados inelásticamente con una frecuencia específica para esas moléculas.

Esta técnica presenta utilidad en la distinción de medicamentos falsos y los originales como i.e. la Viagra® y el artesunato; en la comparación de fluidos corporales en la ciencia forense, entre la sangre, el sudor, el semen y la saliva, demostrando que estos se pueden diferenciar entre si con una comparación visual del espectro; y por último, se prueba el uso de esta técnica para el diagnóstico *in vivo* del cáncer nasofaríngeo y en el caso del cáncer colorrectal, en distintas localizaciones del colon, permite distinguir variaciones entre un tejido canceroso y uno sano.

Palabras clave: espectroscopía Raman, falsificaciones, diagnóstico.

2 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la búsqueda de una explicación al color azul del cielo, Rayleigh (12 de noviembre de 1842 – 30 de junio de 1919) formuló la teoría clásica de la dispersión de la luz sin cambio de frecuencia. (Rayleigh, 1871).

Esta teoría explica el porqué del cielo azul y predice que es debido a la dispersión de la radiación electromagnética por pequeñas partículas que poseen un radio menor de la longitud de onda de la radiación incidente¹, de aproximadamente 1/10 parte de esta.

El físico indio Chandrasekhara Venkata Raman (7 de noviembre de 1888 – 21 de noviembre de 1970), se obsesionó con este fenómeno y comenzó a investigar la dispersión de la luz por líquidos, descubriendo de forma experimental, la dispersión de la luz con cambio de frecuencia (Raman y Krishnan, 1928). Por ello, a este fenómeno se le denomina Efecto Raman.

Tras observar que la luz dispersada tenía un color diferente a la luz incidente y que esto se repetía en los estudios que realizó sobre más de 50 líquidos, en 1928 publicó sus trabajos y sus conclusiones en la revista *Nature*, en el artículo “A New Type of Secondary Radiation”².

El descubrimiento de este efecto le supuso a Raman ser galardonado con el Premio Nobel de Física en 1930.

Este efecto puede observarse tanto en sólidos, como en líquidos y gases. Para describirlo de la mejor forma posible hay que elegir una longitud de onda que no coincida con la frecuencia de absorción de la molécula elegida en la muestra.

¹ Grimnes, S., & O. G. (2008). *Bioimpedance and Bioelectricity Basics* (2.ª ed.). San Diego, United States: Academic Press.

² Raman, C. V. & Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048), 501-502.

Al incidir la luz con la muestra, se produce una interacción entre el fotón de la luz incidente y las moléculas de la muestra, dispersando este fotón con la misma energía o con un aumento o disminución de esta; es decir, se crean tres frecuencias distintas:

- Dispersión sin cambio de energía: es el fenómeno más común. La luz incidente con una frecuencia de ν_0 , al incidir con la molécula, dispersa el fotón con la misma energía que la del fotón incidente, ν_0 . Se le denomina dispersión Rayleigh o elástica.
- Dispersión con cambio de energía: también se le denomina inelástica debido a que la energía del fotón incidente y el emitido es distinta, a su vez puede ser con mayor o menor energía que el fotón incidente. Ambas posibilidades se dan de forma simultánea, formando el espectro Raman, que, de esta forma está compuesto por líneas de baja y de alta energía.
 - Líneas Stokes: están formadas por la dispersión de menor energía. Para que se dé, la molécula tiene que estar en su nivel de energía vibracional, de forma que al incidir el fotón éste le cede energía a la molécula, excitándola y haciéndola pasar a un nivel más alto de energía vibracional; de forma que el fotón dispersado tiene una energía menor que el incidente ($\nu_0 - \nu_m$).
 - Líneas anti-Stokes: éstas, al contrario que las anteriores, constituyen la dispersión de mayor energía. En este caso la molécula se encuentra en un estado de energía vibracional excitado, de forma que, durante la interacción del fotón con la molécula, ésta baja a un estado vibracional más relajado, liberando una cantidad de energía que es cedida al fotón, dispersándolo con una energía mayor a la del incidente ($\nu_0 + \nu_m$).

Como hemos explicado, la dispersión Rayleigh al no sufrir ningún cambio de energía, puede considerarse como un proceso dependiente de la longitud de onda del fotón incidente; pues si hacemos incidir un fotón con una frecuencia ν_0 , el fotón dispersado va a tener esa misma energía ν_0 .

Mientras que la dispersión Raman, es independiente a la frecuencia del haz incidente; pues si éste incide con una energía ν_0 , el fotón dispersado puede tener una mayor ($\nu_0 + \nu_m$) o menor ($\nu_0 - \nu_m$) energía.

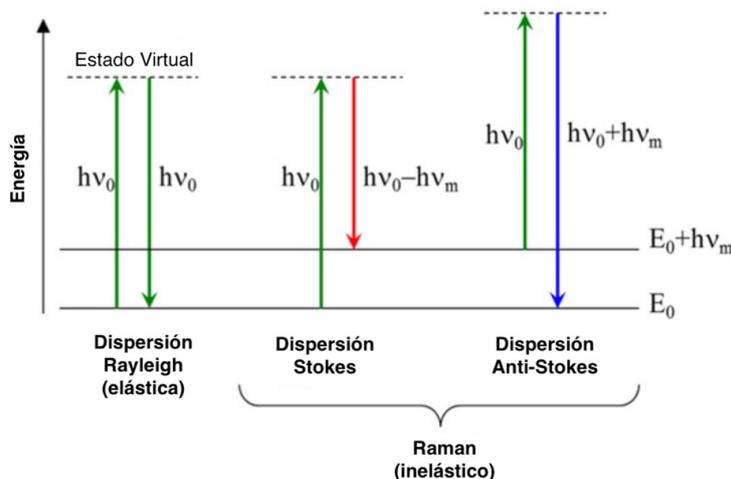


Ilustración 1. Diagrama de Jablonski representando las transiciones de la dispersión Raman y Rayleigh.

La dispersión Raman es un efecto muy débil, pues sólo se da en 1 de las 100.000 moléculas de la muestra. Dentro de este espectro, se suele mirar las líneas Stokes pues son las más fuertes, debido a que las líneas anti-Stokes, al haber un paso de energía a un estado vibracional menor, son transiciones muy débiles.

Lo importante de la dispersión Raman, y lo que la hace tan interesante, es que las líneas Stokes y anti-Stokes son características de la sustancia en particular que se esté observando. Las líneas se forman al hacer incidir un haz de luz monocromática sobre las moléculas de una sustancia, la interacción entre ambas depende de la frecuencia de los niveles energéticos vibracionales de las moléculas de analito y de la frecuencia de la radiación incidente, y va a ser dispersada con una energía determinada propia de ese sistema.

La información de la sustancia a analizar se representa en el espectro Raman, el ejemplo puede verse en la Ilustración 2. Consiste en un eje de abscisas que corresponde al número de onda, expresado en nm y en el eje de ordenadas aparece la intensidad Raman.

Este espectro es un conjunto de intensidades de la radiación dispersada Raman, convertimos a números de onda (normalmente en cm^{-1}) tanto la frecuencia de la dispersión como de la radiación incidente, y la diferencia entre ambas es el espectro Raman³.

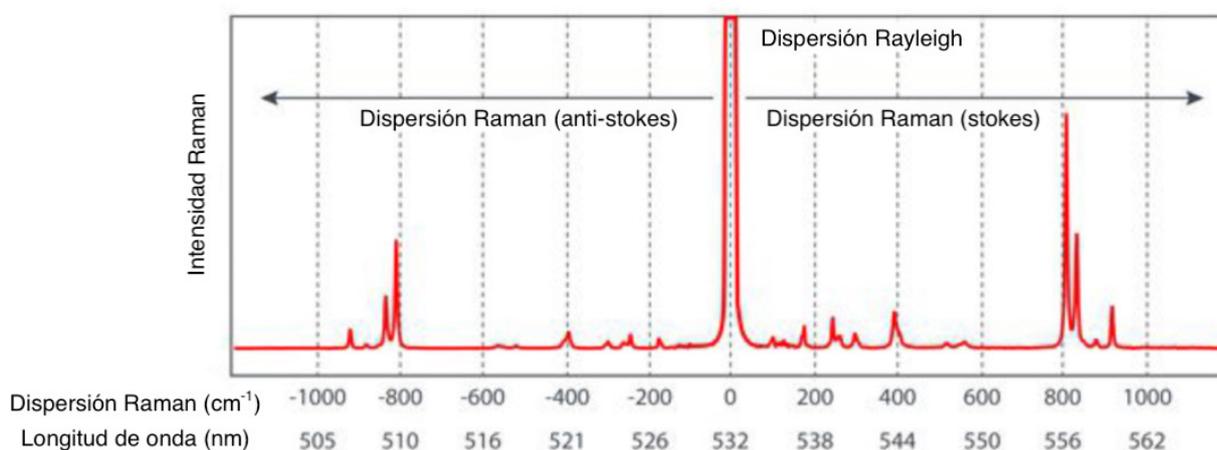


Ilustración 2. Ejemplo de un espectro Raman.

Una vez que tenemos la información representada en el espectro, podemos ver que la dispersión Rayleigh tiene la misma longitud de onda que la luz incidente y que es la más fuerte (como ya hemos explicado). La dispersión Raman se detecta a ambos lados; la dispersión Raman de menor longitud de onda y más débil es la línea anti-Stokes, mientras que la línea dispersada de mayor longitud de onda es la Stokes, que normalmente tiene una mayor intensidad y por ello son usadas para el análisis.

Es decir, en el eje de abscisas se puede leer información de la vibración molecular y en el eje de ordenadas, la fuerza de la actividad.

³ Spencer, P., & Misra, A. (2016). *Material-Tissue Interfacial Phenomena*. Great Britain: Woodhead Publishing.

1.1 Funcionamiento y partes de un espectrómetro Raman

Un esquema de un espectrómetro Raman puede verse en la ilustración 3.

Lo primero con lo que nos encontramos es con la **fente de excitación**, que suele ser un láser. Este lo dirigimos hacia la muestra, haciéndolo pasar por una **lente convergente** que concentra el haz láser sobre la muestra. En ese momento, los fotones del haz interactúan con las moléculas de la muestra, produciéndose así la dispersión Rayleigh y la Raman. Esta radiación dispersada pasa a continuación por un **filtro notch**. Se usa para retener la dispersión Rayleigh y aislar la dispersión Raman, que es más débil y la que nos interesa. Tras el filtro nos encontramos con otra **lente convergente** que tiene la misma función que la anterior mencionada y tras pasar por ella, la radiación llega al **espectrómetro**. En su interior se encuentra la rejilla de difracción o grating que separa la radiación que llega en las diferentes longitudes de onda que la conforma y de esta forma pasa ya al **detector**. Este último recoge la información la digitaliza y la transfiere a un ordenador donde tras un tratamiento matemático aparece el espectro tal y como lo conocemos.

Una descripción mas detallada de los componentes más característicos es:

- I. Fuente de excitación: en un inicio se usaron lámparas de mercurio, pero como no eran una fuente de alta intensidad, se tenían que usar grandes volúmenes de muestra para compensar. Al no ser un método muy eficaz, se dejó un poco de lado el uso de esta técnica hasta el descubrimiento del láser en 1960⁴. El láser (Ilustración 3, 1.) es una fuente de excitación excelente pues emite una luz monocromática, de alta intensidad, muchos fotones por haz de láser y un haz de pequeño diámetro (hasta 0'1mm). Además, establece un haz de radiación estable e intenso. Los láseres más usados son los de Ar⁺ (argón), He-Ne (helio-neón), Kr⁺ (kriptón) y Nd:YAG (neodymium-Yttrium Aluminum Garnet). Sin embargo, hay que tener cuidado con los láseres de corta longitud de onda como el Ar⁺ y el Kr⁺, pues pueden producir fluorescencia y conllevar a la fotodescomposición de la muestra. Para evitar esto, es mejor usar un láser de mayor longitud de onda como el Nd:YAG⁵.
- II. Lentes: pueden ser convergentes o divergentes. Las primeras concentran el haz de luz que pasa por ellas; y las segundas dispersan la luz que la atraviesan (Ilustración 3, 2.). Dependiendo de lo que nos sea más útil, usaremos unas u otras.
- III. Filtros: son muy útiles puesto que son los encargados de dejar pasar solamente la luz con las propiedades que nos interesen. Cabe resaltar los filtros ópticos, que se van a encargar como hemos explicado antes, de aislar la dispersión Raman. Se colocan antes de que el haz de radiación pase por el espectrómetro y el detector, para que así sólo se analice la radiación que nos interesa. A su vez, dentro de estos filtros, destacan dos: *Edge* (cuya

⁴ Bertrand, M. J. (1998). Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 120(26).

⁵ Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of Instrumental Analysis* (7.^a ed.). Boston, United States: Cengage Learning.

ventaja es que su vida útil es infinita) y *Notch* (son capaces de medir tanto la dispersión Stokes como anti-Stokes); usándose habitualmente estos últimos (Ilustración 3, 3.).

IV. Espectrómetro: se encarga de separar la luz incidente en las diferentes frecuencias que forman el espectro de esta radiación (Ilustración 3, 4.). Consta de una pequeña entrada por la que pasa la radiación incidiendo sobre una lente colimadora (Ilustración 3, 5.) que dirige la luz hacia la rejilla de difracción (Ilustración 3, 6.). Ésta dispersa la luz en sus diferentes longitudes de onda y cada una de estas en un ángulo diferente, similar a como lo haría un prisma. Y salen con la ayuda de otra lente colimadora que dirige las distintas frecuencias de la luz hacia el hueco de salida.

V. Detector: Hay varios tipos de detectores, pero los más usados en estos últimos años son los CCDs (Charged-coupled devices) junto con los CTDs (Charger Transfer Devices) y los CIDs (Charged-Injection Devices).

Los CCDs (Ilustración 3, 7.) son lo más utilizados debido a que se pueden usar con láseres que emitan una longitud de onda menor de 1 micrómetro, son altamente sensibles a la luz y porque permiten detectar la totalidad del espectro Raman de una sola vez.

Los CCDs son unos chips, que convierten los fotones que llegan en electrones y estos en una señal que se pasa al ordenador para digitalizarla.

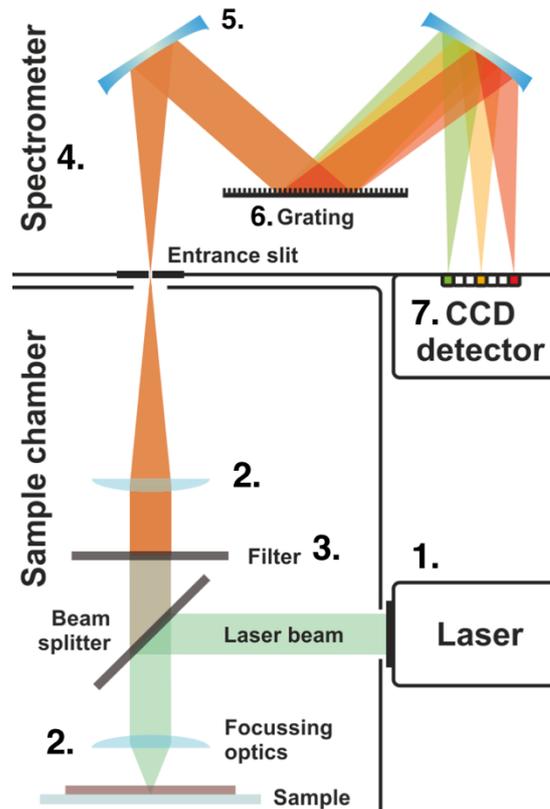


Ilustración 3. Esquema de un espectrómetro Raman con sus distintas partes: (1) Fuente de excitación, (2) Lentes, (3) Filtro, (4) Espectrómetro, (5) Lente colimadora, (6) Rejilla de difracción y (7) Detector. Fuente: Schmid, T.; Dariz, P. Raman Microspectroscopic Imaging of Binder Remnants in Historical Mortars Reveals Processing Conditions. Heritage 2019, 2, 1662-1683.

La débil dispersión Raman es el mayor problema de esta técnica. Sin embargo, la sensibilidad puede ser mejorada usando Espectroscopía Raman de Resonancia (RRS) y Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). Esta última es una técnica modificada en la cuál la muestra es adsorbida en una superficie coloidal metálica nanoestructurada y de esa forma se mejora la intensidad de las señales Raman. Mientras en el RRS, la radiación incidente coincide con la transición electrónica de la molécula y como resultado, se obtiene un espectro Raman mucho más intenso.

3 OBJETIVOS

El fin de este trabajo es realizar una exposición del estado actual de la aplicación en medicina de la Espectroscopia Raman elaborado a través de una búsqueda bibliográfica.

Se pretende demostrar la utilidad de esta técnica con ejemplos concretos, tanto en la industria farmacéutica, como en la medicina forense o en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se ha efectuado una extensa búsqueda bibliográfica en páginas web como Pub-Med, Science Direct, Elsevier o google schooler. También se han consultado diversos artículos científicos y libros.

Para que la búsqueda fuera más específica y rápida, se usaron palabras clave como “raman scattering”, “cancer”, “applications” y diagnosis”.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vamos a ver las aplicaciones que tiene esta técnica tres ámbitos: Industria farmacéutica, ciencia forense y aplicaciones biomédicas.

5.1 Industria Farmacéutica:

La espectroscopía Raman puede ser muy útil en todo el ciclo del fármaco, y especialmente en estos pasos:

- Descubrimiento de un fármaco: en la identificación de las moléculas activas, selección de las moléculas con mejores propiedades e identificación de las moléculas activas en la diana.
- En el transcurso de la fase preclínica hasta el desarrollo farmacéutico: estudios del estado sólido, polimorfismos, en controles del proceso, distribución del componente.
- Control de calidad: caracterizando los principios activos y excipientes, polimorfismo, monitorizando las características físicas y químicas.
- Detección de falsificaciones y protección de patentes.

En esta memoria nos vamos a centrar en la identificación de medicamentos falsificados. En 1992, la OMS publicó un informe, “Countefeit Drugs”, donde definió que:

*Un medicamento falsificado es el que es etiquetado incorrectamente de manera deliberada y fraudulenta en su naturaleza y su origen. La falsificación se puede aplicar a productos de marca y productos genéricos y los productos adulterados pueden contener los ingredientes correctos, no contener ingredientes activos, contener una cantidad insuficiente de ingredientes activos o bien haber sido envasados de manera fraudulenta.*⁶

⁶ Division of Drug Management & Polices. *Counterfeit drugs* [Internet]. World Health Organization. [citado 8 de abril de 2020]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58358/WHO_DMP_CFD_92.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Dentro de esta definición, se incluye que los medicamentos falsificados pueden llevar los ingredientes correctos (pero en menor o mayor dosis), los ingredientes incorrectos, no llevar ingredientes activos, insuficientes ingredientes o un embalaje falso.⁷ La falsificación de medicamentos afecta tanto a marcas como genéricos.

Según un informe de “International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce” publicado en 2006⁸, los países más afectados por esto son los que están en vías de desarrollo como África, partes de Asia y partes de Latinoamérica, donde más del 30% de las medicinas son falsificaciones. Pero este mercado, también afecta a los países más desarrollados como USA, EU, Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda... donde menos del 1% son falsificaciones.

Nos vamos a centrar en dos medicamentos falsificados, los antimaláricos, refiriéndonos a los países en vías de desarrollo y la Viagra® en los países desarrollados.

Falsificaciones de antimaláricos:

El número de casos de malaria aumentó del año 2016 al 2017, pasando de 217 millones de casos a 219 millones respectivamente. La mayoría de estos casos fueron en la Región de África de la OMS (92%), en la región de Asia Sudoriental de la OMS (5%) y la Región del Mediterráneo Oriental de la OMS (2%).⁹

El 80% de casos de la malaria se dan en quince países del África Subsahariana y la India.¹⁰

Al ser esta enfermedad endémica en estos países, uno de los fármacos más falsificados son los antimaláricos.

Uno de los tratamientos contra la malaria es la solución por vía intravenosa de una solución de artesunato o las tabletas de artesunato.

Basándonos en el artículo de Marleen de Veji et al.¹¹ se analizan varias clases de antimaláricos y la molécula de artesunato.

Usando un espectrofotómetro Renishaw System 1000 conectado a un microscopio Olympus BH-2, con un láser de longitud de onda de 785 nm, vemos que el espectro de la molécula original de artesunato es el siguiente:

⁷ Department of Essential Drugs and Other Medicines. *Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs* [Internet]. World Health Organization. [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65892/WHO_EDM_QSM_99.1.pdf;jsessionid=81C78B29ECB39DA003D5F73B5A2BDF95?sequence=1

⁸IMPACT. *Counterfeit Medicines* [Internet]. World Health Organization. [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/medicines/services/counterfeit/impact/TheNewEstimatesCounterfeit.pdf>

⁹ *Paludismo: El informe de este año de un vistazo* [Internet]. Organización Mundial de la Salud. [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/es/>

¹⁰ *Paludismo: El informe de este año de un vistazo* [Internet]. Organización Mundial de la Salud. [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2018/es/>

¹¹ de Veji, M., Vandenabeele, P., Hall, K. A., Fernandez, F. ., Green, M. D., White, N. J., Moens, L. (2007). Fast detection and identification of Counterfeit antimalarial tablets by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(2), 181-187.

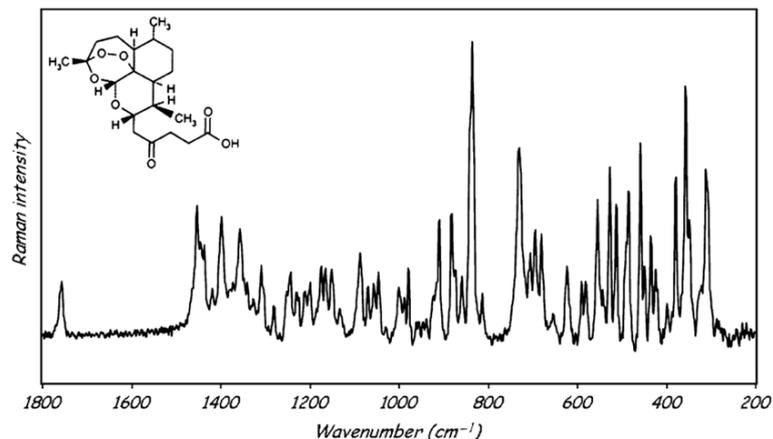


Ilustración 4. Espectro Raman de artesunato a 785nm y su estructura molecular.

A continuación, se analiza de igual forma las 50 muestras de antimaláricos. Viendo los espectros de todos ellos, los podemos clasificar en 4 grupos (Ilustración 5):

Los fármacos del grupo a), tienen el mismo espectro que la molécula de artesunato, por lo que son comprimidos de antimalárico original.

El grupo b), tiene un espectro muy distinto en comparación con el artesunato (Ilustración 4). Sólo tiene dos picos a 1086 cm⁻¹ y a 712 cm⁻¹. Estos fármacos están compuestos por carbonato cálcico (CaCO₃), pues tienen el mismo espectro que éste.

El grupo c) vemos que tiene más picos, su espectro no es tan simple. A priori podría resultar muy parecido al del fármaco original, pero si nos fijamos, hay varios picos que no coinciden con el artesunato. Uno de ellos es el pico tan pronunciado a 675 cm⁻¹, que no encontramos en el original; los picos desde el 1200 cm⁻¹ a 1600 cm⁻¹ no se desarrollan igual, como se observa, el pico a 1300 cm⁻¹, se da de forma más abrupta en el artesunato, mientras que en este grupo es más gradual; además de la ausencia de pico a 1757 cm⁻¹. Este espectro coincide con el del almidón.

El grupo d), tiene un espectro con unos picos característicos a 857, 1167, 1235 y 1322 cm⁻¹, que coinciden con los del paracetamol.

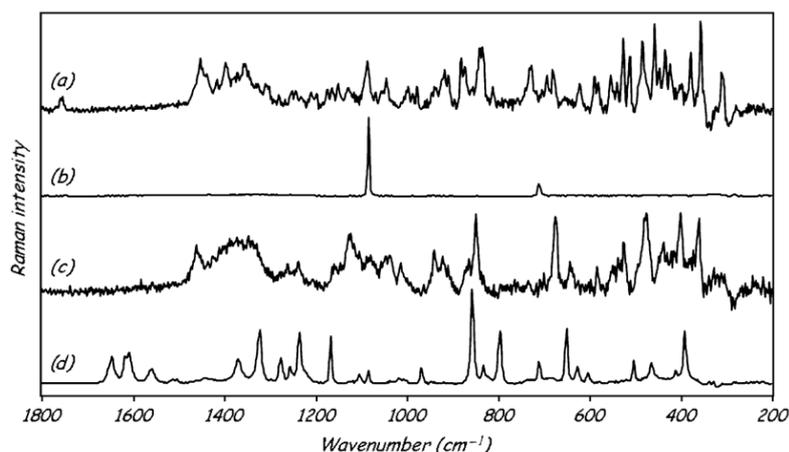


Ilustración 5. Espectro de las 4 clases de antimaláricos

Como vemos, de los 50 fármacos analizados, 26 de ellos contenían artesunato (Grupo a)), 10 contenían CaCO₃ (Grupo b)), 10 tenían almidón (Grupo c)) y 4 de ellos paracetamol (Grupo d)).

Falsificaciones de Viagra®:

El sildenafil, un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), se utiliza para el tratamiento de la disfunción eréctil y es comercializado bajo el nombre de la marca comercial Viagra® del laboratorio Pfizer.

Según una entrevista que realizó la Universidad de Boston a Muhammad Zaman, autor del libro "Bitter Pills: The Global War on Counterfeit Drugs", éste es uno de los fármacos más falsificados.¹²

La compañía farmacéutica Pfizer, descubrió que, en el mercado de Hong Kong, aproximadamente el 40% de las ventas de Viagra® corresponden a falsificaciones de este fármaco¹³.

Para este caso nos vamos a fundamentar en un artículo de Marleen de Veij et al.¹⁴ donde se analiza mediante un espectrofotómetro la molécula de sildenafil, un comprimido de Viagra® y 18 comprimidos de "Viagras".

El aparato utilizado ha sido un espectrofotómetro Renishaw System-1000 conectado a un microscopio Olympus BH-2. El láser empleado es de diodo, con una longitud de onda de 785nm.

En primer lugar, se compara el espectro de la molécula del principio activo (Sildenafil) con el comprimido de Viagra®:

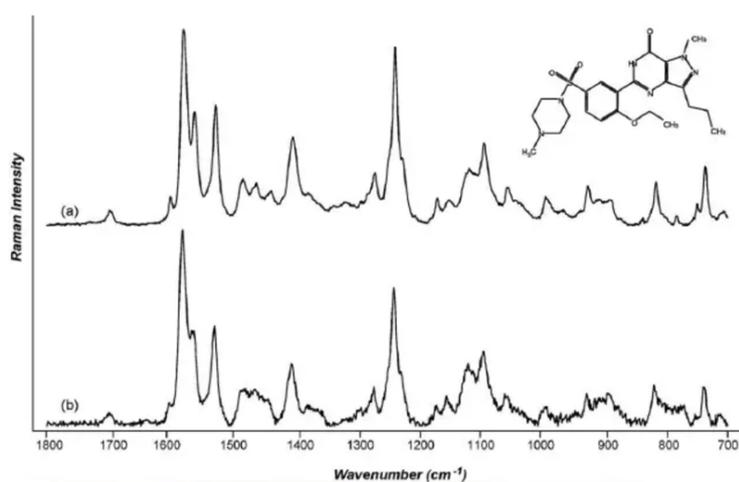


Ilustración 6. (a) Espectro de la molécula de sildenafil y (b) comprimido de Viagra®.

¹² Moran B. *Counterfeit Viagra Is a Problem* [Internet]. Boston University. [citado 15 de abril de 2020]. Disponible en: <http://www.bu.edu/articles/2018/counterfeit-viagra-is-a-problem/>

¹³ European Pharmaceutical Review. *Pharmaceutical company combats counterfeit Viagra* [Internet]. European Pharmaceutical Review. [citado 15 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/91634/pfizer-combat-counterfeit-viagra/>

¹⁴ de Veij, M., Deneckere, A., Vandenabeele, P., de Kaste, D., & Moens, L. (2008). Detection of Counterfeit Viagra with Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(2), 303-309.

Comparando los dos espectros, vemos que los grupos funcionales del principio activo coinciden con los del espectro de la Viagra®.

El pico a 1699cm^{-1} se debe a la vibración del grupo C=O; a 927cm^{-1} debido al enlace C-N; a 1528cm^{-1} por N-C=N; el pico entre 1580cm^{-1} y 1562cm^{-1} por el enlace C=C y, por último, el pico que se encuentra entre 1238 y 1272cm^{-1} debido a C=N.

Las bandas que no coinciden con la molécula de sildenafil, son debidas a los excipientes que lleva la Viagra® en su comprimido. Estos excipientes que se ven reflejados en el espectro son: lactosa (pico entre 873cm^{-1} y 847cm^{-1}), celulosa microcristalina (1352cm^{-1} y 1117cm^{-1}) y estearato de magnesio (1294cm^{-1} y 769cm^{-1}).

A continuación, vamos a ver el espectro de los 18 comprimidos de "Viagra" y compararlos con el de Viagra® (Ilustración7). Lo que vamos a buscar son los picos característicos del principio activo, como primer motivo de diferenciación entre los falsificados y el original.

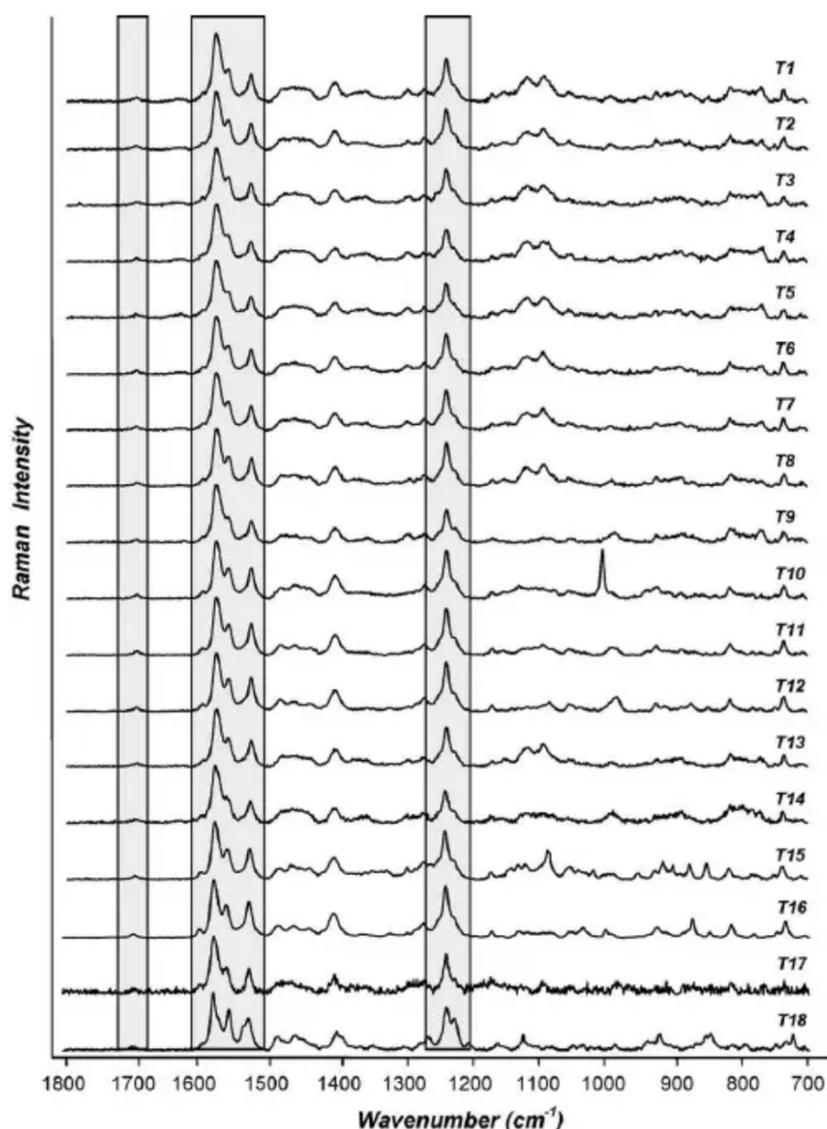


Ilustración 7. Espectros de las 18 muestras.

En esta ilustración, está resaltado en gris los picos característicos del principio activo. Se puede observar que todas las muestras llevan sildenafil.

Ahora nos vamos a centrar en el resto del espectro para buscar diferencias:

La muestra 9, tiene un pico adicional a 987 cm^{-1} , que es típico del sulfato de bario. El comprimido 10, también tiene un pico extra a 1005 cm^{-1} , que puede ser atribuido al sulfato de calcio. El número 15 tiene dos picos, a 711 cm^{-1} y a 1084 cm^{-1} que son específicos del carbonato de calcio. La muestra 16, presenta unos picos típicos del manitol (782 , 872 y 1034 cm^{-1}). El comprimido 18, presenta tres picos a 846 , 921 y 1123 cm^{-1} que son asignados a la sucrosa. En la muestra 17, vemos que sólo hay principio activo, pues no hay otros picos en el espectro que haya algún excipiente.

En el espectro de los comprimidos 11, 12 y 14, vemos que falta el pico a 1117 cm^{-1} , propio de la Viagra®.

Las muestras 1,2,3,4,5,6,7,8 y 13, presentan el mismo espectro que el del comprimido de la Viagra®, incluidas las bandas típicas de los excipientes que suele llevar.

Como vemos, las muestras de 9-12 y 14-18, se pueden diferenciar claramente del comprimido original de Viagra® por la falta o exceso de bandas en sus espectros; mientras que los comprimidos 1-8 y 13, tienen el mismo espectro raman que la Viagra® con la que lo estamos comparando.

5.2 Ciencia Forense:

La espectroscopía Raman aplicada a la identificación de fluidos desconocidos se está desarrollando como campo dentro de la ciencia forense¹⁵. Esto es de suma importancia pues los fluidos biológicos son un tipo de prueba bastante común en las evidencias forenses en los casos de asalto sexual, que son los más difíciles de resolver¹⁶.

Por ello, uno de los pasos forenses más importantes es la identificación de esos rastros biológicos como sangre, semen, saliva o sudor¹⁷. La capacidad de identificar estos compuestos en las escenas de crimen y preservar el ADN, es muy importante.

La mayoría de las técnicas que usan para la identificación de estos fluidos requieren consumir químicos y parte de la muestra que suelen ser destructivos.

Muchos de los tests bioquímicos dañan la muestra al ser consumida por una reacción química o por una exposición a radiación.

Los fluidos más comunes encontrados en las escenas del crimen son sangre, semen y saliva; y hay numerosos métodos para distinguir unos de otros. La sangre se puede identificar usando algunos tests que son destructivos y pueden dar falsos positivos. La identificación del semen es muy parecida pues también es una técnica destructiva. Mientras que la saliva no tiene tests confirmatorios. Todas estas pruebas se tienen que realizar en el laboratorio, cogiendo parte de la muestra y los resultados no están listos hasta pasadas unas horas. Las desventajas de estos tests es que se necesita parte de la muestra (que en ocasiones es muy pequeña) y que

¹⁵ Vandenabeele, P., Edwards, H.G.M, & Jehlicka, J. (2014). The role of mobile instrumentation in novel applications of Raman spectroscopy: archaeometry, geosciences, and forensics. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2628.

¹⁶ Li, R. (2008). *Forensic Biology*. Abingdon, Reino Unido: Taylor & Francis, pp 3-9.

¹⁷ Kobilinsky, L. (2012). *Forensic Chemistry Handbook*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp 269- 282

son técnicas destructivas. Además, en muchas ocasiones los fluidos pueden estar mezclados con otros, haciendo la identificación mucho más difícil.

Basándonos en el estudio de Kelly Virkler e Igor K. Lednev¹⁸ vamos a ver cómo la espectrografía Raman permite una identificación no destructiva y específica de varios fluidos biológicos.

Los fluidos que se eligieron fueron: semen humano, fluido vaginal, saliva, sudor, sangre y semen canino. El espectrofotómetro que se usó fue un espectrómetro Renishaw inVia equipado con un microscopio Leica. El láser que se usó fue a una longitud de onda de 785nm.

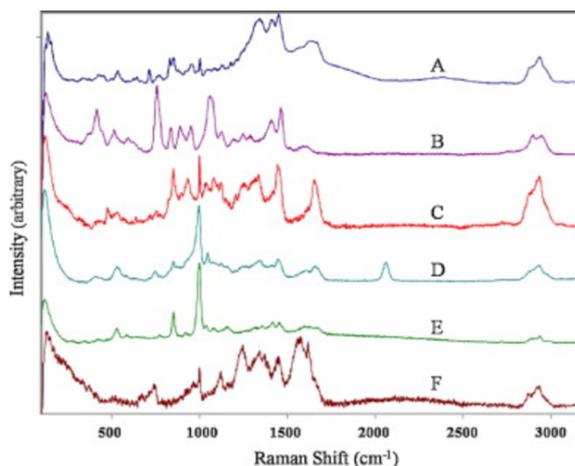


Ilustración 8. Espectros Raman de los distintos fluidos: semen humano (A); semen canino (B); fluido vaginal (C); saliva(D); sudor (E) y sangre (F).

Al analizar las diferentes muestras, se obtuvieron los espectros que podemos ver en la Ilustración 8.

Cada pico del espectro raman corresponde a componentes específicos de cada fluido.

Semen humano: el pico a 536 cm^{-1} puede corresponder a Lactato, Urea y Lisozima; a 620 cm^{-1} al ácido ascórbico; a 831 cm^{-1} a la fructosa; a 960 cm^{-1} al ácido cítrico; a 1342 cm^{-1} al triptófano.

Semen canino: tiene varias bandas similares a las del semen humano, pero tiene sus diferencias en las intensidades de los picos y algunos que son exclusivos de este fluido. El pico a 760 cm^{-1} es debido al triptófano, que en el semen humano está a menor concentración. Otro pico a 1061 cm^{-1} , es debido a la combinación de la glucosa y fructosa, más fuerte en este fluido.

Fluido vaginal: es parecido al semen humano, pero hay diferencias substanciales. Los picos de la lisozima y la urea son comunes tanto para el semen como para el fluido vaginal. El pico a los 1000 cm^{-1} es debido a la urea y/o fenilalanina que se encuentra en las proteínas de este fluido. A 641 y a 936 cm^{-1} tenemos el ácido acético.

Saliva: el pico a 2065 cm^{-1} es único de este fluido, no lo presentan los demás. La saliva contiene amilasa, lipasa y lisozima. Este último se identifica en los picos a 1343 , 1449 y 1660 cm^{-1} . Tanto la amilasa como la lipasa contienen fenilalanina, que se identifica en el pico de los 1000 cm^{-1} .

Sudor: tiene un alto pico a 1000 cm^{-1} que corresponde a la urea. Por lo demás es bastante sencillo.

Sangre: contiene hemoglobina, albúmina y glucosa. La hemoglobina forma parte del 95% de las células de la sangre. Si comparamos este espectro con en el de la hemoglobina, vemos las semejanzas.

Como vemos los espectros obtenidos de cada fluido son diferentes entre si, permitiendo que se puedan distinguir unos fluidos de otros.

¹⁸ Virkler, K., & Lednev, I.K. (2008). Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic science international*, 181(1-3), e1-e5.

Además de este estudio, la espectroscopía raman se ha usado para el análisis de varios tipos de evidencias forenses como fibras¹⁹, tinta²⁰, pinturas²¹, residuos de disparos²² y huesos²³ entre otros.

5.3 Aplicaciones biomédicas:

La biomedicina se encarga de obtener las secuencias del genoma, las estructuras de proteínas, imágenes médicas, cuantificación de los biomarcadores de enfermedad en la sangre y el diagnóstico de enfermedades.

La importancia de esta técnica surge de su habilidad por detectar cambios bioquímicos a nivel molecular, por lo que puede ser usado para diagnóstico, pronóstico o para evaluar nuevas terapias.

La espectroscopía raman es un método atractivo para un amplio rango de aplicaciones biomédicas porque no necesita un etiquetado para la identificación. Además, esta técnica nos da múltiples marcadores de identificación de alta precisión para una molécula específica. Por todo ello, (la especificidad y la no necesidad de etiquetado) esta técnica se ha ido asentado más en las aplicaciones biomédicas como el diagnóstico.

Sin embargo, hay ciertas limitaciones. El efecto del espectrómetro Raman convencional es relativamente débil. Para compensarlo, se necesitan altas concentraciones de especies moleculares. Además, dependiendo de la excitación usada, las muestras biológicas pueden ser fluorescentes, lo cual enmascara las señales raman. Para evitar este fenómeno, se puede usar un láser en el infrarrojo cercano en el espectro electromagnético (NIR) a 785nm.

Para ver cómo funciona nos vamos a basar, al igual que en los apartados anteriores, en algunos trabajos publicados.

Se están haciendo diversos estudios para ver los posibles beneficios y utilidad de esta técnica para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo²⁴. Esta enfermedad, es de origen genético, está causada por cambios en los genes que controlan la división celular de las células. Estos cambios pueden ser hereditarios o bien ambientales. Las células cuando sufren daños o son viejas, mueren y se crean nuevas células que las sustituyan. El problema aparece cuando esto no pasa, pues nuestro organismo va a crear nuevas células debido a que percibe que las otras están dañadas. Estas nuevas células se pueden dividir sin parar y llegan a formar agregados, que son los llamados tumores.

¹⁹ Miller, J. V., & Bartick, E. G. (2001). Forensic Analysis of Single Fibers by Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 55(12), 1729-1732.

²⁰ Zieba-Palus, J., & Kunicki, M. (2006). Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. *Forensic Science International*, 158(2-3), 164-172.

²¹ E.M., Suzuki, & M. Carrabba. (2001). *In situ* identification and analysis of automotive paint pigments using line segment excitation Raman spectroscopy: I. Inorganic top coat pigments. *Journal of Forensic Science*, 46(5), 1053-1069.

²² Bueno, J., Sikirzhyski, V., & Lednev, I. K. (2012). Raman Spectroscopic Analysis of Gunshot Residue Offering Great Potential for Caliber Differentiation. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4334-4339.

²³ McLaughlin, G., & Lednev, I. K. (2012). Spectroscopic Discrimination of Bone Samples from Various Species. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3(2), 161-167.

²⁴ *Cáncer* [Internet]. Organización Mundial de la Salud. [citado 18 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

El estudio de Kan Lin et al.²⁵ pone de manifiesto el uso de esta técnica como diagnóstico en tiempo real del cáncer nasofaríngeo. Para ello, adaptan el espectrómetro Raman convencional, para que se pueda usar en una endoscopia, añadiendo una fibra óptica de 1,9 m de largo. Se utiliza un láser de diodo NIR, con una longitud de onda de 785nm.

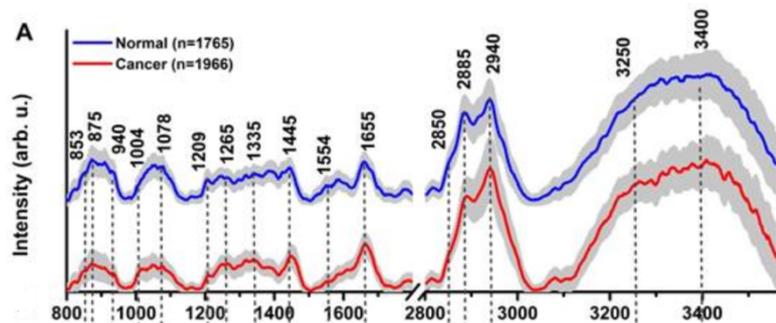


Ilustración 9. Espectro Raman de los sujetos sin cáncer (azul) y de los que tienen cáncer (rojo).

Se escogieron 95 pacientes, de los cuales 38 tenían cáncer y 75 eran sanos.

Al comparar los dos espectros de la Ilustración 9, podemos encontrar diferencias. Los picos a 853 cm^{-1} y 875 cm^{-1} , en el espectro del cáncer es más bajo, lo que indica que los niveles de colágeno están

disminuidos. La mayor intensidad a 1335 cm^{-1} en el caso de cáncer, puede ser debido a un aumento del contenido de ADN. Este espectro también está caracterizado por una mayor intensidad a 1265 cm^{-1} y 1445 cm^{-1} , producido por aminas y deformación de proteínas y lípidos respectivamente.

Se demuestra que esta técnica puede ser realizada a tiempo real durante una endoscopia en pacientes con este tipo de cáncer. Presenta una notable ventaja frente a la forma convencional de diagnosticarlo que es mediante una endoscopia, en la que se busca la visualización de cambios morfológicos. Por lo que normalmente, este tipo de cáncer se diagnostica en fases avanzadas.

Otro ejemplo de una endoscopia en vivo para el diagnóstico de cáncer es el que llevó a cabo Mads Sylvest Bergholt et al.²⁶, en este caso, centrado en el cáncer colorrectal.

El instrumento que se usa vuelve a ser un espectrógrafo Raman con fibra óptica y con un láser diodo NIR a 785nm.

Se comparan los espectros de las partes del colon (recto, sigmoideo, descendiente, transversal y ascendente) sin cáncer, con un recto con cáncer en la Ilustración 10. La finalidad de esta comparación es ver la diferencia de composición de las diferentes partes de un colon sano con un con el recto canceroso.

Los picos a 2850 cm^{-1} y 2885 cm^{-1} , que corresponden a los lípidos, se ven reducidos en el recto porque hay menos cantidad que en el resto del colon. También se puede ver que el pico entre 3250 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} es más intenso en los pacientes con cáncer, que está asociado a las proteínas.

²⁵ Lin, K., Zheng, W., Lim, C. M., & Huang, Z. (2017). Real-time In vivo Diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma Using Rapid Fiber-Optic Raman Spectroscopy. *Theranostics*, 7(14), 3517-3526.

²⁶ Bergholt, M.S., Zheng, W., Lin, K., Wang, J., Xu, H., Ren, J., ... Huang, Z. (2014). Characterizing Variability of In Vivo Raman Spectroscopic Properties of Different Anatomical Sites of Normal Colorectal Tissue towards Cancer Diagnosis at Colonoscopy. *Analytical Chemistry*, 87(2), 960-966.

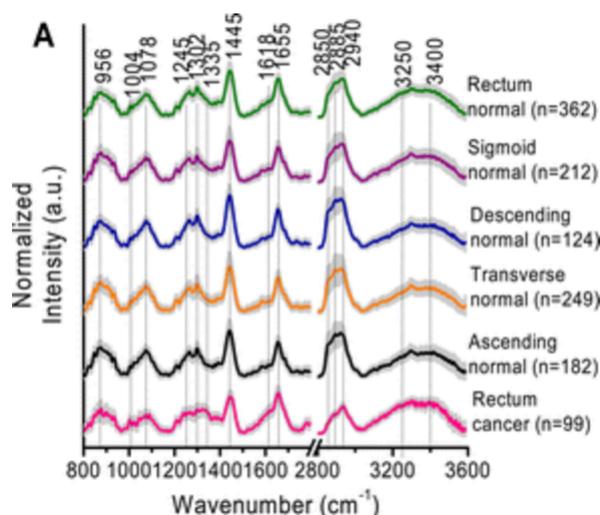


Ilustración 10. Espectro Raman de las distintas zonas del colon: Recto (verde), Sigmoideo (morado), Parte descendente (azul), Transversal (naranja), Parte ascendente (negro) y Recto canceroso (rosa).

Como vemos, con esta técnica se puede distinguir el recto del colon. La composición epitelial del intestino varía a lo largo del colon, cosa que se ve reflejada en el espectro.

Este estudio, demuestra que se puede diferenciar el tejido canceroso del normal gracias al espectrómetro Raman con una exactitud del 88'8%, pues proporciona una caracterización biomolecular para el diagnóstico cáncer colorrectal.

Además de para diagnóstico in vivo, hay más estudios para diferentes aplicaciones como para diagnosticar enfermedades neurodegenerativas²⁷, infecciones del tracto urinario, enfermedades de

transmisión sexual, bacterimia²⁸, cáncer de pulmón²⁹, caracterización de hepatocitos sanos y malignos³⁰, cáncer de próstata³¹, de hígado³² y de mama³³ entre otros.

6 CONCLUSIÓN

La investigación realizada pone de manifiesto las utilidades de la espectroscopía Raman.

En la Industria farmacéutica es muy útil detectando medicamentos falsificados, debido a que es una técnica **rápida**, en cuestión de minutos o segundos se obtiene el espectro de la muestra a analizar.

²⁷ Devitt, G., Howard, K., Mudher, A., & Mahajan, S. (2018). Raman Spectroscopy: An Emerging Tool in Neurodegenerative Disease Research and Diagnosis. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(3), 404-420.

²⁸ Laane, J. (2017). *Frontiers and Advances in Molecular Spectroscopy*. Maarssen, Países Bajos: Elsevier Gezondheidszorg.

²⁹ Zhang, K., Hao, C., Huo, Y., Man, B., Zhang, C., Yang, C., ... Chen, C. (2019). Label-free diagnosis of lung cancer with tissue-slice surface-enhanced Raman spectroscopy and statistical analysis. *Lasers in Medical Science*, 34(9), 1849-1855.

³⁰ Hawi, S. R., Campbell, W. B., Kajdacsy-Balla, A., Murphy, R., Adar, F., & Nithipatikom, K. (1996). Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. *Cancer Letters*, 110(1-2), 35-40.

³¹ Koo, K. M., Wang, J., Richards, R. S., Farrell, A., Yaxley, J. W., Samaratunga, H., ... Trau, M. (2018). Design and Clinical Verification of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Diagnostic Technology for Individual Cancer Risk Prediction. *ACS Nano*, 12(8), 8362-8371.

³² Bai, X.-R., Wang, L.-H., Ren, J.-Q., Bai, X.-W., Zeng, L.-W., Shen, A.-G., & Hu, J.-M. (2019). Accurate Clinical Diagnosis of Liver Cancer Based on Simultaneous Detection of Ternary Specific Antigens by Magnetic Induced Mixing Surface-Enhanced Raman Scattering Emissions. *Analytical Chemistry*, 91(4), 2955-2963.

³³ Lee, J. U., Kim, W. H., Lee, H. S., Park, K. H., & Sim, S. J. (2019). Quantitative and Specific Detection of Exosomal miRNAs for Accurate Diagnosis of Breast Cancer Using a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor Based on Plasmonic Head-Flocked Gold Nanopillars. *Small*, 15(17), 1804968.

En la Ciencia forense la mayoría de las técnicas usadas actualmente, tienen la desventaja que necesitan grandes cantidades de muestra y que dañan dicha muestra. Todo ello se suple con la espectroscopía Raman, puesto que aparte de ser una técnica rápida, **no es destructiva y no necesita grandes cantidades de muestra.**

Los estudios expuestos en Biomedicina demuestran diferencias en el espectro de tejido normal y canceroso, debido a cambios biomoleculares, como por ejemplo, disminuciones en las cantidades de lípidos o el aumento de proteínas. Esto permite el diagnóstico de cánceres, la ventaja aquí es que se puede realizar **“in vivo”**, prometiendo ser una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico precoz de ciertos cánceres como el nasofaríngeo.

Además de estas utilidades, se podrían implementar otras. Al ser una técnica **específica**, permitiría la posibilidad de guardar los espectros de medicamentos originales o falsificaciones más comunes, de tal forma que al analizar el medicamento sospechoso, sólo habría que compararlo con el espectro del original o alguna de las falsificaciones registradas para ver si coincide. Aparte de esta utilidad, también se podría aplicar al cáncer, se podrían recoger los espectros de tejidos sanos (control) y compararlos con los de los pacientes sospechosos. De esta forma, se aceleraría el proceso en ambas aplicaciones.

Otra posible utilidad de esta técnica es en la investigación de los procesos cancerosos. La espectroscopía Raman, nos permite detectar los cambios biomoleculares que se producen, mostrándonos los cambios vibracionales característicos de las células cancerígenas, lo cual sería muy útil en la investigación de ciertos cánceres que todavía no se sabe bien cómo se producen o cómo detectarlos.

Por todas estas ventajas, podemos esperar que en un futuro, esta técnica se acabe implementando, pues como hemos visto en los estudios incluidos en este trabajo, puede ser una alternativa a la utilización de los métodos actuales.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Auner, G. W., Koya, S. K., Huang, C., Broadbent, B., Trexler, M., Auner, Z., ... Brusatori, M. A. (2018). Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(4), 691-717.
2. Bumbrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209-215.
3. Cao, C., Liu, F., Tan, H., Song, D., Shu, W., Li, W., ... Xie, Z. (2018). Deep Learning and Its Applications in Biomedicine. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(1), 17-32.

4. Chalmers, J. M., Edwards, H. G. M., & Hargreaves, M. D. (2012). *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. Hoboken, NJ, Estados Unidos: Wiley.
5. Chisanga, M., Muhamadali, H., Ellis, D., & Goodacre, R. (2019). Enhancing Disease Diagnosis: Biomedical Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering. *Applied Sciences*, 9(6), 1163.
6. Components of a Raman Spectrometer [Internet]. BWTEK. [citado 12 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://bwtek.com/raman-components-of-a-raman-spectrometer/>
7. D'Acunto, M., Gaeta, R., Capanna, R., & Franchi, A. (2020). Contribution of Raman Spectroscopy to Diagnosis and Grading of Chondrogenic Tumors. *Scientific Reports*, 10(1).
8. de Veij, M., Deneckere, A., Vandenabeele, P., de Kaste, D., & Moens, L. (2008). Detection of counterfeit Viagra® with Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(2), 303-309.
9. Ferraro, J. R., Nakamoto, K., & Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy*. Maarsse, Países Bajos: Elsevier Gezondheidszorg.
10. Hawi, S. R., Campbell, W. B., Kajdacsy-Balla, A., Murphy, R., Adar, F., & Nithipatikom, K. (1996). Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy. *Cancer Letters*, 110(1-2), 35-40.
11. How Does a Spectrometer Work? [Internet]. ADMESY. [citado 3 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.admesy.com/how-does-a-spectrometer-work/>
12. Jones, R. R., Hooper, D. C., Zhang, L., Wolverson, D., & Valev, V. K. (2019). Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Research Letters*, 14(1).
13. Kaur, H., Clarke, S., Lalani, M., Phanouvong, S., Guérin, P., McLoughlin, A., ... Schellenberg, D. (2016). Fake anti-malarials: start with the facts. *Malaria Journal*, 15(1).
14. Parlatan, U., Inanc, M. T., Ozgor, B. Y., Oral, E., Bastu, E., Unlu, M. B., & Basar, G. (2019). Raman spectroscopy as a non-invasive diagnostic technique for endometriosis. *Scientific Reports*, 9(1).
15. Sikirzhytski, V., Sikirzhytskaya, A., & Lednev, I. K. (2012). Advanced statistical analysis of Raman spectroscopic data for the identification of body fluid traces: Semen and blood mixtures. *Forensic Science International*, 222(1-3), 259-265.
16. The impact of counterfeit drugs in south and south-east Asia [Internet]. European Pharmaceutical Review. [citado 22 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/92194/the-impact-of-counterfeit-drugs-in-south-and-south-east-asia/>

17. What are the basic principles of Raman Spectroscopy? [Internet]. Andor. [citado 20 de abril de 2020]. Disponible en: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/raman-spectroscopy>
18. What Is Cancer? [Internet]. National Cancer Institute. [citado 21 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>