



**INAOE**

# **Análisis de la similitud molecular entre fármacos y plantas medicinales aplicando espectroscopía Raman**

Por

**Eréndira Vázquez Palacios**

Tesis sometida como requisito parcial para  
obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS Y  
TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**

En el:

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y  
Electrónica**

Diciembre 2019

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

**Dr. Jorge Castro Ramos**

INAOE

**Dra. Hayde Peregrina Barreto**

INAOE

©INAOE 2019

El autor otorga al INAOE el permiso de  
reproducir y distribuir copias de esta tesis en su  
totalidad o en partes mencionando la fuente

*Eréndira Vázquez Palacios*  
6 Dic. 2019





---

# Índice general

---

<b>Índice de Figuras</b>	VII
<b>Índice de Tablas</b>	XI
<b>Abreviaturas</b>	XIII
<b>Agradecimientos</b>	XIX
<b>Resumen</b>	XXI
<b>Abstract</b>	XXIII
<b>Introducción</b>	XXV
<b>1. Planteamientos</b>	1
<b>1.1. Problema de investigación</b> . . . . .	1

---

1.2. Limitantes de la investigación	3
1.3. Preguntas de investigación e hipótesis	4
1.4. Objetivos	4
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>7</b>
2.1. Definiciones teóricas	7
2.1.1. Métodos espectroscópicos	7
2.1.2. Métodos quimiométricos	15
2.1.3. Principios de farmacología	19
2.1.4. Plantas medicinales	24
2.2. Estado del arte (Antecedentes)	25
2.2.1. Espectroscopía Raman en medicamentos	25
2.2.2. Espectroscopía Raman en plantas medicinales	28
2.2.3. Representaciones Dispersas (Sparse) aplicado a espectros Raman	31
2.2.4. Discusión sobre estado del arte	32
<b>3. Metodología propuesta y diseño experimental</b>	<b>33</b>
3.1. Descripción general	33

---

---

3.2. Sitio de estudio	34
3.3. Preparación de las muestras	34
3.3.1. Liofilización	36
3.3.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	37
3.3.3. Extracción con solventes o extracción Soxhlet	39
3.3.4. Preparación de infusiones	40
3.3.5. Preparación de las muestras de fármacos	43
3.4. Obtención de los espectros Raman	44
3.5. Aplicación del algoritmo de Representaciones	
Dispersas	45
3.6. Análisis y comparación de espectros Raman	47
3.7. Resumen	49
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>51</b>
4.1. Resultados	51
4.1.1. Descripción de los datos	51
4.1.2. Obtención y selección de señales elementales	53
4.1.3. Resultados de las pruebas con ruido sintético añadido	56

---

---

4.1.4. Comparación gráfica entre el fármaco y la planta medicinal . . .	57
4.1.5. Asignación de compuestos químicos . . . . .	63
4.2. Discusión de resultados . . . . .	64
<b>5. Conclusiones y trabajo futuro</b>	<b>71</b>
5.1. Conclusiones . . . . .	71
5.2. Trabajo a futuro . . . . .	72
<b>Bibliografía</b>	<b>75</b>

---

# Índice de figuras

---

2.1. Efecto Raman en los distintos estados energéticos vibracionales. [10]	10
2.2. Espectrómetro QE65000 de Ocean Optics.	12
2.3. Interfaz de SpectraSuite.	14
2.4. Proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de nuevos fármacos [31].	20
3.1. Diagrama a bloques de la metodología del proyecto.	35
3.2. Liofilizador LABCONCO.	38
3.3. Extracción por fluidos súper críticos. E1: disolvente CO <sub>2</sub> . E2: disolvente Etanol.	39
3.4. Proceso de extracción con equipo Soxhlet [57].	41
3.5. Infusiones de Milenrama al 30 %, 20 % y 10 % de concentración (de izquierda a derecha respectivamente).	42
3.6. Espectro Raman del compuesto de Ranitidina con subsalicilato de bismuto, tableta sin raspar, es decir, con recubrimiento y tableta rapada, sin recubrimiento.	44
3.7. Diagrama de flujo del algoritmo OMP que se encuentra dentro del proceso del algoritmo Sparse.	48
3.8. Diagrama de flujo de la aplicación del algoritmo Sparse.	49

---

4.1. Pre-procesamiento de los espectros Raman de Milenrama, donde se conserva el intervalo de 200 a 1800 $\text{cm}^{-1}$ y su intensidad es normalizada entre 0 y 1. . . . .	52
4.2. Descomposición de una señal en 127 formas elementales de señal (átomos). . . . .	53
4.3. Átomos del ER de Milenrama con un aporte después de haber pasado por la selección de átomos por "Positivos y negativos" y "Coeficientes de variación". Pasó de tener una descomposición de 127 átomos a solo 11 átomos que representan la información más relevante. . . . .	56
4.4. Señal reconstruida a partir de 11 átomos representativos de la misma, además se usó el filtro de Baseline para remover fluorescencia. . . . .	57
4.5. Comparación de reconstrucción de señales, entre una sin ruido añadido y dos ejemplos de ER con ruido sintético añadido al inicio de las pruebas, a) Espectro Raman de Milenrama sin ruido sintético añadido, b) ER de Milenrama con ruido random, c) ER de Milenrama con ruido "White-Gaussian". . . . .	58
4.6. a) Reconstrucción de ER de Milenrama sin ruido sintético añadido. b) Reconstrucción del ER de Milenrama con filtrado del ruido random. c) Reconstrucción del ER de Milenrama con filtrado del ruido "White Gaussian". . . . .	59
4.7. Comparación de ER de Ranitidina fabricada por laboratorios de patente, genéricos y similares, además el ER del compuesto Ranitidina con subsalicilato de bismuto. . . . .	59
4.8. Comparación gráfica del ER de Ranitidina (sola y compuesta con subsalicilato de bismuto) con el ER de Milenrama. . . . .	60

---



---

4.9. ER de Milenrama comparado con el ER de Ranitidina compuesta con subsalicilato de bismutos, entre los cuales existe un mayor grado de correlación. . . . .	62
4.10. ER de Milenrama donde se identificó la presencia de flavonoides (FI, FII, FIII), taninos (T, GA) y ácido caféicos (CA). La nomenclatura se especifica en la tabla 4.5 . . . . .	63
4.11. ER de Ranitidina donde se identificó la presencia de flavonoides (FI, FII, FIII), taninos (T, GA) y ácido caféicos (CA). La nomenclatura se especifica en la tabla 4.5 . . . . .	66



---

# Índice de Tablas

---

2.1. Métodos de preprocesamiento y quimiométricos aplicados a hierbas medicinales. . . . .	18
3.1. Parámetros de calibración para el software <i>SpectraSuite</i> , así como algunas condiciones ambientales. . . . .	45
4.1. Selección de un umbral para el coeficiente de variación a partir del número de átomos que pasan el umbral y la intensidad que mantienen en su reconstrucción. . . . .	55
4.2. Coeficientes de correlación entre espectros Raman de la planta medicinal Milenrama y ER del fármaco Ranitidina. . . . .	61
4.3. Bandas Raman características de Milenrama y Ranitidina. . . . .	62
4.4. Propiedades medicinales de la Milenrama de acuerdo con sus componentes químicos [60]. . . . .	64
4.5. Raman características de compuestos químicos puros presentes en la Milenrama. . . . .	65



---

# Abreviaturas

---

<b>ER</b>	Espectro Raman
<b>RVP</b>	Ranitidina de patente
<b>RVG</b>	Ranitidina genérica
<b>RVS</b>	Ranitidina de similares
<b>RVSB</b>	Ranitidina con subsalicilato de bismuto
<b>MT</b>	Medicina tradicional
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>Sparse</b>	Representaciones dispersas
<b>HP</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>AP</b>	Ácido-péptica
<b>RS</b>	Espectroscopía Raman (Raman Spectroscopy)
<b>API</b>	Ingrediente activo farmacéutico (Active pharmaceutical ingredient)
<b>AA</b>	Ácido acetilsalicílico
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>IR</b>	Infrarrojo

---

<b>NIR</b>	Infrarrojo cercano (Near infrared)
<b>MIR</b>	Infrarrojo medio (Mid infrared)
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales (Principal component analysis)
<b>SNV</b>	Corrección de variante normal estándar (Standard normal variate correction)
<b>MSC8</b>	Correlación de señal multiplicativa (Multiplicative signal correlation)
<b>LS-SVM</b>	Máquina de vector de soporte de mínimos cuadrados (Least squares support vector machine)
<b>BP-ANN</b>	Red neuronal artificial de propagación inversa (Back propagation artificial neural network)
<b>PLS-DA</b>	Análisis discriminado de mínimos cuadrados parciales (Partial least squares discriminated analysis)
<b>KNN</b>	K-vecino más cercano (K nearest-neighbor)
<b>DPLS</b>	Mínimos cuadrados parciales discriminantes (Discriminant partial least squares)
<b>DA</b>	Análisis discriminante (Discriminant analysis)
<b>SIMCA</b>	Analogía de clase de modelado independiente suave (Soft independent modeling class analogy)
<b>PC-ANN</b>	Red neuronal artificial componente-principal (Principal component artificial neural network)
<b>FIR</b>	Respuesta al impulso finito (Finite impulse response)
<b>WT</b>	Transformada Wavelet (Wavelet transform)
<b>FA</b>	Factor de análisis (Factor analysis)
<b>SVD</b>	Descomposición de valores singulares (Singular value decomposition)
<b>SFE</b>	Extracción por fluidos supercríticos (Supercritic fluid extraction)
<b>ICS</b>	Sociedad internacional de la quimiometría (International Chemometrics Society)
<b>FI</b>	Flavonoide crisina
<b>FII</b>	Flavonoide apigenina

---

- 
- FIII** Flavonoide luteolina
- T** Taninos
- GA** Ácido gálico (Gallic acid)
- CA** Ácido caféico (Cafeid acid)





*Clama a mi, y yo te responderé, y te enseñaré cosas grandes y ocultas que tú no conoces.*

*Jeremias 33:3*



---

# Agradecimientos

---

## **Dios**

Porque mis mejores enseñanzas se encuentran en la Biblia, porque todos los días las maravillas del Universo me sorprenden y me hablan del amor de Dios. Nada habría hecho sino por su gracia que siempre me acompaña.

## **Institución**

Agradezco al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica por ser parte de mi desarrollo académico, por brindarme las herramientas necesarias para crecer en los campos de la investigación, por motivarme y ser mi inspiración en los caminos de la ciencia. A la Universidad Iberoamericana de Puebla, en especial al Dr. Juan Abud y el Dr. Gregorio Romero de la Vega, los cuales me abrieron las puertas a sus instalaciones y laboratorios para realizar actividades relevantes durante mi proyecto de tesis.

## **Profesores**

Al Dr. Jorge Castro Ramos y a la Dra. Hayde Peregrina Barreto por dirigirme, enseñarme y siempre estar al pendiente del proyecto, fue una muy buena experiencia tenerlos de asesores, con su ayuda y dirección todo el trabajo se hizo ligero y me motiva a continuar en el camino de la investigación. Al grupo GIOB: A Paulina Morales por compartirme sus conocimientos en medicina, a Adrián Villanueva, Fabián Villa, Naara

---

González, Freddy Narea, Daniela M. Reynoso, Pablo R. Zamorano, Caroleny Villanueva, Nahúm Chavarría, Martín Torres, quienes siempre gustosos me compartieron sus conocimientos, estos compañeros que además de compañeros de grupo se convirtieron en amigos muy queridos para mí.

### **Familia**

A mi mamá Loyda Deborah Palacios Castellanos por ser mi motor e inspiración, a quien admiro y amo con todo mi corazón, a quien le dedico todos mis logros porque es ella quien me apoya cuando es apenas un sueño, por alentarme y darme seguridad y alegría en momentos difíciles. A mi hermana Vania Deborah por ser mi apoyo, mi respaldo e inspiración, nunca me siento sola si se que cuento ella. A mi tía Albita y mi abuelita Dorita por ser mis cómplices, por desearme siempre lo mejor y por ser fuertes en mi ausencia, tienen todo mi amor.

### **Amigos**

A todos mis amigos, que omito nombres por miedo a olvidar alguno, porque no esperaba encontrar a personas tan maravillosas, personas que un día fueron completos desconocidos y ahora son parte mi familia, incluso unos cuantos se han convertido en parte de mi hogar.

---

# Resumen

---

En esta tesis se propone una metodología donde se compara la composición química de compuestos en común entre el fármaco Ranitidina y la planta Milenrama a través de espectroscopía Raman obteniendo su coeficiente de correlación. Cabe mencionar que ambos tratamientos tienen efecto sobre la enfermedad Ácido-péptica (AP) que es un problema de salud pública en México. Para caracterizar el espectro Raman de la planta medicinal se usó el algoritmo de Representaciones dispersas (Sparse), donde fueron ingresados espectros Raman de Milenrama obtenidos de muestras de la planta que había sido sometida a procesos como: liofilización, extracción por fluidos supercríticos, extracción Soxhlet y la preparación de infusiones, con el fin de obtener sus características principales para que fueran aprendidas por el algoritmo. Posteriormente, se realizaron 4 comparaciones gráficas: Milenrama-Ranitidina de Patente (RVP), Milenrama-Ranitidina genérica (RVG), Milenrama-Ranitidina de laboratorio de similares (RVS) y Milenrama-Ranitidina compuesta con subsalicilato de bismuto (RVSB). El mayor índice de correlación se obtuvo entre la Milenrama y RVSB, con un 0.36 de grado de correlación. Esta tesis atiende a la estrategia sobre medicina tradicional elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2014, donde se resalta la necesidad de promover el uso seguro, eficaz y complementario de la medicina tradicional (MT) a través de la reglamentación y la investigación científica, el apor-

---

te está basado en una metodología que aplica la técnica óptica espectroscopía Raman (RS) y la técnica computacional representaciones dispersas (Sparse) con el fin de analizar una planta medicinal y un fármaco equivalente. Se pretende crear bases para en un futuro poder usar esta metodología con cualquier otra planta medicinal y un fármaco equivalente que se desee analizar, y dejar el camino para desarrollar investigaciones profundas sobre el desarrollo de MT equivalente a los fármacos.

---

# Abstract

---

In this thesis is proposed a methodology to compare the chemical composition between the drug Ranitidine and the Milenrama plant through Raman spectroscopy obtaining its correlation coefficient. It should be mentioned that both treatments have an effect on the acid-peptic disease (AP) that is a public health problem in Mexico. To characterize the Raman spectrum of the medicinal plant, the algorithm of Scattered Representations (Sparse) was used, where Raman Milenrama spectra were obtained from samples of the plant that had been subjected to processes such as: lyophilization, extraction by supercritical fluids, Soxhlet extraction and the preparation of infusions, in order to obtain their main characteristics so that they were learned by the algorithm. Subsequently, 4 graphical comparisons were made: Milenrama- Patent Ranitidine (RVP), Milenrama-Generic Ranitidine (RVG), Milenrama-Ranitidine Laboratory of Similar (RVS) and Milenrama-Ranitidine composite with Bismuth Subsalicylate (RVSB). The highest correlation index was obtained between Milenrama and RVSB, with a 0.36 degree of correlation. This thesis addresses the strategy on traditional medicine developed by the World Health Organization (WHO) in 2014, which highlights the need to promote the safe, effective and complementary use of traditional medicine (MT) through regulation and scientific research, the contribution is based on a methodology that applies the optical technique Raman spectroscopy (RS) and the computational technique scattered representations (Sparse) in order to analyze a medicinal plant and an equiva-

---

lent drug. It is intended to create bases for the future to be able to use this methodology with any other medicinal plant and an equivalent drug that one wishes to analyze, and leave the way to develop deep research on the development of MT equivalent to drugs.



---

# Introducción

---

Este trabajo de investigación atiende a la estrategia sobre Medicina Tradicional (MT) elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2014, donde se resalta la necesidad de promover el uso seguro, eficaz y complementario de la MT a través de la reglamentación y la investigación científica [1], el aporte está basado en una metodología que aplica la técnica óptica de espectroscopía Raman (RS) y la técnica computacional Representaciones Dispersas (Sparse) con el fin de analizar la planta medicinal Milenrama y un fármaco equivalente Ranitidina.

Con RS se puede analizar la composición química de una sustancia con base en sus características moleculares. Hasta ahora no se ha realizado una comparación de Espectros Raman (ER) de fármacos y plantas medicinales, se puede suponer que es necesario que se realice un filtrado especial para la planta medicinal debido a que suele estar compuesta por varias sustancias químicas, cada una con su propia firma espectral. Se pretende crear bases para en un futuro poder usar esta metodología con cualquier otra planta medicinal y un fármaco usados como tratamiento para la misma enfermedad que se desee analizar, y dejar el camino para desarrollar investigaciones profundas sobre el desarrollo de MT equivalente a los fármacos.

La estructura que se siguió para este trabajo de investigación fue la siguiente. En el capítulo 1 se explica el planteamiento del problema, limitantes de la investigación, preguntas de investigación e hipótesis, y objetivos. Seguido del capítulo 2 que com-

---

prende al marco teórico, donde se verán las definiciones teóricas y los antecedentes de esta investigación. El capítulo 3 expone la metodología y diseño experimental que se implementaron. Se continúa con el capítulo 4 donde se muestran los resultados y se presenta una discusión de éstos. Finalmente, el capítulo 5 discute las conclusiones y propone el posible trabajo a futuro.

---

# Capítulo 1

## Planteamientos

---

### 1.1. Problema de investigación

La bacteria gramnegativa *Helicobacter pylori* (HP), identificada en 1982, ahora se reconoce como el factor etiológico primario asociado con el desarrollo de gastritis y enfermedad de úlcera péptica. Además, las infecciones por HP también están asociadas con gastritis crónica, carcinoma gástrico y linfoma gástrico primario de células B [2]. En México, un estudio en población abierta mostró una frecuencia global de infección por la bacteria HP del 66 %, observando que esta frecuencia se fue incrementando a medida que aumenta la edad de las personas con una prevalencia de 67.8 % de HP en pacientes con sintomatología Ácido-péptica (AP), por lo que esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública. [3]

Actualmente se tienen más oportunidades en el sector salud para combatir este tipo de patologías, desde la medicina tradicional con plantas medicinales hasta todo tipo de fármacos están siendo usados cada segundo, sin embargo, es claro que cada una tiene sus ventajas y desventajas, la OMS afirma que la salud pública necesita innovación y tener acceso a productos médicos de buena calidad. [1]

Cada día se tienen más opciones entre los mismos medicamentos gracias a los distintos laboratorios que fabrican medicamentos que tienen la patente, los que se consideran genéricos y los fabricados por los laboratorios de Similares. Algunos factores que se consideran antes de elegir algún producto pueden ser la efectividad, el precio o el acceso que se tenga a esos medicamentos. [4]

Mientras tanto, la MT mexicana ha sido considerada como un factor importante en el tratamiento de cualquier enfermedad, el uso de plantas medicinales no se limita a un solo país, sino que es una práctica común alrededor del mundo.

La organización mundial de la salud define a la MT como “La suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizadas tanto en el mantener la salud como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales”, de acuerdo con estadísticas de la OMS, 80 % de la población de los países en desarrollo recurre a distintos tipos de ellas para satisfacer o complementar sus necesidades médicas, porcentaje que aumenta cada año. [1]

Para continuar con el desarrollo, análisis e innovación de tratamientos médicos basados en medicamentos o plantas medicinales se han usado distintas técnicas de análisis que permiten estudiar su composición química.

Dentro de las cuales comenzaron a destacar las espectroscopías, la aplicación de estas técnicas en hierbas medicinales se reporta desde el 1965, usando longitudes de onda en el rango ultravioleta, visible e infrarrojo. Esos primeros estudios consiguieron obtener la transmitancia, reflectancia y absorbancia de las plantas. [5]

En cuanto a la farmacéutica, se volvió popular la espectroscopía, en especial espectroscopía Raman (RS), porque era una técnica analítica, no invasiva y de bajo costo que permitió encontrar los compuestos químicos presentes en cualquier medicamento. [6]

Esta tesis se propone una metodología donde se comparará el ER del fármaco Ranitidina y el ER de la planta medicinal llamada Milenrama, que tienen efecto sobre la enfermedad Ácido-péptica, con el propósito de comparar la composición molecular de cada tratamiento.

### **1.2. Limitantes de la investigación**

Los ER son sensibles a distintas fuentes de ruido que van desde la fluorescencia hasta el ruido que enmascara la señal Raman y dificulta sus mediciones. Los fármacos, al tener una composición molecular específica y controlada, generan espectros que, aunque pueden ser sensibles al ruido, tienen picos de emisión bien definidos. Por otra parte, la gran cantidad de compuestos químicos que contienen las plantas medicinales provoca que su ER tenga una gran cantidad de picos y que sea más susceptible a las distintas fuentes de ruido, esto puede provocar que algunos de los picos de emisión característicos de las hierbas se encuentren ocultos y que el ER se encuentre montado sobre la curva de fluorescencia. Esto genera un problema al momento de comparar los ER de fármacos y plantas medicinales y por tanto es difícil encontrar similitudes cualitativas y cuantitativas entre ellos.

Es por esto que resulta relevante aplicar técnicas quimiométricas para tener una representación de la señal sin ruido y con sus componentes características presentes, lo cual permita tener una comparación gráfica entre el ER del fármaco y de la planta medicinal incluso poder calcular un coeficiente de correlación, ya que hasta ahora solo han sido estudiadas individualmente sin mostrar una comparación que ayude a crear una línea de investigación científica que estudie si las plantas medicinales pueden ser el equivalente natural de los fármacos.

### 1.3. Preguntas de investigación e hipótesis

- ¿Existirán similitudes cualitativas o cuantitativas entre los espectros Raman de Ranitidina y Milenrama?
- ¿Podrían las plantas medicinales ser un equivalente natural de los fármacos de acuerdo con su composición química?

Mediante el análisis de las propiedades moleculares de fármacos y plantas medicinales, con base en espectroscopía Raman, y utilizando una base de señales entrenadas computacionalmente, es posible identificar los picos de emisión característicos comunes en ambos espectros Raman y obtener una medida de similitud que pueda ser utilizada para corroborar las propiedades moleculares y el uso de la planta medicinal y el fármaco en el tratamiento de la misma enfermedad.

### 1.4. Objetivos

#### Objetivo general

Comparar los componentes moleculares del espectro Raman que contienen la Ranitidina y la hierba medicinal Milenrama usados en el tratamiento de la enfermedad ácido-péptica.

#### Objetivos específicos

- Obtener los espectros Raman de la planta medicinal Milenrama y de Ranitidina de laboratorios de patente, genéricos y similares.
- Establecer una base de espectros Raman asociados a la hierba medicinal Milenrama, mediante el uso de la metodología de Representaciones dispersas.

- Determinar la similitud espectral existente entre la Ranitidina de laboratorios de patente, genéricos, similares y la hierba medicinal Milenrama.





---

## Capítulo 2

### Marco Teórico

---

Durante este capítulo se describe la teoría del fenómeno físico de la ER, el concepto de quimiometría, los objetos de estudio del proyecto que son el fármaco y la planta medicinal, usados en el tratamiento de la enfermedad Ácido-péptica. Se hará mención del estado del arte, donde se verán algunos de los artículos de investigación más relevantes que han precedido a la investigación que se realiza en esta tesis.

#### 2.1. Definiciones teóricas

##### 2.1.1. Métodos espectroscópicos

Los métodos de análisis espectroscópicos se basan en la medición de la dependencia con la longitud de onda de los fenómenos resultantes de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Estos fenómenos pueden ser absorción, re-emisión de luz, esparcimiento, transmisión, reflectancia entre otros.

Debido a las transiciones entre distintos niveles de energía, se obtienen espectros que dan cuenta de la intensidad de energía absorbida o reemitida, con lo cual se puede obtener información de la estructura de la materia, que permite realizar análisis cuali-

tativos y cuantitativos de la muestra bajo estudio, por ejemplo ER.

### 2.1.1.1. Espectroscopía Raman

La espectroscopia Raman (llamada así por Chandrasekhara V. Raman) es una técnica espectroscópica usada en química y física de la materia condensada para estudiar modos de baja frecuencia como los vibratorios, rotatorios, y otros. [7]

Chandrasekhara V. Raman en 1922, utilizó la luz del Sol enfocada a través de un telescopio para lograr una alta intensidad y visualizar la luz esparcida por la muestra. Los primeros espectrómetros como los desarrollados por Raman usaban lámparas de descargas de mercurio como fuente de iluminación y placas fotográficas para detectar la luz. La invención de tubos fotomultiplicadores permitió la colección y manipulación electrónica de la luz detectada. Sin embargo, tenían la desventaja de sólo ser capaces de medir una sola longitud de onda. Los espectrómetros modernos utilizan dispositivos acopladores de carga (CCDs) como los usados en las cámaras fotográficas modernas los cuales son altamente sensitivos, y tienen la capacidad de medir todo el ER de una sola vez. [5]

El efecto de Raman se produce cuando un fotón incide sobre una molécula e interacciona con la nube de electrones de los enlaces de esa molécula.

Cuando una muestra se irradia con una fuente de luz monocromática intensa (generalmente un láser), la mayor parte de la radiación es esparcida por la muestra a la misma longitud de onda que la radiación láser entrante en un proceso conocido como esparcimiento Rayleigh. Sin embargo, una pequeña proporción de la luz entrante (aproximadamente un fotón de un millón) está esparcida a una longitud de onda diferente a la entrante ya que se desplazó desde la longitud de onda del láser original, es decir, el campo eléctrico del rayo láser eleva la energía del sistema por un instante al inducir una polarización en la especie química. La condición polarizada no es un verdadero estado

de energía y se conoce como un "estado virtual". La relajación del estado virtual ocurre casi instantáneamente y es predominantemente al estado base inicial. Este proceso da como resultado el esparcimiento Rayleigh, que es luz esparcida de la misma longitud de onda que el láser de excitación. La relajación del primer nivel vibratorio excitado da como resultado un cambio de Stokes-Raman. La luz esparcida del cambio Stokes-Raman es de menor energía (longitud de onda más larga) que la luz láser. Además, la mayoría de los sistemas tienen al menos una pequeña población de moléculas que se encuentran inicialmente en un estado vibratorio excitado. Cuando el proceso Raman se inicia desde el nivel vibratorio excitado, es posible la relajación al estado fundamental, produciendo un esparcimiento de energía más alta (longitud de onda más corta) que la de la luz láser. Este tipo de esparcimiento se llama esparcimiento Raman anti-Stokes.

[8]

Las moléculas se trasladan, rotan y sus átomos vibran. La vibración es muy compleja, pero la teoría del movimiento oscilatorio ha permitido deducir que puede considerarse la combinación de varios movimientos vibratorios muy simples, dependiendo de la complejidad de la molécula.

Debido a estos movimientos, cada molécula tiene una cierta energía de vibración, pero esta energía puede variar absorbiéndose fotones de la región del infrarrojo. Cuando se absorbe energía la molécula se dice que pasa a un estado de vibración superior en el que los modos de vibración no varían, ni sus frecuencias, pero sí la amplitud de la vibración. [9]

La molécula pasa del estado de vibración fundamental a un estado excitado. Las moléculas se polarizarán en dirección del campo eléctrico que se les hace incidir, pero sin cambiar de nivel electrónico (figura 2.1).

### ***Ruido en espectros Raman***

Los fenómenos aleatorios tienen su base en la naturaleza del orden físico y limitan

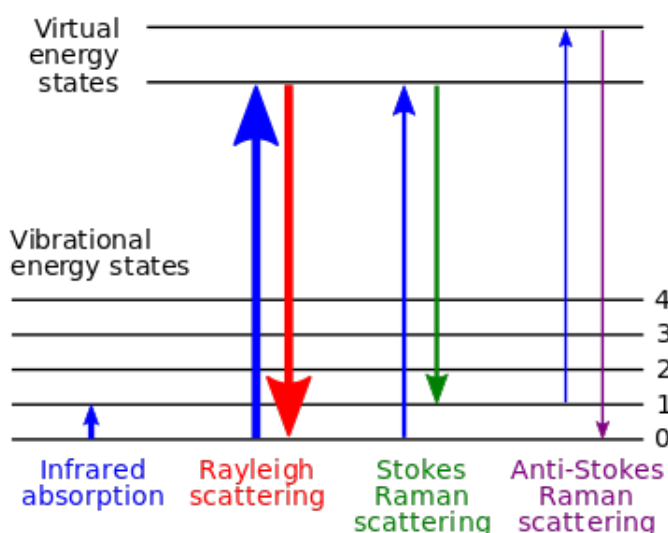


Figura 2.1: Efecto Raman en los distintos estados energéticos vibracionales. [10]

el rendimiento de muchos sistemas, incluidos los sistemas electrónicos y de comunicación, en un nivel atómico que es de carácter aleatorio. Este comportamiento aleatorio conduce, en un nivel macro, a variaciones no deseadas en las señales(ruido). Se puede clasificar al ruido en general en dos grupos principales [11]:

- Ruido interno o inherente: generado por dispositivos electrónicos (ruido térmico, ruido por cuantización de cargas, ruido por semiconductor, etc.). Es de naturaleza aleatoria.
- Ruido externo o interferencia: corresponde al acoplamiento eléctrico, magnético con otro punto del sistema, o con condiciones naturales (tormentas, ruido cósmico, etc.), o equipos cercanos (motores, cableado, etc.). Puede ser periódico, intermitente o aleatorio.

Uno de los problemas inherentes a la adquisición de cualquier señal es el ruido presente en la medición. En el caso de la obtención de espectros Raman los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos diferentes [12]:

1. Ruido de disparo: fluctuaciones aleatorias de la corriente eléctrica a través, de un conductor, causada por el transporte de cargas discretas.
2. Ruido generado por la muestra: emisiones ópticas no deseadas y generadas por la propia muestra como es el caso de la fluorescencia.
3. Ruido generado por la instrumentación: este tipo de ruido incluye los ruidos introducidos por el detector como el ruido térmico, el ruido de lectura que es la dependencia de la eficiencia cuántica del detector con la longitud de onda.
4. Ruido computacional: se refiere al introducido en el proceso de digitalización de la señal de salida del detector.
5. Ruido generado por fuentes externas: generalmente es causado por alguna fuente de luz externa, partículas de alta energía como los rayos cósmicos que llegan al detector del equipo.

### ***Espectrómetro***

El espectrómetro utilizado en el sistema es el QE65000 de Ocean Optics el cual tiene una alta sensibilidad a la luz IR [7]. A continuación, se mencionan sus principales características:

- Detector CCD Hamamatsu S7031 1006 con 1044 x 64 pixeles.
- ADC (Convertidor analógico digital) de 16 bits.
- Intervalo de medición: 200-1200nm.
- Tiempo de integración: 8ms – 10ms.
- Resolución óptica: 2nm.
- Bajo consumo de potencia: 250mA 5V DC

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

---

- Interfaces: USB 2.0 High Speed (480 Mbps), RS-232(115Kbaud), SPI e I2C.
- Rendija de entrada: 1mm
- Cuenta con un TEC (Termo Electric Cooler) para mantener baja la corriente oscura.
- Dimensiones: 182 mm x 110 mm x 47 mm.
- Peso: 1.18 kg

Los elementos que componen el espectrómetro utilizado se muestran en la figura 2.2 así como la descripción de cada uno de ellos.

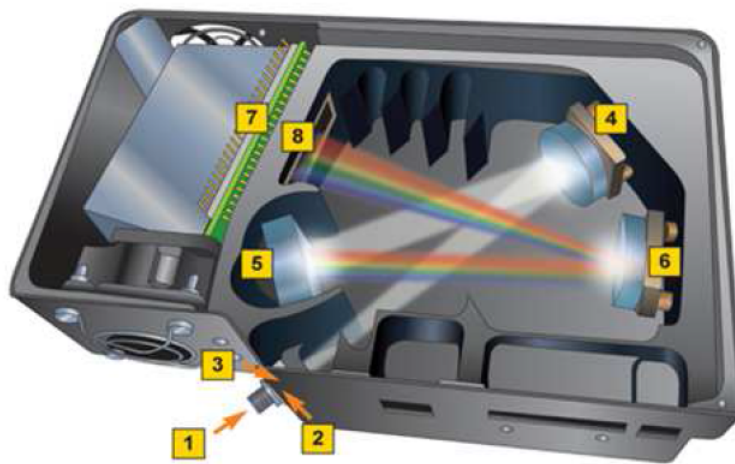


Figura 2.2: Espectrómetro QE65000 de Ocean Optics.

1. Conector Universal estandarizado (SMA) para la conexión del canal de lectura de la fibra óptica.
2. Abertura por la cual la luz entra al espectrómetro. Su ancho afecta directamente a la resolución espectral del espectrómetro.
3. Filtro de absorción, se utiliza para restringir la radiación en cierta longitud de onda y eliminar efectos de segundo y tercer orden.

4. Espejo colimador, tiene por objetivo hacer que la luz divergente proveniente de la ranura de entrada se convierta en un haz de luz paralelo, para que posteriormente incida de esta forma en la rejilla de difracción.
5. Red o rejilla de difracción, descompone la luz proveniente del espejo colimador en sus distintas longitudes de onda. La correcta selección de la rejilla de difracción dependerá la resolución espectral y el intervalo de longitudes de onda a cubrir y por lo tanto el tipo de aplicaciones posibles del instrumento.
6. Espejo de enfoque, ubicado frente al detector, es el encargado de reflejar y focalizar el haz de luz ya difractado en el arreglo lineal de detectores.
7. Arreglo lineal de CCD el cual capta la luz proveniente del espejo de enfoque. Cada píxel del arreglo responde a una zona del espectro y crea una respuesta digital. Los datos digitales son enviados a la computadora para poder visualizarlos en una pantalla. Este arreglo cuenta con un enfriador TE que mantiene la temperatura del detector.
8. Filtro clasificador de orden de paso variable (OFLV), diseñado para eliminar los efectos de segundo y tercer orden en el espectro.

### ***Resolución del espectrómetro***

La resolución óptica del espectrómetro depende del número de ranuras por milímetro que tiene la rejilla de difracción y del diámetro de la ranura de entrada (slit).

Hay que considerar dos puntos importantes:

1. La resolución aumenta con el incremento en el número de ranuras de la rejilla, pero esto a expensas del intervalo espectral.

2. La resolución aumenta conforme disminuye el ancho de la ranura del slit o con la disminución del diámetro de la fibra óptica, pero a expensas de la intensidad de la señal.

### *Software de visualización de espectros Raman*

El Software que maneja el espectrómetro QE65000 es SpectraSuite Spectrometer Operating Software y es ahí donde se visualiza la señal (fig 2.3) y se varían los parámetros para mejorar el análisis de los espectros obtenidos.

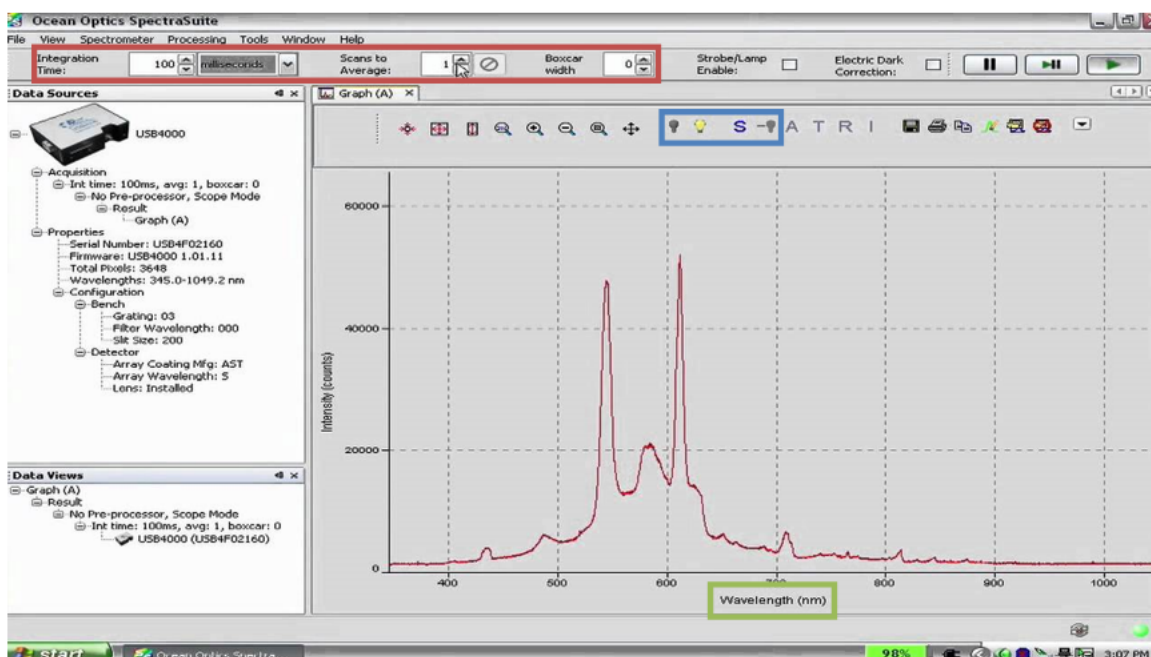


Figura 2.3: Interfaz de SpectraSuite.

**Acquisition toolbar:** Existen parámetros que pueden ser cambiados para mejorar el espectro estudiado.

- **Time Integration:** se refiere al tiempo durante el cual se recogen los fotones en el conjunto de CCD; que es algo así como la velocidad del obturador de una cámara.
- **Scans to average:** debido a que uno puede tomar un espectro en milisegundos, el software puede promediar espectros y mostrar la media, lo que reduce el ruido.



- **Boxcar width:** esta opción es otra forma de reducir el ruido y suavizar el espectro. Hay 3648 fotodiodos de la matriz -que es 3648 longitudes de onda- lo que significa que se obtiene unos 5 puntos por nm. SpectraSuite le permite suavizar el espectro tomando un *Boxcar Width* de un número de puntos adyacentes.

**Control y adquisición:** Aquí es donde se guarda el espectro oscuro al dar un clic en el icono oscuro con forma de bombilla ubicado encima de la gráfica. Este paso almacena una señal de espectro que muestra para cada longitud de onda de la luz sin llegar al detector. Puede ver que el espectro oscuro no es exactamente a cero; después de un clic en el icono que tiene un signo menos delante de una bombilla de luz oscura se observa que se deja la señal en cero y ahora se abre el detector para comenzar la medición de la muestra.

**Unidad de medida:** El tipo de señal con la que se puede trabajar es el desplazamiento Raman cuya unidad de medida es  $cm^{-1}$ .

### 2.1.2. Métodos quimiométricos

La complejidad de los datos obtenidos de técnicas espectroscópicas hace que no puedan ser evaluados fácilmente, para ello se necesitan técnicas de procesamiento de datos especiales que pueda ser útil para el análisis cuantitativo y cualitativo e incluso para tener un esclarecimiento estructural. En la adquisición de datos es necesario tener en cuenta las interferencias instrumentales, la corrección en el desplazamiento de la retención del tiempo, selectividad, dimensionamiento y precisión. En el 2014, la International Chemometrics Society (ICS) define la quimiometría como la ciencia de relacionar las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico con el estado del sistema mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos [13]. Con el avance tecnológico computacional la quimiometría se ha convertido para la comunidad

científica en herramientas de rápido análisis de resultados mediante algoritmos.

Las técnicas computacionales que se estaban usando con mayor frecuencia tenía que ver con el Análisis de Componente Principales (PSA) y algoritmos de reconocimiento de patrones para poder clasificar espectros Raman. [14] Incluso algunos trabajos recurrieron a utilizar softwares que permiten identificar materiales, clasificarlos y encontrar características principales de los datos obtenidos de las técnicas de espectroscopía de infrarrojo, espectroscopía NIR y Raman, por ejemplo, un software llamado OPUS/IDENT.

Como se mencionó en el artículo [15] el análisis quimiométrico fue aplicado a muestras agrupadas, con esto lograron agrupar eficientemente cuatro tipos de Ginseng, concluyendo que la aplicación de métodos espectroscópicos combinado con un análisis quimiométrico es efectivo para la identificación de hierbas medicinales.

Era sabido que la espectroscopía, una técnica analítica no destructiva, integrada con un análisis quimiométrico era una poderosa herramienta para los procesos analíticos en la industria farmacéutica y pronto se convirtió en una técnica popular complementaria para el análisis de hierbas medicinales.

En el 2015 se reportó el uso de las técnicas de procesamiento de señales de hierbas medicinales más comúnmente usadas hasta ese momento, junto con los preprocesamientos, obtenidas de la técnica espectroscopía de infrarrojo cercano [16], y se llegó a la conclusión que la espectroscopía en combinación con métodos quimiométricos se podría emplear en la autenticación y el control de calidad de los medicamentos a base de plantas. En la tabla 2.1 se muestra la revisión de diferentes métodos computacionales para el análisis de espectros. Se tienen las siguientes siglas: SNV (corrección de variante normal estándar), MSC8 (correlación de señal multiplicativa), LS-SVM, (máquina de vector de soporte de mínimos cuadrados), BP-ANN (red neuronal artificial de propagación inversa), PLS-DA, (análisis discriminado de mínimos cuadrados

parciales) , KNN (K-vecino más cercano), PCA (análisis de componentes principales), DPLS (mínimos cuadrados parciales discriminantes), DA (análisis discriminante), SIMCA (analogía de clase de modelado independiente suave), PC-ANN (red neuronal artificial componente-principal). El potencial bidimensional (2D) de correlación espectroscopía NIR para discriminar las regiones geográficas *Fructus Lycii* no fue incluido en la tabla: a) Discriminación aceptable y b) Discriminación moderada.

Como se mencionó anteriormente, diversos algoritmos han sido propuestos para realizar análisis quimiométricos. Un algoritmo que se ha usado para identificar características cualitativas y cuantitativas para las señales obtenidas de métodos espectroscópicos se llama Sparse el cual tiene su fundamento en las representaciones dispersas propuestas por Michael Elad en 2010 [30].

Sparse permite realizar una descomposición de cualquier señal analizada en sus características más elementales, es decir, se obtienen sus señales elementales. Para fines ilustrativos, si se sigue la analogía de la teoría molecular, un átomo es la parte indivisible de la materia o de cualquier molécula, en el caso de Sparse los átomos son equivalentes a las señales elementales, la cual representa a la parte que no se puede descomponer en más de una señal. Si se tiene una señal de entrada y se descompone en sus átomos o señales fundamentales, posteriormente la suma lineal de estos átomos será igual a la señal de entrada. Esta capacidad de obtener las características fundamentales de una señal permite que se pueda seleccionar las lo que se desea considerar en la reconstrucción de la señal y también aquello que se desea eliminar, más adelante en la sección 2.2.3 se mencionarán algunas aplicaciones de este algoritmo a espectros Raman.

## CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

Hierba Medicinal	Rango Wavelength (cm <sup>-1</sup> )	Métodos de preprocesamiento	Método quimiométrico	Discriminación correcta (%)	Referencia
<i>Rhizoma Corydalis</i>	4000-10000	Wavelt transform	LS-SVM Radial BP-ANN PLS-DA KNN	85-100	[17]
	4011-5114	SNV +1 <sup>st</sup> derivative	PCA	b	
<i>Ganoderma lucidum</i>	6996-7629	SNV +2 <sup>nd</sup> derivative	DPLS	100	[18]
	-	SNV +1 <sup>st</sup> derivative	DA	97	
<i>Angelicae gigantis Radix</i>	5882-6668	2 <sup>nd</sup> derivative	SIMCA	100	[19]
<i>Carthami Flos</i>	4000-10000	2 <sup>nd</sup> derivative	DA	88-100	[20]
<i>Glycyrrhizia uralensis Fisch</i>	4500-8500	MSC +1 <sup>st</sup> derivative	PCA SIMCA	c b	[21]
<i>Radix Salvia multiorrhiza</i>	4000-10000	MSC+1 <sup>st</sup> derivative +Savitzky-Golay smoothing	DA	100	[22]
<i>Scrophulariae Radix</i>	4000-10000	1 <sup>st</sup> derivative	PCA	b	[23]
<i>Scutellariae Radix</i>	4000-1000	SNV+2 <sup>nd</sup> derivative +Savitzky-Golay smoothing	DA DPLS	92-94 100	[24]
<i>Peucedanum</i>	3500-8500	1 <sup>st</sup> derivative +autoscale	PC-ANN	100	[25]
<i>Fructus forsythiae</i>	4100-11000	1 <sup>st</sup> derivative +Norris smoothing	DA	97	[26]
<i>Codonopsis pilosula</i>	7503-6904 5106-4017	SNV +1 <sup>st</sup> derivative	Random forest KNN	94	[27]
<i>Lonicerae Japonicae Flos</i>	4100-10000	SNV +2 <sup>nd</sup> derivative	SIMCA	b	[28]
<i>Paeoniae Radix</i>	4000-10000	MSC +1 <sup>st</sup> derivative	PCA	b	[29]

Tabla 2.1: Métodos de preprocesamiento y quimiométricos aplicados a hierbas medicinales.

### 2.1.3. Principios de farmacología

La farmacología es el estudio de las sustancias que interactúan con los sistemas vivos a través de procesos bioquímicos. Y un fármaco, en el sentido más general, puede definirse como una sustancia activa capaz de producir un cambio en la función biológica a través de sus acciones químicas.

El análisis cuidadoso indica que casi todos los nuevos fármacos se originan en investigaciones realizadas en instituciones del sector público (universidades, institutos de investigación). No obstante, dada la inversión necesaria de recursos económicos y la necesidad de tener un acceso eficiente y la interacción de múltiples recursos tecnológicos, la mayor parte de los nuevos fármacos se produce después en compañías farmacéuticas. Las crecientes exigencias regulatorias y litigios en cuanto a toxicidad de un fármaco ya aprobados, han elevado aún más el costo del desarrollo de nuevos fármacos. Solo 10 a 15 % de los nuevos compuestos que reciben aprobación para su comercialización representa avances importantes en seguridad y eficacia; los restantes son solo variantes moleculares (fármacos genéricos o congéneres) de los fármacos con patente más vendidos.

#### 2.1.3.1. Fases de estudio

Cualquiera que sea la fuente o la idea clave que condujeron al descubrimiento de una molécula apta para un fármaco, estudiarla supone una secuencia de experimentación y caracterización llamada valoración del fármaco. Se utilizan diversos análisis en los cuales se evalúan los planos: molecular, celular, orgánico, sistémico y un animal para definir la actividad y la selectividad de un fármaco. Estos ensayos llevan aproximadamente 10 años de investigación. Figura [2.4](#).

Cuando un compuesto satisface las pruebas farmacológicas, toxicológicas y bio-

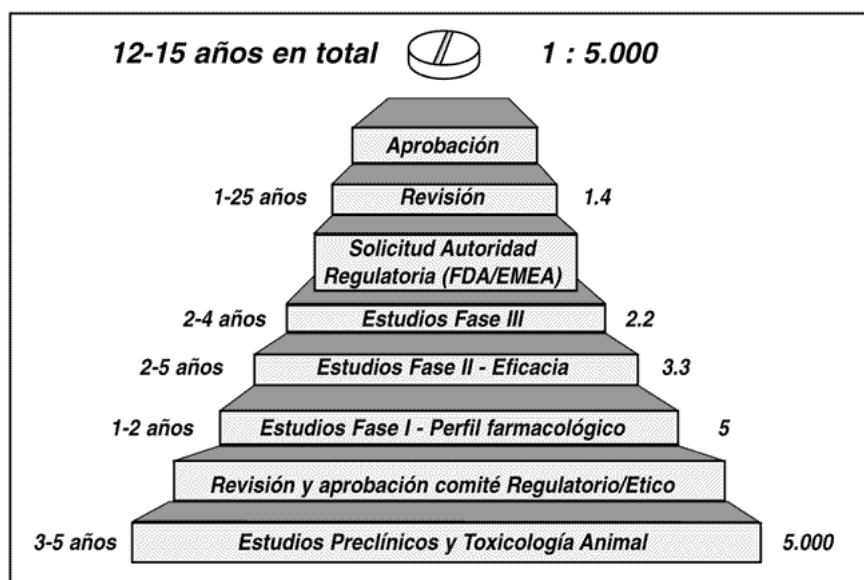


Figura 2.4: Proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de nuevos fármacos [31] .

químicas realizadas durante la investigación preclínica, el fármaco se debe evaluar por las agencias regulatorias como la Secretaria de Salud en México, a través de COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios), la FDA (Food and Drug Administración) en Estados Unidos, la EMA (European Medicines Agency) en la Comunidad Europea; la MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) en Japón, un expediente (dossier en inglés) que describe completamente y con detalle los resultados de los estudios preclínicos. Dicho documento tiene como propósito obtener la aprobación gubernamental para realizar los ensayos clínicos con el nuevo fármaco.

De ser aprobado por la agencia regulatoria correspondiente a la jurisdicción en donde se valora el expediente, le asignan al nuevo fármaco una aplicación que por ejemplo en la FDA denominan IND (Investigational New Drug Application) que autoriza al patrocinador, generalmente una compañía farmacéutica, a realizar los estudios clínicos. Cuando un fármaco nuevo posee la autorización gubernamental para su investigación en humanos, se inicia el estudio clínico a través de las fases de investigación I, II, III y IV. Por lo general se necesitan cuatro a seis años de pruebas clínicas para

acumular y analizar todos los datos necesarios. Figura 2.4.

### 2.1.3.2. Versiones de los fármacos

Patente: una *patente*, es el nombre comercial del propietario del fármaco y por lo regular se registra; ese nombre registrado puede protegerse en términos legales mientras se utilice. Un medicamento de marca o de patente, es un medicamento nuevo que fue sometido a todos las fases de evaluación y estudios clínicos antes mencionados.

Después de la expiración de la patente, cualquier compañía farmacéutica puede producir el fármaco, presentar una solicitud abreviada del nuevo fármaco, demostrar una equivalencia necesaria y recibir la aprobación pertinente; para así poder comercializar un producto genérico sin tener que pagar regalías de autorización.

Genérico: un fármaco genérico es "todo medicamento que tenga la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica, y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia (de patente) haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad". Sin embargo, el laboratorio genérico solo asume costes de producción y de investigación de la bioequivalencia, pero no los de la fase investigación de desarrollo del fármaco. Por ello, no se puede afirmar que la composición y efecto sean iguales. Por otro lado, no todos los genéricos aplican las mismas prácticas de fabricación y controles de calidad. Los genéricos que cuentan con el respaldo de una compañía farmacéutica consolidada, marcaran esta diferencia.

La *bioequivalencia* compara las concentraciones de la sustancia activa en sangre y la velocidad con la que llega, al administrar el medicamento genérico y el original, cuyo resultado es un fundamento científicamente sólido. Si un medicamento se comercializa por su denominación genérica y demuestra ser bioequivalente con el original correspondiente, la Secretaria de Salud le concede la clasificación de medicamento genérico intercambiable o GI.

Similares: es necesario señalar que los medicamentos genéricos intercambiables son distintos a los genéricos de "tienda". Los genéricos de "tienda" son manufacturados por varios fabricantes y no siempre cuentan con la certificación del genérico intercambiable, debido a que no se han realizado pruebas de bioequivalencia.

En México y algunos países de Centro y Sudamérica existen medicamentos denominados "similares", con características semejantes a los genéricos de "tienda" y que tampoco han demostrado ser intercambiables con los originales. De hecho, son comercializados en farmacias exclusivas para estos productos y carecen del logotipo de genérico intercambiable.

Se ha señalado que un medicamento similar o copia es un producto farmacéutico fuera de patente y que no ha probado ser bioequivalente al producto original, también se le llama no bioequivalente, se puede vender bajo nombre de marca o con denominación genérica [32]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), utiliza el término de multiorigen para los productos farmacéuticos equivalentes que pueden o no ser equivalentes terapéuticos, los productos multiorigen que son terapéuticamente equivalentes son intercambiables (GI).

El hecho de que existan medicamentos que se expenden con su nombre genérico, por un consorcio de empresas que tradicionalmente vendían solo al sector público y que ahora han abierto una gran cadena de distribución en el mercado privado, reproduce los vicios que se tuvieron y persisten en el sector. Estos vicios son los de abaratar el costo del producto final a como dé lugar, en aras de sacrificar, muchas veces, incluso la calidad del producto mismo. Esta política de contención de precios no contempla más que la existencia del producto a bajo costo con un margen de ganancia razonable.

En años pasados se efectuó una serie de pruebas de calidad a productos que provenían de las farmacias similares, cuyos hallazgos no fueron divulgados a solicitud de las autoridades sanitarias, porque mostraban productos de calidad heterogénea, que



en más de 50 % de los casos no cumplían ni siquiera con las especificaciones de la Farmacopea Nacional. En la actualidad, a algunos de los productos "similares" se les efectuaron las pruebas de intercambiabilidad, por lo que se les ha dado el registro de genéricos intercambiables; pero esto es solo una estrategia, en la cual si se tiene mil medicamentos y de éstos se certifican cinco como genéricos intercambiables, le permite anunciarse por medio de la parte mediática y decir que en Farmacias de Similares se cuenta con genéricos intercambiables, por lo que la calidad de los productos ofrecida es buena y derivar de estos cinco al resto de los 995 esta misma condición [33].

### 2.1.3.3. Fármaco objeto de estudio (Ranitidina / Ranitidina con subsalicilato de bismuto)

Desde 1985, se reconoce la relación de la bacteria HP en el origen y persistencia de la enfermedad péptica ulcerosa y en las gastritis [34]. Se han ensayado múltiples tratamientos para su erradicación. La ranitidina se combina con bismuto (actúa como un antibiótico) como sal citrato (citrato de ranitidina bismuto), para tratar infecciones de *Helicobacter pylori* [35]. Antagoniza los receptores  $H_2$  de la histamina de las células parietales del estómago. Inhibe la secreción estimulada y basal de ácido gástrico y reduce la producción de pepsina.

En adultos: úlcera duodenal; úlcera gástrica benigna; s. de Zollinger-Ellison; profilaxis de la hemorragia recurrente en pacientes con úlcera sangrante; esofagitis péptica y tratamiento de los síntomas asociados; profilaxis de hemorragia gastrointestinal debida a úlceras de estrés en enfermos graves; en el preoperatorio, en pacientes con riesgo de síndrome de aspiración ácida (síndrome de Mendelson), especialmente pacientes obstétricas durante el parto. En niños: tratamiento a corto plazo de úlcera péptica y tratamiento de reflujo gastroesofágico, incluyendo esofagitis por reflujo y alivio sintomático del reflujo gastroesofágico. [36]

### 2.1.4. Plantas medicinales

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta.

En México la MT, como toda institución social, ha cambiado en el curso de los siglos, interactuando con otros modelos terapéuticos para conformar lo que llamamos el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad. Asociada fuertemente a las plantas medicinales -su recurso más abundante, accesible y conocido-, la medicina tradicional es mucho más que botánica medicinal y tiene una gran riqueza y diversidad.

#### 2.1.4.1. Planta objeto de estudio: Milenrama

La planta medicinal *Achillea millefolium*, comúnmente conocida como Milenrama, ha sido objeto de estudio debido a su frecuente uso como tratamiento alternativo en diferentes enfermedades gastrointestinales. Las propiedades farmacológicas de *A. millefolium* la proponen como un fármaco natural para usos clínicos en diferentes patologías, entre las que se encuentran: inflamación, cáncer, dispepsia, infecciones bacterianas, virales, parasitarias, helmintos, etc. [37]

Se realizó un estudio [2] para probar que plantas medicinales tenían mejor acción contra la HP. Se realizaron experimentos in vitro de extractos de metanol de 24 especies de plantas contra 15 cepas de HP. Uno de los extractos de metanol más activos fue la milenrama, se ha utilizado en todo el mundo en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

En otro estudio, se evaluó el efecto de plantas medicinales seleccionadas sobre la secreción de interleucina-8 (IL-8) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en un intento por racionalizar su uso medicinal y examinar el efecto antiinflamatorio y citoprotector en las células epiteliales gástricas [38]. Se utilizaron células AGS y cepa de *Helicobacter pylori* (193C) clínicamente aislada para experimentos de cocultivo. La actividad anti-*Helicobacter pylori* y los efectos citotóxicos de las plantas seleccionadas se determinaron mediante un método de dilución en serie y un ensayo de fragmentación de ADN, respectivamente. Entre las plantas examinadas contra la generación de ROS, *Achillea millefolium* demostraron una supresión significativa de ROS de las células infectadas por HP.

Entre los estudios que se han realizado sobre la Milenrama han destacado en distintos experimentos los componentes químicos que contiene, a pesar de esto, se deben continuar realizando estudios adicionales que permitan crear un escenario científico completo sobre las propiedades medicinales sobre esta planta y su aportación farmacológica. [37]

Este estudio presenta el espectro Raman de la planta *Achillea millefolium* con el fin de complementar la información reportada acerca de la Milenrama, desde un estudio que no se había realizado anteriormente.

## **2.2. Estado del arte (Antecedentes)**

### **2.2.1. Espectroscopía Raman en medicamentos**

En las primeras aplicaciones de la técnica de espectroscopia Raman se tuvo especial atención en su alta sensibilidad y especificidad. Desde el año 2000 se realizaron estudios de medicamentos con RS [39], que demostraron que se podían identificar com-

puestos activos presentes en tabletas incluso si el compuesto activo estaba presente solo en un 1 % de la masa total.

Las aplicaciones en el área farmacológica comenzaron, y dos años después surgió una publicación de un artículo [40] donde se explicaba que se podía tener un control en la calidad del clorhidrato de ranitidina, el cual existe como dos polimorfos (formas I y II), identificando impurezas polimórficas presentes de hasta menos de 2 %.

Dada la utilidad de la técnica ER en el área farmacéutica, se comenzó a utilizar para estudiar ciertos parámetros importantes para la obtención de espectros Raman de medicamentos, como la longitud de onda de excitación del láser. En 2006 se realizó un estudio [41] con longitudes de onda desde 244nm hasta 785nm, sobre cuatro fármacos: paracetamol, paroxetina y ranitidina (formas polimórficas I y II) para observar el efecto que este parámetro tenía al momento de realizar las mediciones. Se reportó que las mediciones obtenidas usando infrarrojo mostraba baja fluorescencia (ruido típico en ER) mientras que las mediciones realizadas con UV tenían dos serías desventajas: las muestras experimentaban fotodegradación y la sensibilidad de la técnica se reducía solo a cromóforos rígidos, no permitiendo a esta longitud de onda diferenciar polimorfismo en muestras, a comparación de las longitudes de onda en el orden de los infrarrojos e infrarrojos cercanos. Esto permitió entender la importancia y las ventajas de usar espectroscopía Raman, caracterizado por usar longitudes de onda en el orden del infrarrojo, por sobre otras técnicas que usaban otras longitudes de onda.

En el año 2011, se estudiaron Ácido Acetilsalicílico, Paracetamol e Hidrocloruro de Fluoxetina en su versión de patente y genérica mediante RS [42]. Se concluyó que las firmas espectrales de ambas presentaciones eran casi idénticas lo que indica que los compuestos activos y los excipientes, eran iguales. También se reconoció que no existía una base de datos de espectros Raman de referencia que permitiera la identificación analítica de fármacos. Cabe mencionar que la carencia de una base de datos de espectros

Raman sigue siendo un problema científico y económico, ya que los softwares que se han desarrollado para la identificación de compuestos químicos en espectros Raman no son de libre acceso.

Se reportó un estudio realizado con Ácido Acetilsalicílico fabricado por cinco laboratorios diferentes [14], donde se determinó las concentraciones y diferencias en las soluciones de compuestos orgánicos e inorgánicos, combinando la técnica de ER con el algoritmo de Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés). Siendo uno de los primeros artículos que aprovecharían la especificidad de la técnica para combinarlo con un análisis computacional complementario, aplicado al área de farmacología. Concluyeron que es posible encontrar diferentes concentraciones de principio activo, así como el uso de diferentes vehículos y excipientes aplicando la ER y el análisis multivariado.

En [43], se propuso desarrollar y aplicar metodologías para la determinación de principios activos a baja concentración así como cuantificar con ER el ingrediente activo farmacéutico. Midieron los ER de las tabletas pulverizadas y compactadas y se usó el coeficiente de correlación como medida, con el fin de determinar la homogeneidad del componente activo en la tableta. De lo cual concluyeron que ER es una técnica rápida y útil para comprobar que el API (por sus siglas en inglés, Ingrediente Activo Farmacéutico) se encuentre en toda la tableta.

Desde el año 2013 la popularidad de la técnica Espectroscopía Raman (RS) ha dado lugar a artículos que resumen la teoría y las aplicaciones de la misma, en áreas como la farmacéutica y biológica [44]. En 2015 se realizó una revisión [6] de la técnica de ER, caracterizada por ser analítica y no-invasiva, útil para el desarrollo farmacéutico de fase temprana y tardía. El análisis de procesos y el análisis microestructural de los sistemas de administración de fármacos y su potencial aplicación en diversas áreas biomédicas, diseño de sistemas innovadores de administración de medicamentos y con-

trol de calidad de productos terminados.

En 2016, un estudio [45] mostró la fácil aplicación de RS para identificar la presencia de medicamentos en suero sanguíneo. Analizaron los medicamentos: Ácido Acetilsalicílico (AA), Ibuprofeno, suero sanguíneo con AA y suero sanguíneo con ibuprofeno. De lo cual observaron algunas frecuencias Raman como  $639.99\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a CH,  $1428\text{ cm}^{-1}$  característico de CH<sub>3</sub>, y la frecuencia de  $1623\text{ cm}^{-1}$  a C=C que son las regiones compatibles de la aspirina o ácido acetilsalicílico con fórmula química de  $C_9H_8O_4$  y suero sanguíneo. Corroborando que la técnica Raman es una técnica factible para detectar la presencia de medicamentos, componentes químicos y/o diversas sustancias.

### 2.2.2. Espectroscopía Raman en plantas medicinales

La interacción de plantas con energía radiante ha sido de interés en diferentes áreas como botánica, geografía, biofísica, bioquímica, ecología, hidrología, agronomía, y otros. La aplicación de técnicas espectroscópicas en hierbas medicinales se ha hecho desde el año 1965, cuando se estudiaron propiedades espectrales en hojas y tallos usando longitudes de onda en el rango ultravioleta (UV), visible e infrarrojo (IR). Los primeros estudios consiguieron obtener la transmitancia, reflectancia y absorbancia de las plantas [5], demostrando que se podía obtener información relevante a partir de las propiedades ópticas de las plantas.

Tradicionalmente el estudio de las hierbas medicinales se llevaba a cabo de acuerdo con su morfología, identificación o cuantificación de compuestos con cromatografía, sin embargo, esto era inútil para la autenticación y discriminación de su origen geográfico. De acuerdo con una revisión bibliográfica [46] se determinó que el uso de nuevas técnicas como son la espectroscopía vibratoria, que incluye NIR, IR medio y Raman, ofrece un análisis de autenticación de la medicina herbal que permite tener no solo

información sobre su composición química además esta información puede ser analizada con algoritmos computacionales que permiten clasificar de acuerdo a su origen geográfico.

En el 2002, la técnica de espectroscopía Raman fue considerada para caracterizar Mentas negras (*M. piperita* L. nm. *citrata*, *M. piperita* L. var. *pallescens pallescens*, and *M. piperita* L. var. *piperita* f. *piperita*) y mentas verdes (*M. spicata* L. ssp. *crispata* and *M. spicata* L. ssp. *spicata*), debido a que era una planta taxonómicamente compleja, su género presenta 18 especies y cientos de subespecies, la precisión que la técnica ofrece permitió caracterizar varias especies y subespecies, así como variaciones en ciertos datos. [47]

Para el 2005, las aplicaciones de espectroscopía Raman en plantas medicinales ya era considerado común junto con otras técnicas espectroscópicas, así como se había hecho en el pasado. Un artículo reportó el estudio de plantas aromáticas y medicinales (*Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha x piperita*, *Salvia officinalis*, *Origanum marjorana*, *Thymus vulgaris*, *Chamomilla recutita*, *Papaver somniferum*, *Rosmarinus officinalis*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*, *Aspalathus linearis*, *Camellia sinensis*) con espectroscopia infrarroja, infrarrojo cercano y Raman [48]. Concluyen que el estudio que se realizó con técnicas de espectroscopia vibracional podría reemplazar técnicas convencionales como la cromatografía de gases o mediciones fisicoquímicas realizadas con fines de control de calidad.

Al igual que en otras áreas, muchos trabajos comenzaron a surgir caracterizando plantas o incluso caracterizando extractos o aceites esenciales de las plantas. Al ver el progreso de la técnica y basándose en otros trabajos, el uso de un algoritmo computacional complementario era cada vez más común, generalmente se usaba el análisis de componentes principales (PCA), como es el caso de un estudio realizado para analizar el aceite esencial de algunas especies de Oregano (*Origanum*, *Satureja*, *Salvia*, *Sideritis*,

Thymus, Calamintha, Lavandula, Ziziphora and Thymbra) [49], para el cual lograron una asignación para las bandas Raman e IR más características de los compuestos de aceites esenciales los compuestos encontrados fueron: Carvacrol, timol, p-cimeno, g-terpinene, 1,8-cineol, alcanfor, a-pineno, b-pineno, b-cariofileno y pulegone.

Un estudio realizado en China en el 2005, comparó las técnicas de Reflexión difusa de infrarrojo cercano, espectroscopía Raman y espectroscopía de infrarrojo, además usaron el software OPUS/Ident para agrupar muestras de Ginseng de acuerdo con su especie (ginseng blanco, ginseng rojo, ginseng americano y pseudo-ginseng) y métodos de análisis (incluyendo espectroscopía de reflexión difusa infrarroja cercana, espectroscopía Raman y espectroscopía infrarroja). Finalmente, lograron clasificar todas sus muestras en cuatro tipos de ginseng, identificando la naturaleza de cada muestra con el software clasificador. Reafirmaron la especificidad del método y concluyeron que las técnicas espectroscópicas podían reemplazar métodos tradicionales como las cromatografías y que de las tres técnicas que usaron los resultados obtenidos con espectroscopia Raman fueron los mejores ya que las condiciones exteriores no afectaron tanto como en las otras técnicas para realizar el análisis quimiométrico. [15]

En 2018, algunos artículos reportan aplicaciones de ER a plantas medicinales han atribuido las propiedades medicinales de la planta a la presencia de ciertos compuestos químicos, como fue el caso del artículo [50] donde se reportó que el compuesto Canadina posee actividad antifibrilatoria y antioxidante, además de comportarse como un potente inhibidor de la agregación plaquetaria.



### 2.2.3. Representaciones Dispersas (Sparse) aplicado a espectros

#### Raman

Si bien la técnica de espectroscopia Raman es una poderosa herramienta para caracterizar materiales, también se puede ver opacada por las mediciones de ruido, que incluso pueden ser señales más fuertes que las señales emitidas por el material estudiado, por ejemplo, el tejido biológico que muestra señales bastante débiles. En este caso, se tiene una baja relación señal-ruido. El suavizado y el filtrado son dos métodos comunes anti-ruido en espectroscopía Raman. Savitzky-Golay es uno de los más frecuentemente usados, donde pequeñas ventanas son suavizadas por ajuste a una función polinomial. Finite impulse response (FIR), wavelet transform y factor analysis, también son comúnmente usadas como técnicas anti-ruido, FIR ofrece excelente preservación de la forma espectral, pero es demandante computacionalmente, en la técnica de wavelet transform, los espectros son transformados a un dominio wavelet y pasados por un umbral para remover ruido y después vuelven a ser reconstruidas. En el factor análisis, los espectros adquiridos fueron proyectados en un conjunto ortonormal de subespectros mediante Singular Value Descomposition (SVD), este método puede perder la habilidad de descomponer la señal y el ruido cuando la relación señal a ruido es baja, ya que en ocasiones el ruido puede tener mayor contribución que la señal Raman de interés [51].

Wang [52] empleó la herramienta computacional de Sparse el cual es un algoritmo con alta capacidad anti-ruido y baja reducción de la señal Raman pura al reconstruir la señal. Incluso se ha reportado en otros trabajos, que la eliminación de ruido obtenido por el algoritmo Sparse es mejor que el filtro tradicional Savitzky-Golay (S-G) y el algoritmo de eliminación de ruido de umbral fijo.

En el artículo [53] se presenta un modelo de Sparse en la deconvolución del espec-

tro Raman. Con este modelo, se puede realizar un análisis simultáneo tanto cualitativo como cuantitativo de la composición e identificación de posibles sustancias desconocidas. En dicho estudio, asociaron su modelo propuesto con el método de regresión de mínimos cuadrados directos clásicos no negativos (DCLS) en experimentos para mostrar su efectividad. Probaron que tanto DCLS como los modelos DCLS no negativos regularizados y dispersos pueden lograr altas sensibilidades y valores predictivos negativos en este experimento, pero DCLS tiene precisiones y especificidades relativamente bajas.

### **2.2.4. Discusión sobre estado del arte**

A lo largo de los años se han resaltado las ventajas de usar espectroscopía Raman como control de calidad, comprensión de la reacción y la química estructural gracias a la información de las propiedades ópticas obtenidas al hacer incidir luz infrarroja sobre una muestra. La aplicación de RS al área farmacéutica y en plantas medicinales ha sido reconocida durante años por sus grandes ventajas al ser altamente sensitiva y no-invasiva. Aprovechar la especificidad de la técnica para combinarlo con un análisis computacional complementario, fue el siguiente paso en la aplicación de la ER para realizar análisis cualitativos y cuantitativos.

De acuerdo con lo mencionado, es viable utilizar espectroscopía Raman como técnica de estudio, a pesar de que una comparación entre un fármaco y una planta medicinal no ha sido hecha antes, se tiene un amplio respaldo científico de la aplicación de esta técnica a medicamentos y plantas medicinales por separado. Debido a la complejidad que presentan los datos obtenidos en el estudio de espectros Raman al momento de querer realizar un análisis específico, se propone una metodología que emplea una técnica computacional SR, la cual cuenta con una alta capacidad de reconocer una señal de interés entre el ruido que pueda contener la misma.

---

# Capítulo 3

## Metodología propuesta y diseño experimental

---

---

En el presente capítulo se hablará de la metodología propuesta y los experimentos que se realizaron durante el estudio. Se presenta un panorama general de la metodología y los experimentos que se realizaron en cada etapa. A lo largo del capítulo será explicado con detalle, el sitio de estudio, el proceso que se realizó para preparar las muestras de la planta medicinal, el proceso para realizar la obtención de los espectros Raman de la Ranitidina y de la Milenrama, cómo se aplicó el algoritmo de representaciones dispersas y la comparación que se realizó entre el ER de la Ranitidina y de la Milenrama.

### 3.1. Descripción general

Se obtuvo el espectro Raman de las pastillas de Ranitidina y de la planta medicinal Milenrama (el cual todavía no se encuentra reportado), y fue caracterizado usando representaciones dispersas (Sparse). Las muestras de Milenrama obtenidas fueron sometidas a procesos de: liofilización, extracción por fluidos supercríticos, extracción Soxhlet y preparación de infusiones. A fin de obtener sus características moleculares

principales, los espectros de Milenrama fueron aprendidos por el algoritmo Sparse a través de su composición. Finalmente se buscaron similitudes entre espectros Raman del medicamento y de la planta medicinal (figura 3.1).

### 3.2. Sitio de estudio

Para desarrollar este estudio se eligió el medicamento Ranitidina y una hierba medicinal *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* comúnmente llamada Milenrama.

Las partes herbales de Milenrama se recolectaron en San Andrés Cholula, Puebla, México, cuando floreció a fines de octubre de 2018. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 59'12" y 19° 03'24" de latitud norte y los meridianos 98° 15'06" y 90° 20'42" de longitud occidental. Clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Su temperatura media anual fluctúa entre 18°C y 20°C.

Mientras que el medicamento fue adquirido en farmacias locales de San Andrés Cholula, Puebla, México.

### 3.3. Preparación de las muestras

Las hierbas medicinales suelen estar compuestas por varias sustancias químicas, cada una con su propia firma espectral. En una sola muestra, todos los compuestos químicos presentes se encuentran vibrando de acuerdo con su naturaleza molecular lo cual genera muchos picos en el espectro Raman. Además, se debe considerar que el agua que se encuentra naturalmente en la planta genera ruido de fluorescencia sobre los espectros Raman, es posible que las bandas Raman de interés se encuentren escondidas.

Se ha mencionado anteriormente que no es necesario hacer una preparación especial a las muestras que se les quiere obtener su espectro Raman, en el caso de la

### 3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

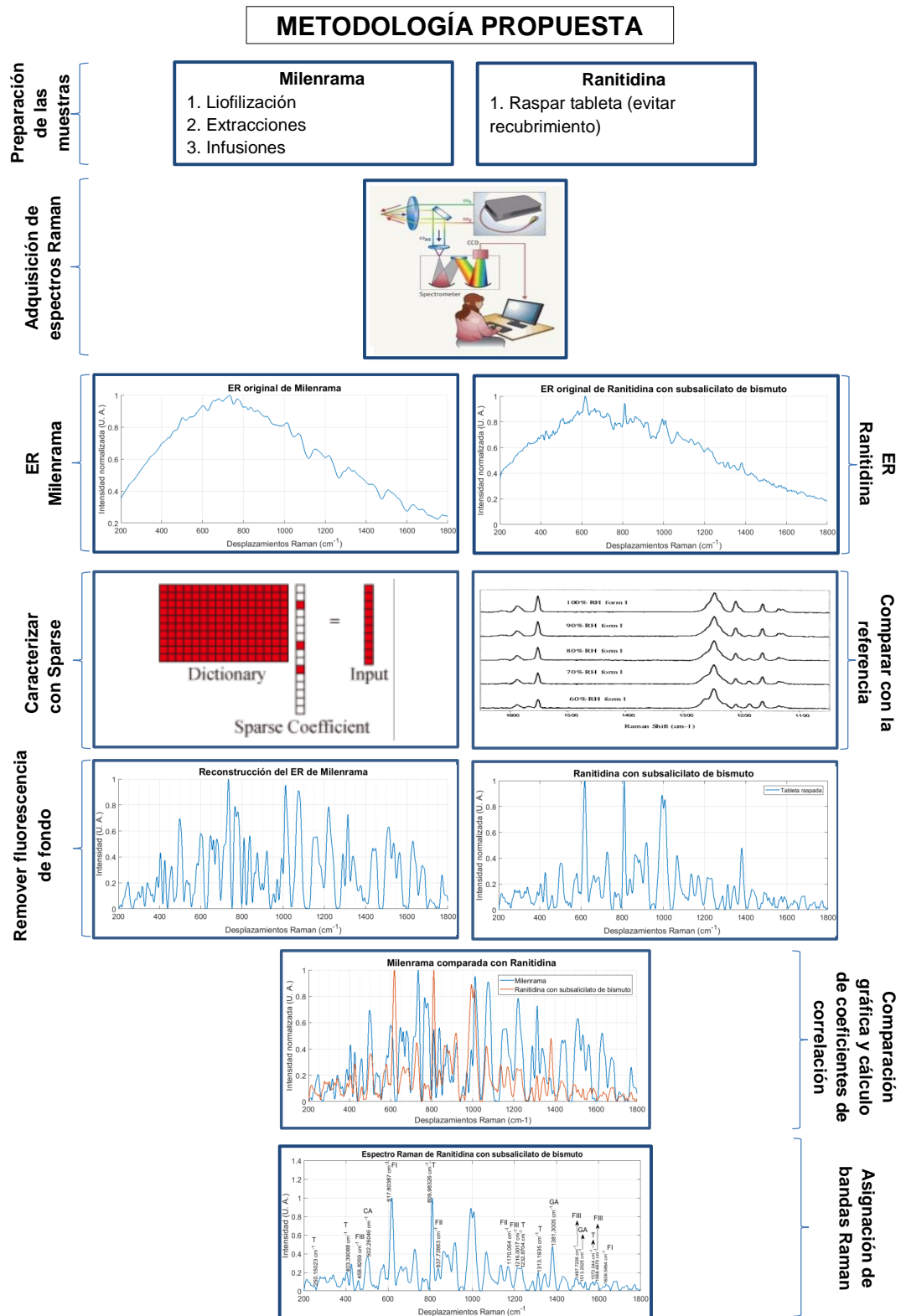


Figura 3.1: Diagrama a bloques de la metodología del proyecto.

Milenrama se decidió hacer una excepción debido a que es una planta que no tiene espectros Raman publicados, por ello, fue necesario realizar mediciones a todas las partes de la planta, sola y también disuelta en sus principales solventes. Para ello, se recurrió a cuatro métodos diferentes para preparar las muestras que se querían medir, los métodos fueron:

- Liofilización para obtener el ER de la planta.
- Extracción con fluidos supercríticos para obtener el ER de la planta.
- Extracción con fluidos supercríticos para obtener el ER de la planta con etanol.
- Extracción con solventes o extracción Soxhlet para obtener el ER de la planta con etanol.
- Preparación de infusiones para obtener el ER de la planta con agua.

Los dos disolventes más usados son el agua y el dióxido de carbono, el agua es muy polar mientras que el dióxido de carbono es completamente apolar, con esto se asegura que se están usando los dos disolventes más usuales que se permiten trabajar como en la industria alimentaria sin ningún riesgo. [54]

### 3.3.1. Liofilización

La técnica de liofilización consiste en congelar el material y luego reducir la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan procesos de congelación-sublimación con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida sobre el producto natural y original, pero preservando la estructura molecular de la sustancia [55].

Es común deshidratar a las plantas medicinales cuando se van a usar para experimentos, sin embargo, algunos métodos de desecado pueden alterar la estructura molecular de las plantas debido a que son sometidas a fuentes de calor, para evitar estas alteraciones por calor se recurrió a la técnica de liofilización como método de deshidratación de la planta medicinal.

La planta fue liofilizada para ser medida completamente sin agua, además que este proceso también fue útil para posteriormente realizar extracciones puras y con etanol, ya que nos aseguramos de que la planta estaba deshidratada.

Este procedimiento se llevó a cabo con un Liofilizador marca LABCONCO a una temperatura de  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  y presión de 0.003 mbar. Dicho liofilizador es perteneciente al Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) de la Universidad Iberoamericana del estado de Puebla, México.

#### **3.3.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)**

Un fluido supercrítico es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases. La técnica de extracción con fluidos supercríticos utiliza dióxido de carbono líquido (en la mayoría de los casos), que se calienta y se presuriza hasta un determinado nivel para que se vuelva supercrítico, es decir, para que adquiera propiedades de los gases y los líquidos. En su estado supercrítico, el  $\text{CO}_2$  actúa como disolvente, pudiendo disolver o extraer materiales de una muestra [56].

Para realizar la extracción se utilizó 50g de Milenrama, previamente Liofilizada ya que la muestra debe tener una humedad menor a un 0.5 %, después de liofilizar la muestra obtuvo aproximadamente un 1 % de humedad. Los ensayos de SFE se llevaron a cabo por duplicado utilizando un extractor de fluido supercrítico de planta piloto que comprende una celda de extracción de cilindro de 2L. La presión y temperatura de extracción fueron 140 bar y  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. El flujo de  $\text{CO}_2$  fue de 70



Figura 3.2: Liofilizador LABCONCO.



g / min y el tiempo de extracción de 90 min. El experimento se repitió usando los mismos parámetros de calibración, y se añadió 100 ml de etanol para la recuperación de compuestos fenólicos.

Este procedimiento se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) en la Universidad Iberoamericana del estado de Puebla, México.



Figura 3.3: Extracción por fluidos súper críticos. E1: disolvente CO<sub>2</sub>. E2: disolvente Etanol.

#### 3.3.3. Extracción con solventes o extracción Soxhlet

Las extracciones se pueden realizar desde los tres estados de la materia y se llaman de la siguiente manera: sólido-líquido, líquido-líquido y gas-líquido. La primera es la más utilizada y la utiliza el equipo *Soxhlet*. Lo que hace el extractor *Soxhlet* es realizar extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material.

Este tipo de extracción se fundamenta en las siguientes etapas:

1. Colocación del solvente en un matraz balón de destilación.
2. Ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.
3. El condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior.
4. Ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al matraz balón, a lo que se llama recirculación.
5. Se vuelve a producir este proceso de recirculación la cantidad de veces necesarias para que la muestra quede agotada.

Lo extraído se va concentrando en el matraz balón que contiene solvente. [54]

Para la extracción *Soxhlet* se tomaron 30g de Milenrama liofilizada y pulverizada a un tamaño de partícula de 2 mm de acuerdo con el tamizaje. Se empleó etanol al 95 % (300 mL) como disolvente. El reflujo se mantuvo hasta completar 10 recirculaciones, con el fin de garantizar la extracción total. El disolvente recuperado se destiló por rota-evaporación a 80 °C para ser utilizado nuevamente.

### 3.3.4. Preparación de infusiones

Un punto importante para mencionar es que además de obtener el espectro Raman de las hierbas medicinales directamente sobre tallo, hojas y flores se necesitaba hacer la medición a una infusión por dos razones principales:

1. Se necesitaba obtener todos los compuestos activos que están presentes en distintas partes de la planta medicinal y medirlos al mismo tiempo.

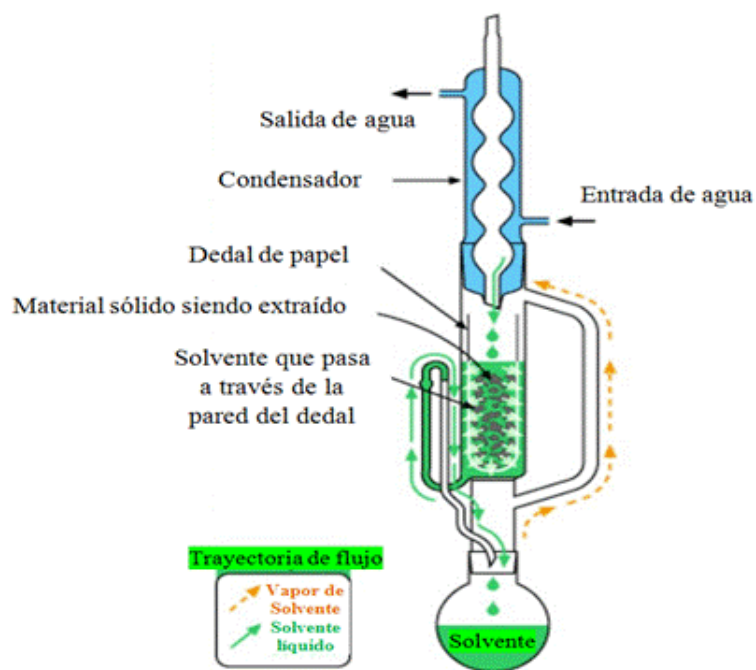


Figura 3.4: Proceso de extracción con equipo Soxhlet [57].

2. El consumo de hierbas medicinales es comúnmente en formas de infusiones o tés.

Para realizar esto se usaron los siguientes materiales:

- Agua embotellada (marca PISA)
- Plantas medicinales.
- Balanza (marca Scout-Pro).
- Vasos de precipitado de 5, 10 y 30 ml (marca PYREX)
- Termómetro (marca PYREX)
- Parrilla con modulador de calor (marca Cimarec)

La concentración de la hierba con relación al agua (agua inyectable marca PISA) que se usó para la disolución se midió a partir de la siguiente fórmula:



Figura 3.5: Infusiones de Milenrama al 30 %, 20 % y 10 % de concentración (de izquierda a derecha respectivamente).

$$\% \text{ Concentracion} = \frac{\text{Masa del soluto}}{\text{Volumen de disolucion}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% C = \frac{M_{\text{soluta}}}{\frac{M_{\text{soluta}}}{\delta_{\text{soluta}}} + V_{\text{solvente}}} \times 100 \quad (3.2)$$

A partir de lo anterior se puede decidir con qué factores iniciar y cuál será la variable desconocida. En este experimento se decidió establecer la concentración que se quería obtener y el volumen de disolución.

$$M_{\text{soluta}} = \frac{(\% C) (\delta_{\text{soluta}}) (V_{\text{solvente}})}{(100\delta) - (\% C)} \times 100 \quad (3.3)$$

Finalmente, lo único que se determina es si el porcentaje que se calculó nos devuelve una cantidad razonable de infusión para medir con el espectrómetro Raman.

Esto se comenzó a considerar porque al hacer infusiones al 30 % de concentración se obtenía muy poca infusión (aprox. 5 mL) y no pudimos obtener concentraciones mayores a 30 %.

Para preparar las infusiones, se siguieron 5 pasos y consideraciones ambientales.

1. Se deseaban obtener infusiones de Milenrama al 10 %, 20 % y 30 % de concentración (peso/volumen) en un volumen de solvente de 30mL (limitado por los vasos de precipitado), el primer paso fue calcular la cantidad de soluto que se necesitaba a partir de las consideraciones anteriores.
2. Para obtener una mejor incorporación de la hierba se trituró en un mortero.
3. Ya que se tenían las cantidades necesarias de soluto (planta medicinal) y solvente (agua inyectable), se pusieron a hervir. Se utilizaron vasos de precipitado y una parrilla a 100 °C.
4. Una vez que alcanzó el punto de ebullición, dicha muestra se hizo pasar por papel filtro de 5x5 cm marca GE Bio-Sciences para evitar tener residuos de la planta.
5. Se realizaron los experimentos con una temperatura ambiente de 24 °C.

#### **3.3.5. Preparación de las muestras de fármacos**

Las tabletas de Ranitidina no requirieron una preparación especial y solamente fueron raspadas, pues como marca la literatura es necesario realizar este proceso para evitar que el recubrimiento que tienen afecte el espectro que se desea ver [42]. En la figura 3.6 se puede observar el espectro Raman de una tableta raspada comparado con el de una tableta sin raspar, muestran claras diferencias en cuanto a intensidad, incluso algunas bandas Raman parecieran estar escondidas dentro del espectro de la tableta con recubrimiento.

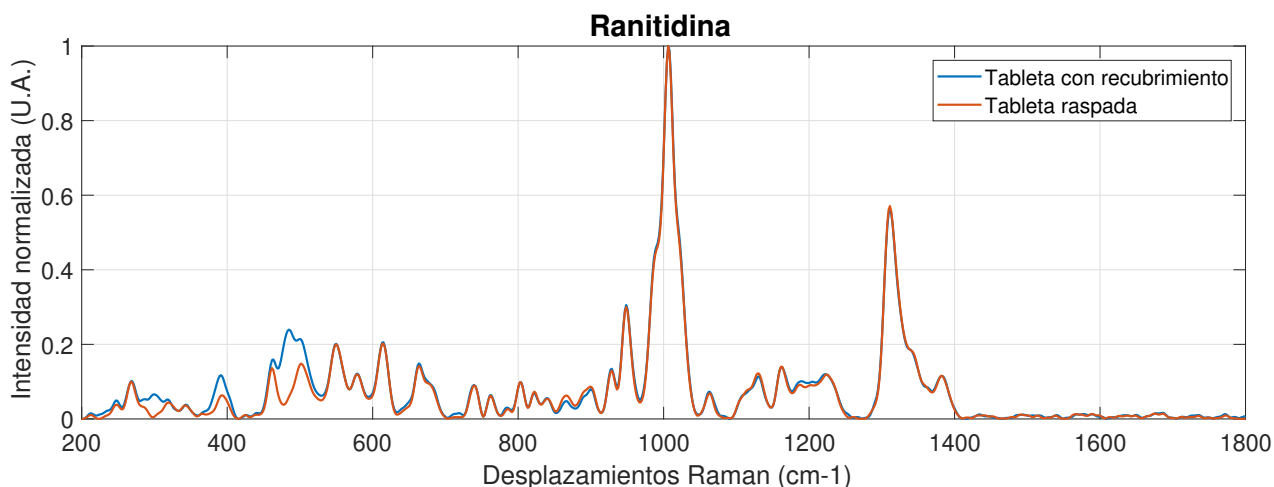


Figura 3.6: Espectro Raman del compuesto de Ranitidina con subsalicilato de bismuto, tableta sin raspar, es decir, con recubrimiento y tableta raspada, sin recubrimiento.

### 3.4. Obtención de los espectros Raman

Una vez obtenidas las extracciones e infusiones se comenzaron a obtener sus espectros Raman. Tener extractos e infusiones de la Milenrama nos permitió aprovechar algunas de las propiedades medicinales de la planta características de la misma, debido a que no hay garantía de que cada fracción extraída sea realmente medicinal y las distintas fracciones pueden corresponder a distintas partes de las plantas. Para realizar estas mediciones se usó el espectrómetro QE65000 (marca Ocean Optics), Láser (modelo BRM 785-0,5100-0,22-06) y el software de visualización *SpectraSuite*. Para comenzar las mediciones se necesita tener siempre la misma calibración para cada experimento, por lo que se verificó que el equipo tuviera seleccionados los siguientes parámetros. Tabla [3.1](#)

Se tomaron 10 espectros Raman de cada muestra (infusiones a distintas concentraciones), en la escala de desplazamientos Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Se repitió el experimento 3 veces, desde la preparación de las infusiones hasta las mediciones de los espectros Raman.

### 3.5. APLICACIÓN DEL ALGORITMO DE REPRESENTACIONES DISPERSAS

Tiempo de integración	Muestras promedio	Resolución	Rango de ruido inicial	Escala de graficación	Potencia del láser	Temperatura ambiente
30 seg	1	1	-10 a 10	Desplazamientos Raman	30 $\mu$ W	24 °C

Tabla 3.1: Parámetros de calibración para el software *SpectraSuite*, así como algunas condiciones ambientales.

## 3.5. Aplicación del algoritmo de Representaciones Dispersas

Para poder realizar un estudio que describa la correlación e índices de similitud que existe entre medicamentos y hierbas medicinales con referencia a las propiedades moleculares obtenidas de sus espectros Raman es necesario obtener cierto grado de similitud entre espectros. La principal desventaja es que algunas muestras presentan fluorescencia, lo que puede enmascarar la señal Raman y dificultar las mediciones, mientras ciertas muestras como los medicamentos tienen picos de emisión bien definidos, los espectros que se obtienen de las hierbas medicinales contienen ruido que llega a confundirse con los picos de emisión característicos de las hierbas, por esto se propuso la herramienta computacional de Sparse ya que ha demostrado su alta capacidad anti-ruido y su baja reducción de señal Raman pura contribuida por su principio de reconstrucción [52].

#### *Representaciones dispersas (Sparse)*

Las representaciones dispersas son una combinación lineal entre un conjunto de coeficientes y un diccionario, como se indica en:

$$X = D\alpha + r = \sum_{i=1}^m \alpha_i d_i + r \quad (3.4)$$

Donde  $X \in \mathbb{R}^n$  es una señal,  $D \in \mathbb{R}^{n \times m}$  es un diccionario con  $m$  señales elementales (llamadas átomos),  $\alpha \in \mathbb{R}^m$  es un vector de columna que contiene los coeficientes representativos de  $X$  en un diccionario matricial ( $D$ ) y  $r \in \mathbb{R}^n$  es el residuo.

En la combinación lineal  $\alpha_i \in \mathbb{R}$  es el  $i$ -ésimo coeficiente sparse que modifica la amplitud del  $i$ -ésimo átomo  $d_i \in \mathbb{R}^n$  contenido en  $D$ .

La señal  $X$  puede ser descompuesta en pocos átomos a partir de  $D$  y sus correspondientes coeficientes  $\alpha_i$ . El principal propósito de las representaciones Sparse es obtener una versión de  $X$  con el menor número de átomos posibles. Para que esto sea posible se necesitan resolver algunos problemas. El primer problema es construir el diccionario  $D$ . Para ello se han creado diferentes propuestas, pero no existe una única forma para construir un diccionario.

El segundo problema es determinar los coeficientes  $\alpha_i$ , para ello existen algoritmos en la literatura como el Orthogonal Matching Pursuit (OMP). También, se debe considerar el residuo  $r$  de la representación Sparse. [30]

#### ***K-Singular Values Decomposition (K-SVD)***

Es necesario usar algoritmos especiales para adaptar los valores del diccionario al tipo de señales que estamos tratando. Este proceso se conoce como aprendizaje de diccionario y su objetivo es proporcionar una base precisa para la representación dispersa.

El algoritmo K-SVD encuentra un diccionario para la representación lineal de señales. Dado un conjunto de señales, busca el mejor diccionario que pueda representar escasamente cada señal. Este algoritmo permite adaptar un diccionario excesivamente completo a las características de un conjunto particular de señales de entrenamiento.

El proceso K-SVD se divide en dos pasos principales: codificación dispersa (OMP) y actualización del diccionario. En el paso de codificación dispersa, las señales del conjunto  $X$  son dispersas dado el diccionario actual. En el segundo paso, el diccionario se actualiza un átomo a la vez suponiendo que  $X$  y  $D$  son fijos y solo se evalúa una



columna del diccionario ( $d_j$ ) y sus coeficientes correspondientes ( $\alpha_j$ ). La literatura sugiere que K-SVD requiere más de 4 iteraciones para alcanzar una solución y que, por lo general, 10 o 20 iteraciones son suficientes.[58]

#### ***Orthogonal Matching Pursuit (OMP)***

OMP es uno de los métodos que fueron desarrollados para aproximar las soluciones Sparse del problema mientras reduce el requerimiento de fuentes.

El OMP en su proceso elige la solución local óptima. En cada paso, el proceso intenta encontrar en el diccionario un átomo con la correlación más alta con el residual actual. Para aproximar los coeficientes dispersos se aísla como:

$$\alpha = (D_i) - X \quad (3.5)$$

El residuo se calcula como la diferencia entre la señal original y su aproximación parcial. Luego se estima el error de la aproximación parcial. El proceso se detiene cuando el error mínimo local es igual o menor al esperado  $\epsilon$  [59].

En otras palabras el algoritmo de OMP permite encontrar los átomos que mejor se ajustan a las señales estudiadas.

El diagrama de flujo mostrado en la figura 3.8 representa el procedimiento que se siguió hasta obtener las gráficas de las señales elementales que componen al espectro Raman de Milenrama.

### **3.6. Análisis y comparación de espectros Raman**

Para probar que tan robusto es el algoritmo se añadió ruido a los ER de Milenrama, demostrando que los diccionarios entrenados eran capaces de detectar las características elementales de la planta inmersas en ruido añadido sintéticamente.

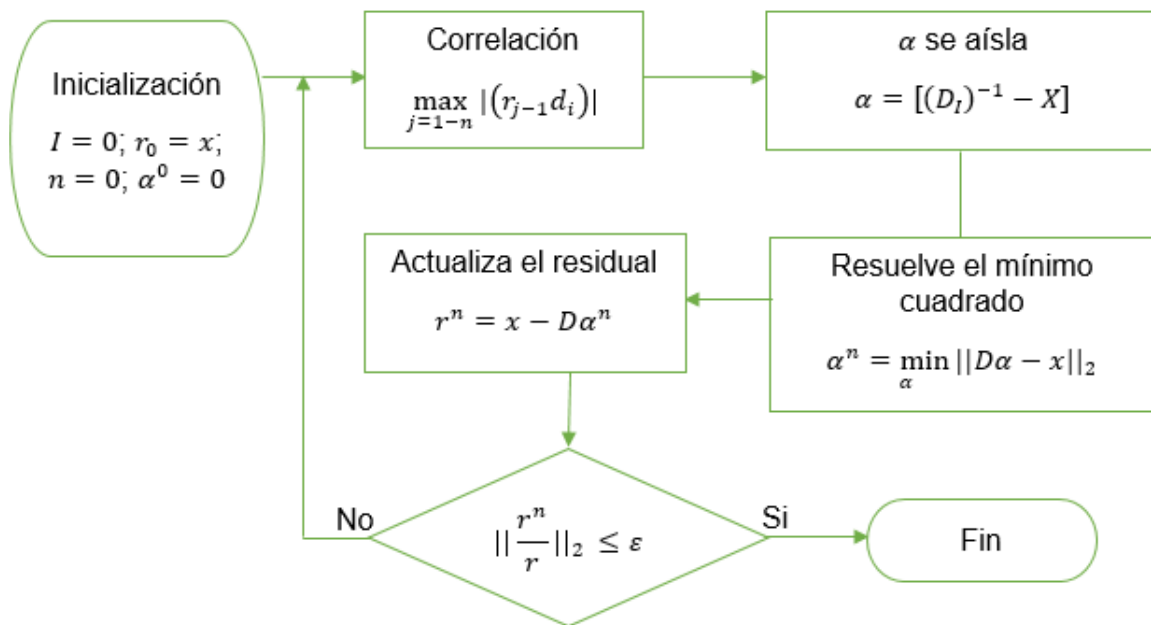


Figura 3.7: Diagrama de flujo del algoritmo OMP que se encuentra dentro del proceso del algoritmo Sparse.

Para generar resultados de referencia se comparó el nivel de correlación contra distintas presentaciones del fármaco (patente, genérica, similares, compuesto con otra sustancia). Para lograr tener un punto de comparación entre un fármaco que tiene un ER definido con un ER de Milenrama se propone limpiar el ER de manera selectiva gracias a la descomposición de señales elementales que nos provee el algoritmo Sparse, seleccionando características de la señal que se considera no aportan información relevante al ER analizado, para ello se propusieron dos criterios de selección que permitirían determinar con qué señales elementales se reconstruiría el ER de Milenrama.

Después de reconstruir la señal, será necesario normalizar el espectro y debido a que la señal posee un ruido característico en espectroscopía Raman llamado fluorescencia, se probará remover tal fluorescencia con tres métodos comunes Vancouver, Baseline y MinMax.

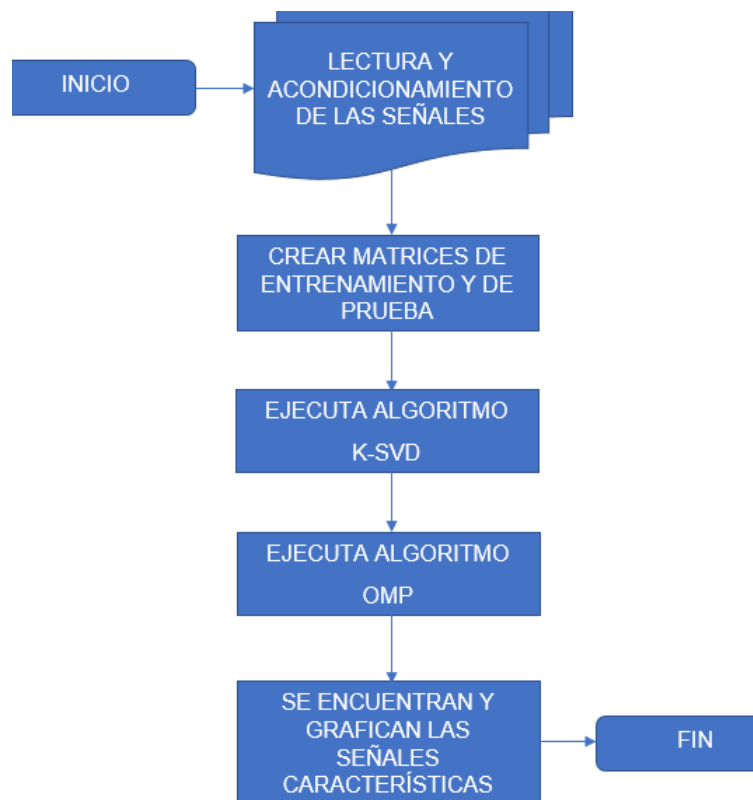


Figura 3.8: Diagrama de flujo de la aplicación del algoritmo Sparse.

### 3.7. Resumen

Siguiendo el método general propuesto, el primer obstáculo fue definir el espectro Raman de la planta medicinal, debido a que esta no se encontraba reportado en la literatura. Por ello se recurrió a distintos tipos de procedimientos químicos que permitieron expresar los compuestos químicos de la planta medicinal, aunado a esto se seleccionó un método quimiométrico que permitió encontrar las características principales de la planta para cada experimento. Se definieron los parámetros que requiere el método (es decir, las características extraídas con las que se reconstruiría la señal), para resolver esto se aplicaron criterios de selección. Además, se exploró la eficiencia del método quimiométrico poniéndolo a prueba con ruido añadido a las ER de Milenra-

### CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA PROPUESTA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

ma. Obtener el ER de Ranitidina no traería mayores complicaciones debido a que ya se encontraba reportado en la literatura, entonces esto facilitaba la comparación de lo obtenido con lo reportado. Finalmente, y para cumplir con el objetivo principal de la investigación, se determinó que se usaría el grado de correlación y la superposición de las gráficas para identificar las similitudes.

---

## Capítulo 4

# Resultados y discusión

---

En este capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos con los métodos y experimentos propuestos. Se describen los resultados que se obtuvieron del algoritmo de Representaciones Dispersas y los criterios que se usaron para la reconstrucción de la señal. Además, se comprueba la capacidad antiruido de Sparse mostrando los resultados obtenidos al añadir ruido aleatorio y ruido blanco a los espectros de Milenrama. Se verá la comparación gráfica realizada entre la planta medicinal y las distintas presentaciones del fármaco, además de las medidas de correlación que hay entre ellos. Posteriormente, se presentan un análisis y discusión de los resultados de los experimentos con la finalidad de comprobar el desempeño del método propuesto en esta tesis.

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Descripción de los datos

Las muestras de Milenrama que se midieron estuvieron sometidas a procesos de Extracción Supercrítica, Extracción Xhotlet, Infusion y Liofilización, para asegurarse

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

de que el algoritmo propuesto lograra generar señales representativas de la Milenrama a pesar de que esta haya sido medida después de pasar por los procesos antes mencionados, todo esto con el fin de que las características más representativas se mantuvieran en todas las preparaciones a las que se sometió la planta. Se obtuvo una base de datos de 150 espectros Raman de Milenrama, todos los espectros Raman se sometieron al mismo pre-pocesamiento antes de pasar al algoritmo Sparse.

El pre-procesamiento consistió en aplicar un recorte para obtener espectros que van desde 200 hasta 1800 en la escala de Desplazamientos Raman [ $cm^{-1}$ ], con el propósito de eliminar datos que no aportaran información relevante de la muestra analizada. La intensidad de los espectros fue normalizada entre 0 y 1, la escala se mide con Unidades Arbitrarias [U. A.] (figura 4.1).

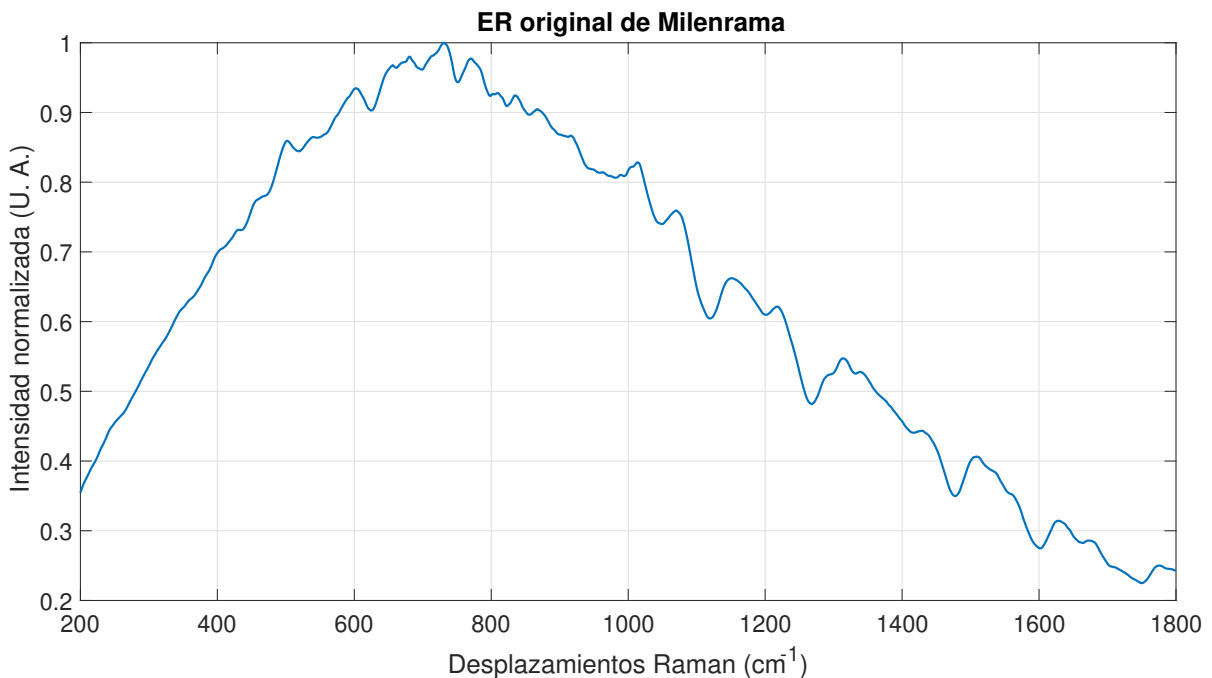


Figura 4.1: Pre-procesamiento de los espectros Raman de Milenrama, donde se conserva el intervalo de 200 a 1800  $cm^{-1}$  y su intensidad es normalizada entre 0 y 1.

### 4.1.2. Obtención y selección de señales elementales

De los 150 espectros Raman, 75 se eligieron de manera aleatoria para entrenar los diccionarios iniciales y los 75 restantes se usaron para pruebas, es decir, para obtener la descomposición de cada ER en sus distintas formas de onda elementales (lo que también es llamado átomo debido a que es la parte indivisible de la señal). Se obtuvieron 127 formas de onda elementales de los ER de Milenrama (figura 4.2), esta descomposición muestra todas aquellas formas de onda que caracterizan a la señal estudiada. Esto permitió observar de manera detallada todas las características que contiene cada ER y determinar lo que se desea conservar o eliminar de la señal. Para ello se propusieron dos criterios de selección que permitió descartar información irrelevante en el ER de Milenrama.

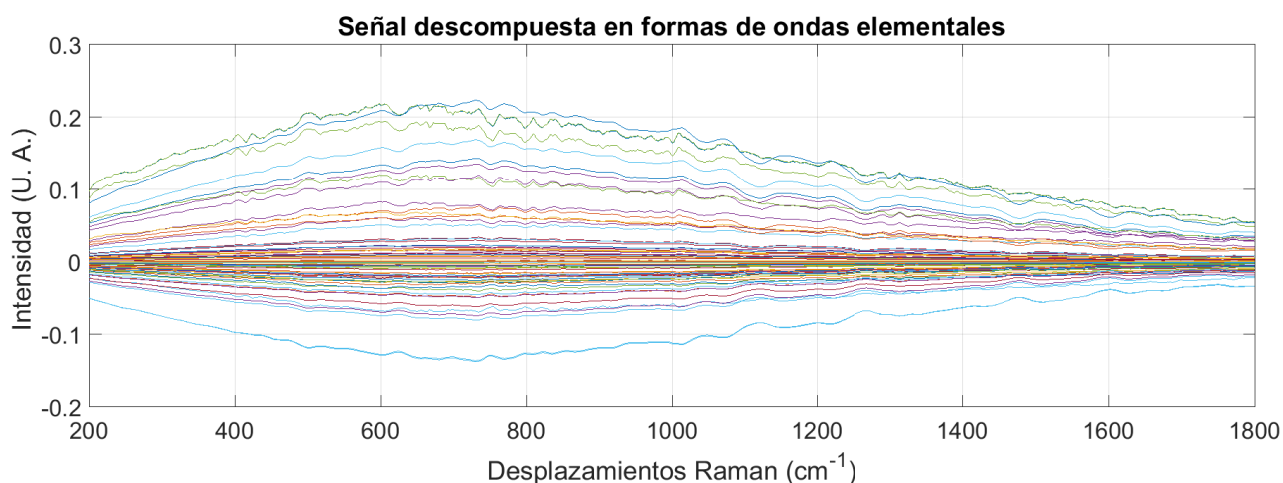


Figura 4.2: Descomposición de una señal en 127 formas elementales de señal (átomos).

#### Criterio 1

*Positivas y negativas:* al descomponer los ER en señales elementales se obtuvieron 127 de las cuáles algunas que estaban por debajo de cero eran completamente inversas a la señal de entrada, esto sucede porque el algoritmo busca dentro del diccionario entrenado a aquellas señales que más se parezcan a las señales que se este analizando,

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

pero si encuentra una señal que tenga una energía (o intensidad) superior a la de la señal estudiada le asigna un coeficiente negativo, de lo contrario estaría agregando energía y cuando se hiciera una reconstrucción de la señal se tendría más energía que la que se tuvo a la entrada, por ello, se descartaron estas formas de onda. Se pasó de tener 127 átomos a 56 átomos.

### **Criterio 2**

*Coefficiente de variación:* se observó que dentro de las formas de onda elementales que representan a la señal había algunas muy cercanas a cero y planas. Para determinar que formas de onda elementales contenían posibles bandas Raman y cuáles no, se analizó el coeficiente de variación de cada una. Esto consiste en un análisis con estadística básica, definido como:

$$C = \frac{\sigma}{\bar{x}} \quad (4.1)$$

Donde  $C$  es el coeficiente de variación,  $\sigma$  es la desviación estándar y  $\bar{x}$  la media de los datos. Esta ecuación se aplicó a lo largo de cada forma de onda elemental, con una ventana de 9 datos, es decir, la fórmula era aplicada cada 9 datos y se guardan en un vector paralelo, después esta ventana se recorre un lugar y se vuelve a aplicar el mismo procedimiento, hasta haber analizado a toda la señal. Se obtuvo un vector con coeficientes de variación con el cuál posteriormente se estableció un umbral para determinar que señales si aportaban. Para este segundo criterio se consideró el número de átomos con que se reconstruye el ER y la energía (intensidad) que se obtenía de dicha reconstrucción, la cuál debía acercarse a 1. Esto permitió saber si se mantenía la mayor parte de la información del ER o se estaba perdiendo, y se veía reflejado en la intensidad. Siguiendo con estas consideraciones se realizaron reconstrucciones con el fin de obtener el menor número de átomos que logaran reconstruir la señal original con



la menor pérdida de intensidad. (Tabla 4.1). Después de establecer un umbral para las formas de onda elementales (átomos) positivas, se pasó de tener 56 átomos a tan solo 27.

Umbral	No. Átomos	Intensidad
0.045	39	1
0.046	27	0.9
0.047	25	0.8
0.048	22	0.7

Tabla 4.1: Selección de un umbral para el coeficiente de variación a partir del número de átomos que pasan el umbral y la intensidad que mantienen en su reconstrucción.

Después estos 27 átomos fueron analizados de acuerdo con su coeficiente de variación. A cada átomo se le calculó un coeficiente de variación general y se normalizaron esos coeficientes, a modo que se pudieran tener 5 intervalos ( 0 - 0.2, 0.21 - 0.4, 0.41 - 0.6, 0.61 - 0.8, 0.81 - 1) de los cuales solo se consideraron los átomos que estuvieran dentro de los intervalos 0.61 - 0.8 y 0.81 - 1, es decir, se consideraron solo aquellos que tuvieran el mayor aporte. Esto es porque las señales elementales presentarán un mayor nivel de variación. Las señales que presentaron un nivel bajo de variación están despreciando las bandas Raman que se desean observar, es por ello que no son consideradas para la reconstrucción. Con esta última selección de átomos se pasó de tener 27 átomos a 11 átomos (figura 4.3).

Esto se repitió para las 75 señales con las que se hicieron pruebas y la cantidad de reducción de átomos para la reconstrucción de la señal estuvo entre 20 y 9 átomos finales.

Estos 11 átomos se reconstruyeron, es decir, todos fueron sumados linealmente, la señal obtenida aún contenía ruido de fluorescencia, el cual fue removido con el método de “Baseline” el resultado final se muestra en la (figura 4.4).

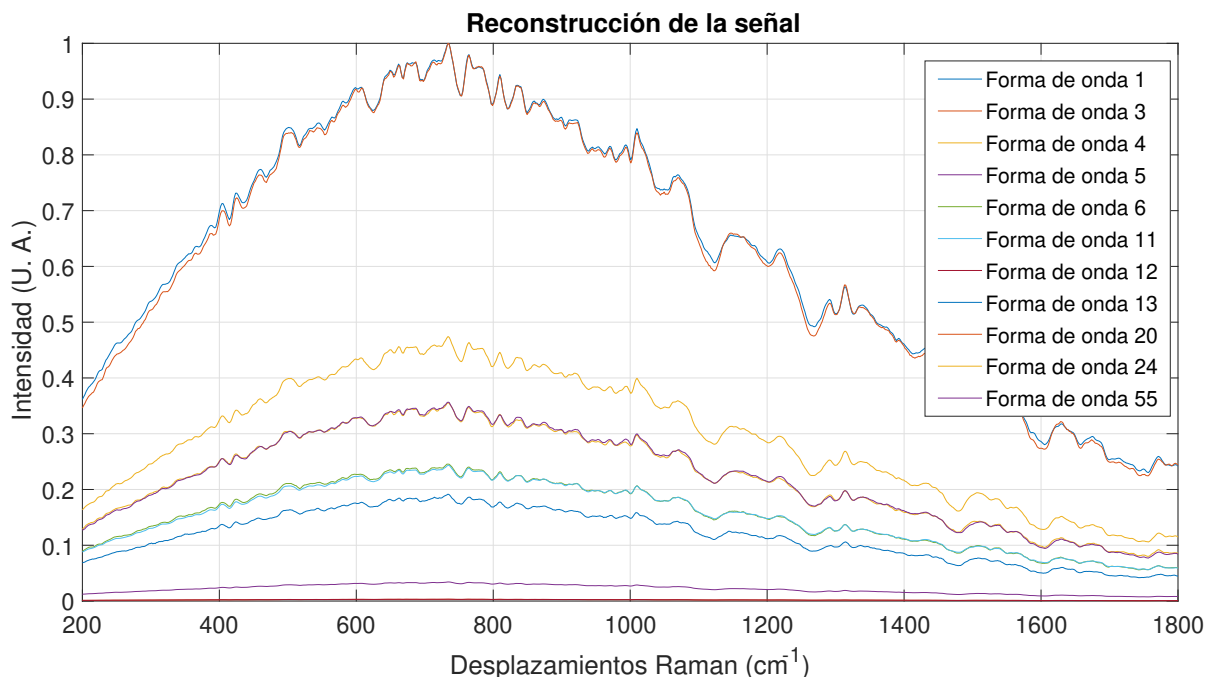


Figura 4.3: Átomos del ER de Milenrama con un aporte después de haber pasado por la selección de átomos por "Positivos y negativos" y "Coeficientes de variación". Pasó de tener una descomposición de 127 átomos a solo 11 átomos que representan la información más relevante.

### 4.1.3. Resultados de las pruebas con ruido sintético añadido

Se realizó un experimento para probar qué tan robusto era el algoritmo y saber si realmente había aprendido las características principales del espectro Raman de la Milenrama. Para este experimento se tomó la Matriz de señales destinadas para pruebas, a partir de esta matriz se generaron dos matrices más: la primera con ruido random y la segunda con ruido "White-Gaussian" (figura 4.5), ambas funciones predeterminadas en el software MatLab.

Finalmente se obtuvieron las reconstrucciones de las señales con ruidos sintéticos añadidos, en la figura 4.6 se tiene el ejemplo de una reconstrucción de señal sin ruido añadido y un ejemplo de reconstrucción de señal para las que tuvieron ruido random y ruido White-gaussian añadidos. Las características principales del ER de Milenrama en

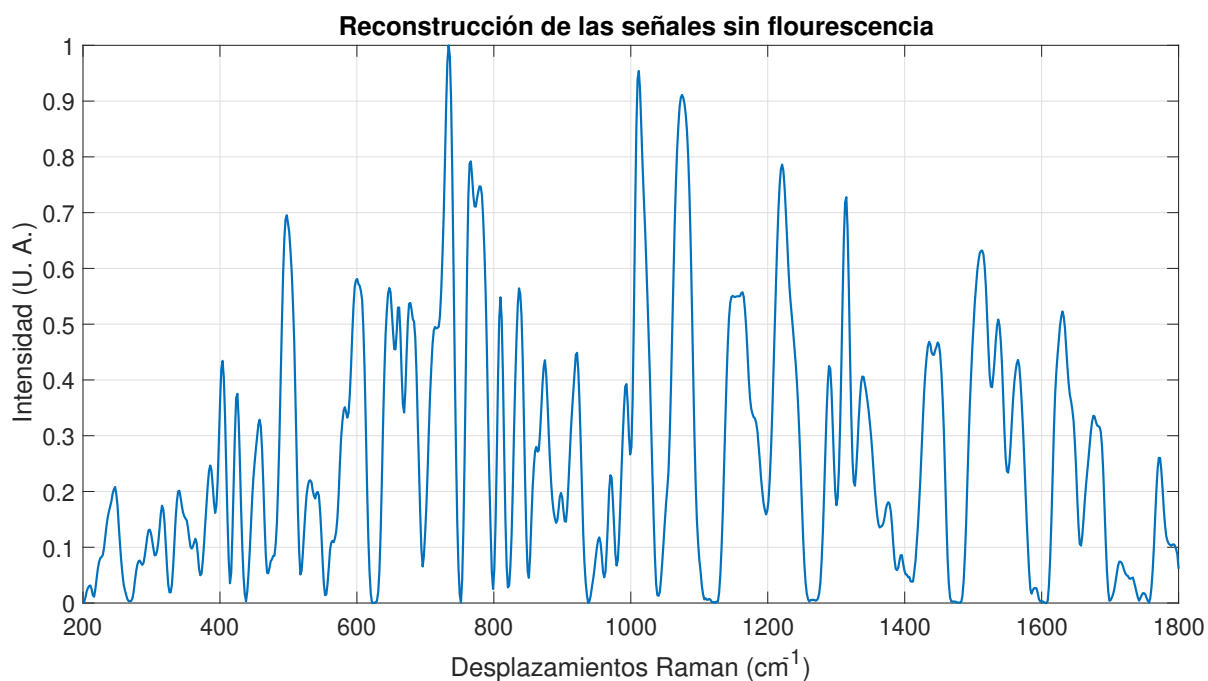


Figura 4.4: Señal reconstruida a partir de 11 átomos representativos de la misma, además se usó el filtro de Baseline para remover fluorescencia.

señales inmersas en ruidos añadidos fueron reconocidas por el algoritmo sin problemas, se puede observar que no hay diferencias notorias a simple vista que puedan dar indicios de ruido considerado para la reconstrucción de la señal.

Se observó que el algoritmo es robusto, ya que a pesar de tener espectros Raman con ruidos sintéticos añadidos, se logró encontrar la forma elemental del espectro Raman que se encuentra analizando.

#### 4.1.4. Comparación gráfica entre el fármaco y la planta medicinal

Una vez obtenido el ER de Milenrama, podemos pasar a la etapa de comparación con el fármaco elegido, Ranitidina. Para ello primero se presentaron los espectros Raman de la Ranitidina, la cual fue medida con el mismo espectrómetro que la Milenrama, para tener una mejor confiabilidad de esta comparación se corroboró que las

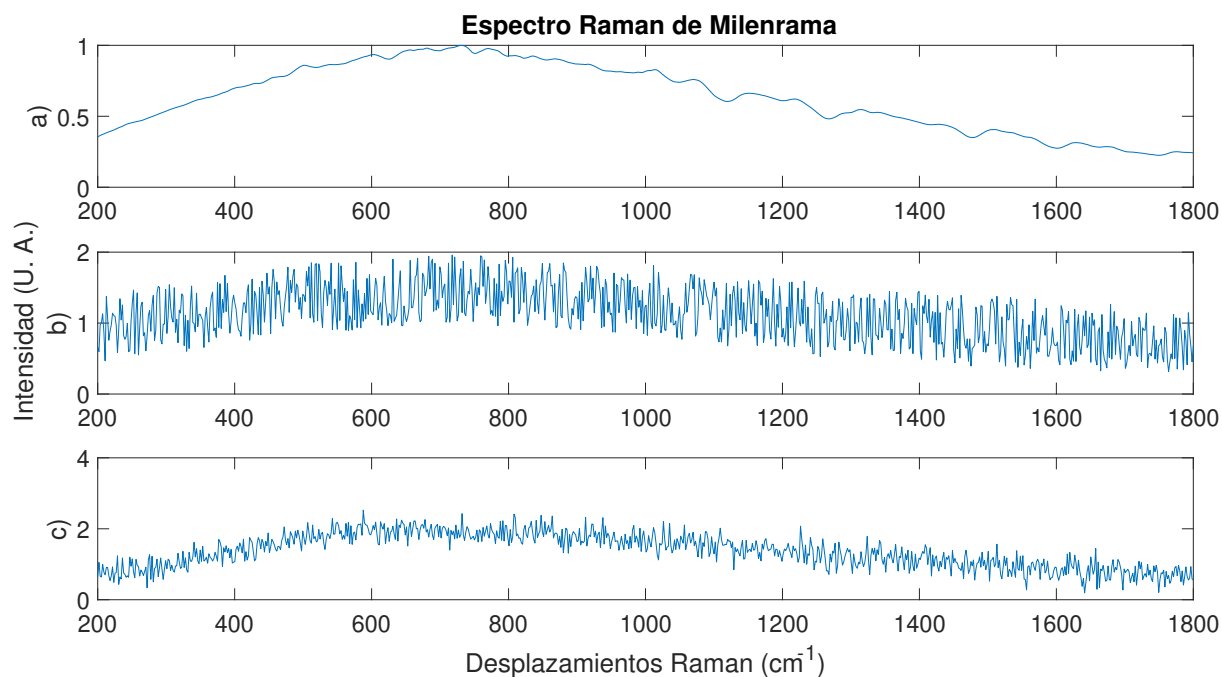


Figura 4.5: Comparación de reconstrucción de señales, entre una sin ruido añadido y dos ejemplos de ER con ruido sintético añadido al inicio de las pruebas, a) Espectro Raman de Milenrama sin ruido sintético añadido, b) ER de Milenrama con ruido random, c) ER de Milenrama con ruido "White-Gaussian".

bandas Raman fueran las correctas comparando los espectros que recién se midieron con el mismo espectrómetro con que se midió la Milenrama comparándolo con el espectro Raman de Ranitidina. Además en este estudio se propuso comparar el ER de Milenrama con Ranitidina en su presentación de patente, genérica y similares.

A continuación, se tiene el espectro Raman de la Ranitidina, en su versión de patente, genérica, similares y compuesto con Subsalicilato de Bismuto (figura 4.7). Además, se tiene el espectro Raman de la Milenrama.

Se realizó la comparación gráfica del ER de Ranitidina (sola y compuesta con Subsalicilato de bismuto) con el ER de Milenrama (figura 4.8), se puede observar que hay mayor coincidencia entre el ER de Milenrama con Ranitidina compuesta que sola. Para corroborar lo observado en la figura 4.8 se obtuvieron los coeficientes de correlación entre Milenrama y Ranitidina medidas en cuatro versiones diferentes, elaborada

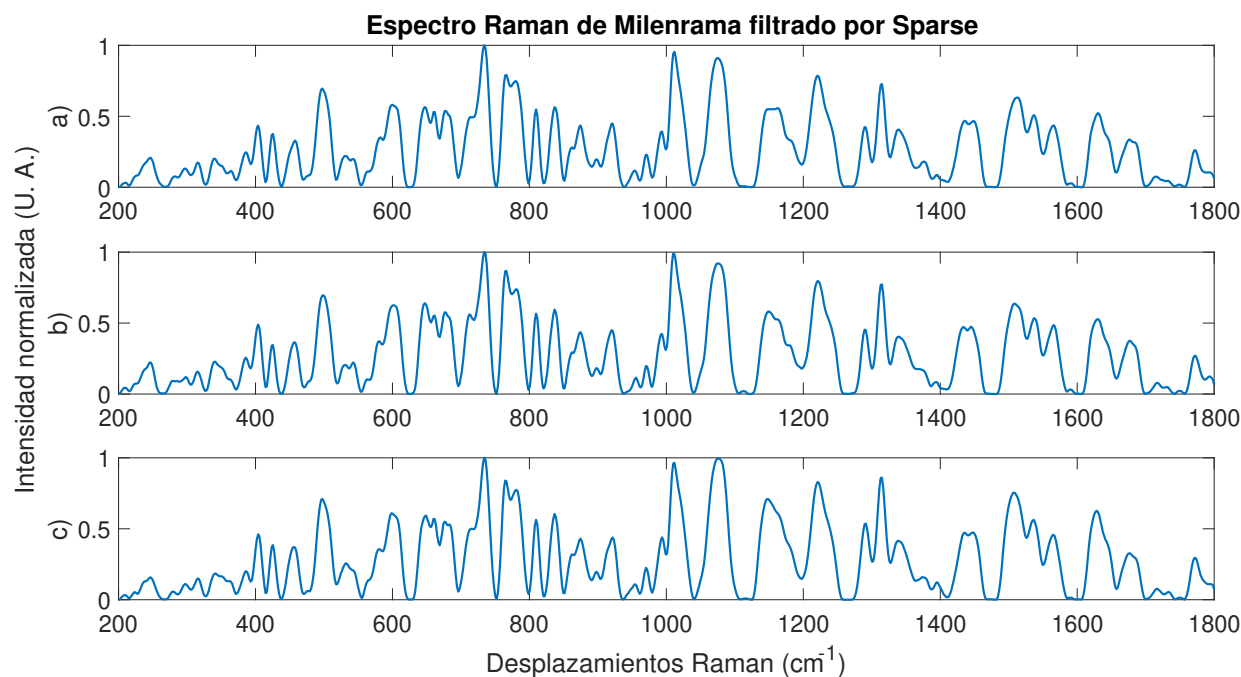


Figura 4.6: a) Reconstrucción de ER de Milenrama sin ruido sintético añadido. b) Reconstrucción del ER de Milenrama con filtrado del ruido random. c) Reconstrucción del ER de Milenrama con filtrado del ruido "White Gaussian".

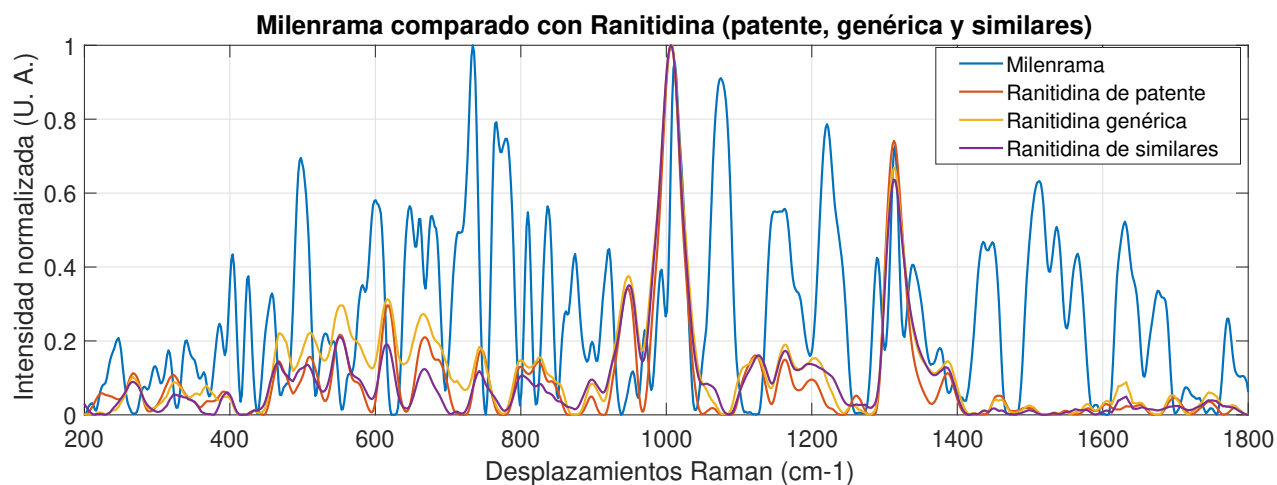


Figura 4.7: Comparación de ER de Ranitidina fabricada por laboratorios de patente, genéricos y similares, además el ER del compuesto Ranitidina con subsalicilato de bismuto.

por laboratorios de patente, genéricos y similares, además, una versión en conjunto con subsalicilato de bismuto. La columna 3 de la tabla [4.2](#) muestra los coeficientes de correlación de los espectros que son usados de ejemplos en las gráficas anteriores y la

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

columna 4 muestra las medias de todos los coeficientes de correlación obtenidos de las 75 señales que se tienen para pruebas, con estos coeficientes se demostró que el ER de Milenrama tiene un mayor grado de correlación con el ER de Ranitidina con Subsalicilato de bismuto (tabla 4.2).

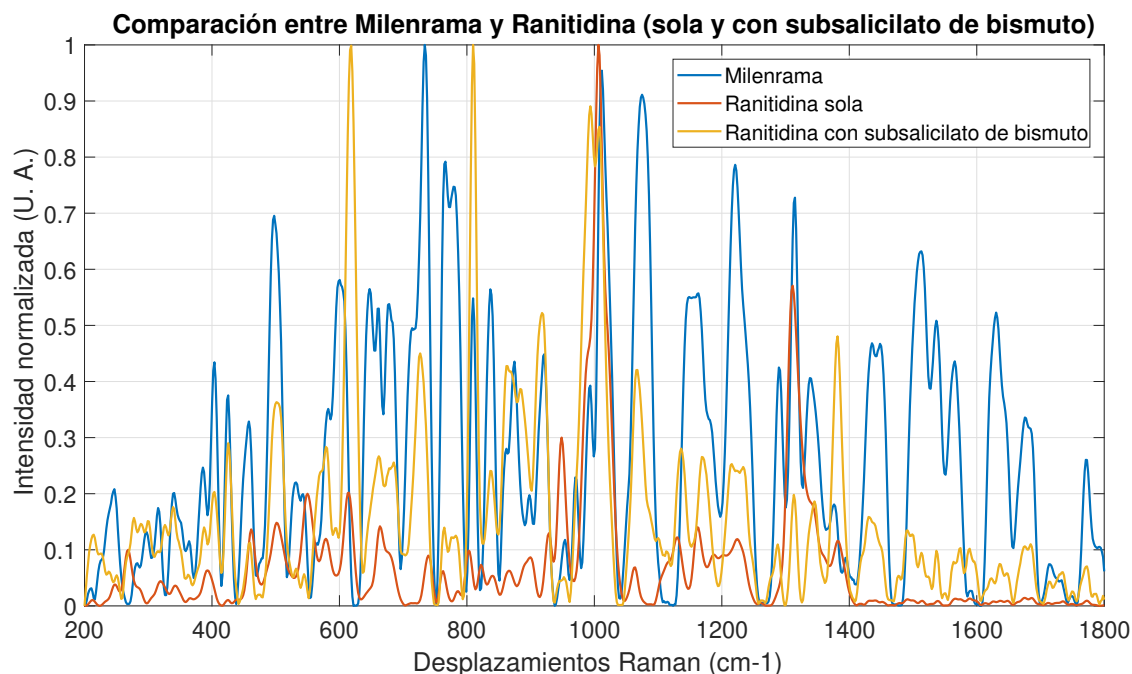


Figura 4.8: Comparación gráfica del ER de Ranitidina (sola y compuesta con subsalicilato de bismuto) con el ER de Milenrama.

Para complementar la comparación gráfica mostrada en la figura 4.8, se tiene la tabla 4.3 que muestra las bandas Raman de coincidencia entre ambos espectros. Se resaltan las bandas Raman de exacta coincidencia y el resto de las bandas Raman se considera que pertenecen al mismo compuesto debido a que en la obtención de ER se tienen una tolerancia de 5 desplazamientos Raman a la izquierda y derecha por la resolución del equipo.

<b>Planta Medicinal</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Coefficiente de correlación</b>	<b>Medias Coefficiente de correlación</b>
Ranitidina Genérica	Milenrama	0.2636	0.207
Ranitidina Patente	Milenrama	0.1627	0.1782
Ranitidina Genérica	Milenrama	0.1905	0.2715
Ranitidina Similares	Milenrama	0.2051	0.222
Ranitidina con Subsalicilato de Bismuto	Milenrama	0.3645	0.3499

Tabla 4.2: Coeficientes de correlación entre espectros Raman de la planta medicinal Milenrama y ER del fármaco Ranitidina.

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

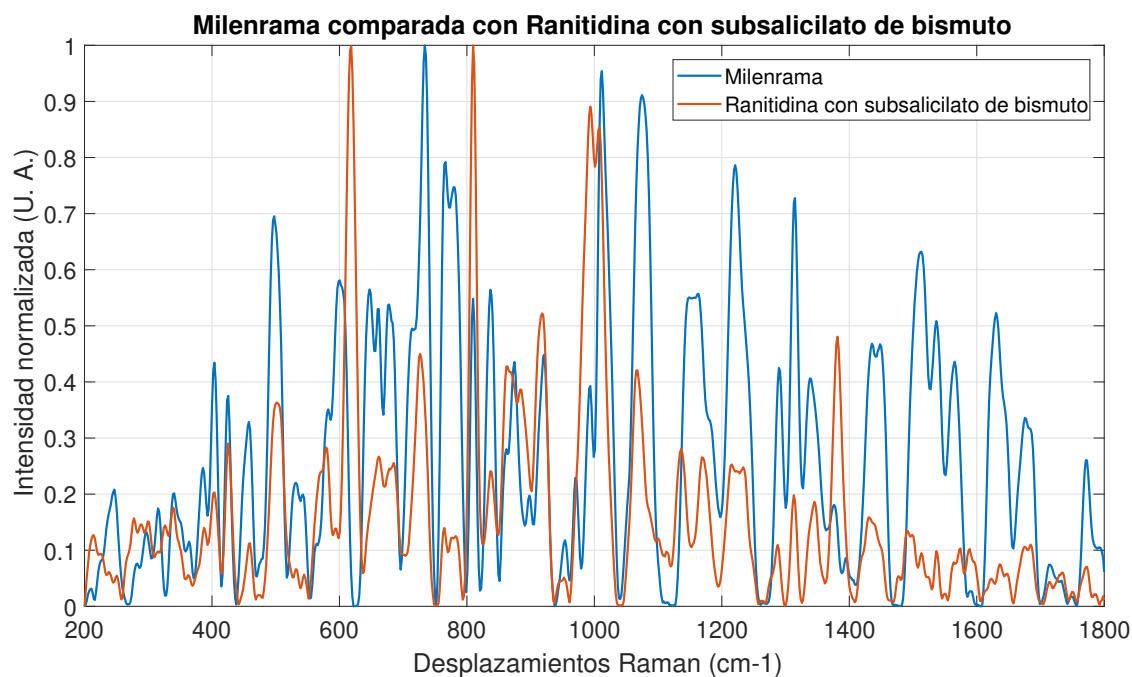


Figura 4.9: ER de Milenrama comparado con el ER de Ranitidina compuesta con subsalicilato de bismutos, entre los cuales existe un mayor grado de correlación.

Muestra	Bandas Raman				
<b>Milenrama</b>	282.74068	297.05964	340.30797	385.82944	<b>403.51172</b>
	424.94057	457.46977	497.79619	<b>531.4789</b>	582.62535
	660.84891	766.28277	779.44496	<b>809.72064</b>	<b>837.32223</b>
	<b>863.09118</b>	920.69547	953.50243	992.94576	1011.6787
	1075.0804	1290.1417	1314.0586	1435.9606	1512.0413
	1536.6551	1676.4084	<b>1714.8018</b>	1731.7196	1772.0086
<b>Ranitidina compuesta</b>	277.82433	299.69622	339.08231	388.06102	<b>403.39088</b>
	425.81626	458.8269	502.26046	<b>531.87631</b>	579.04822
	661.75571	764.59114	781.76935	<b>809.98326</b>	837.73863
	<b>863.42645</b>	917.70591	951.89774	993.8425	1007.2764
	1066.9621	1287.3911	1313.1935	1431.5381	1513.2025
	1537.2224	1675.75	<b>1714.4602</b>	1733.9242	1771.7366

Tabla 4.3: Bandas Raman características de Milenrama y Ranitidina.



### 4.1.5. Asignación de compuestos químicos

La acción farmacológica de la planta Milenrama ha sido determinada por los compuestos químicos que la conforman y por experimentos que se han realizado con la planta [60] [37].

Algunos compuestos químicos han reportado el espectro Raman (Tabla 4.4) de su forma pura. Al saber en qué bandas Raman emiten estos compuestos químicos fue posible identificar estos compuestos en el espectro Raman de la Milenrama (figura 4.10) y de la Ranitidina (figura 4.11).

De todos los compuestos químicos que se han encontrado en la Milenrama, algunos de ellos tienen su espectro Raman reportado, como se ve en la tabla 4.5.

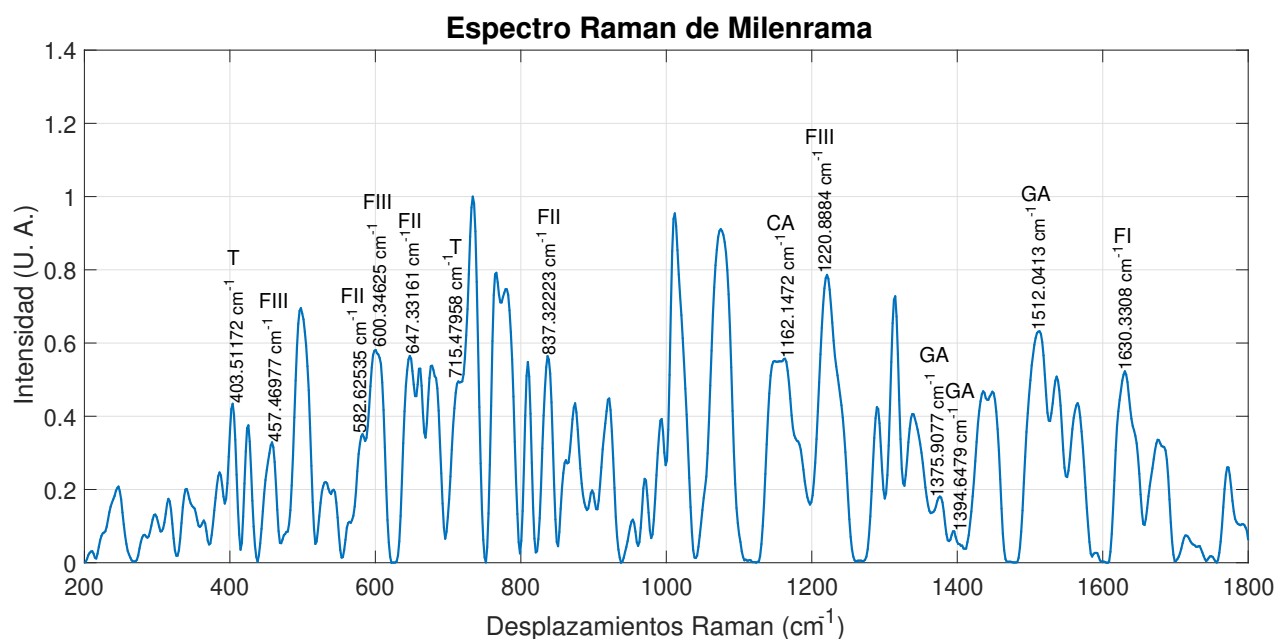


Figura 4.10: ER de Milenrama donde se identificó la presencia de flavonoides (FI, FII, FIII), taninos (T, GA) y ácido caféicos (CA). La nomenclatura se especifica en la tabla 4.5

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

<b>Compuestos Químicos</b>	<b>Propiedades Medicinales</b>
Azulenos	Antiinflamatorias
Flavonoides	Efecto aperitivo
	Eupéptico
Lactonas sesquiterpénicas	Colérico
	Hipoglucemiante moderado
	Antimicrobiano
	Hemostático
	Cicatrizante
Taninos (Ácido gálico)	Antimicótico
	Antiviral
	Antioxidante
Flavonoides y sus heterósidos	Antiespasmódicos
Ácido Cafeico	Antiparasitario y antioxidante

Tabla 4.4: Propiedades medicinales de la Milenrama de acuerdo con sus componentes químicos [60].

### 4.2. Discusión de resultados

Este trabajo comprobó la hipótesis de poder realizar un análisis de las propiedades moleculares del fármaco Ranitidina utilizando espectroscopía Raman y mostró que es-

## 4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Comp. Químico	Bandas Raman(cm <sup>-1</sup> )	Referencia
Flavonoide Crisina (FI)	1652, 1634, 1600, 1248, 1001,617, 607	[61]
Flavonoide Apigenina (FII)	1652, 1600, 1483, 1235, 1170, 831,745, 643, 588	[61]
Flavonoide Luteolina (FIII)	1582, 1502, 1220, 596,509, 458	[61]
Taninos (T)	1575, 1470, 1425, 1315, 1230, 1095, 960, 815, 710, 400, 255	[62]
Ácido Gálico (GA)	1379, 1516, 1470, 1400, 1250	[63]
Ácido Caféico (CA)	1505, 1464, 1157, 1121, 432, 508	[64]

Tabla 4.5: Raman características de compuestos químicos puros presentes en la Milenrama.

te espectro coincidía con el ya reportado, una vez logrado esto se caracterizó la planta medicinal Milenrama con espectroscopía Raman la cual hasta el momento no se encuentra reportada. Después de comprobar que se tenían únicamente las componentes de la señal que caracterizaban a la planta medicinal se calcularon los coeficientes de correlación entre planta medicinal y fármaco. Durante la investigación surgió la hipótesis de que se tendría un mayor coeficiente de correlación entre la planta medicinal y la Ranitidina compuesta con subsalicilato de bismuto, debido a que el subsalicilato de bismuto es usado junto a la Ranitidina como antibiótico, atacando directamente a la HP causante de la enfermedad Ácido-péptica, mientras que la Milenrama se sabe que posee propiedades antimicrobianas que le permite atacar a la bacteria HP. Se comprobó esta segunda hipótesis ya que en los coeficientes de correlación calculados entre medicamentos y plantas medicinales el mayor índice de correlación fue entre Milenrama y Ranitidina con subsalicilato de bismuto.

- ¿De qué manera la espectroscopía Raman podría ser una prueba para certificar

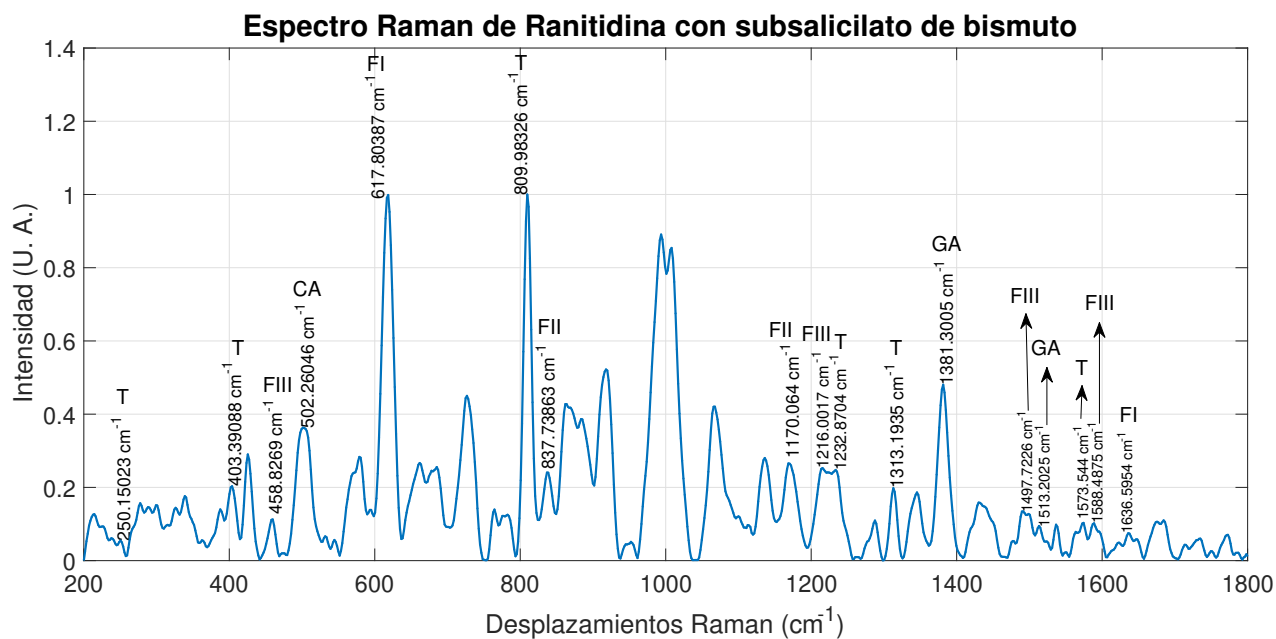


Figura 4.11: ER de Ranitidina donde se identificó la presencia de flavonoides (FI, FII, FIII), taninos (T, GA) y ácido caféicos (CA). La nomenclatura se especifica en la tabla 4.5

productos naturales basados en hierbas medicinales?

La espectroscopía Raman logra captar toda la información de las vibraciones moleculares que una muestra presenta, con ella se captan todos los compuestos químicos presentes en alguna muestra, además que complementar esta técnica con un método de análisis quimiométrico como Sparse se puede obtener la forma única del espectro de cada planta medicinal.

Esta metodología demuestra que cualquier producto puede ser caracterizado y que al obtener su firma espectral se puede usar como referencia para comparar con un segundo producto que prometa tener la misma fórmula que el primero. También se podría saber si está cumpliendo con las características necesarias para afirmar que el espectro es igual al obtenido y garantizar que tiene la misma composición molecular. Todo esto podría ser usado en controles de calidad.

- ¿Las plantas medicinales podrían ser una alternativa de los fármacos sin necesi-

dad de pasar por un estudio químico específico?

En efecto, las plantas medicinales si podrían ser una alternativa a los fármacos siempre y cuando se pudiera caracterizar su espectro Raman. La técnica de RS puede ser utilizada para encontrar plantas medicinales que contengan compuestos químicos similares a los que contiene el fármaco y que se desea igualar con tales plantas; todo esto como una primera selección para saber qué plantas tienen potencial de extraerles las propiedades medicinales de interés. No obstante, es importante mencionar que dichas plantas necesitarían pasar por estudios clínicos y pre-clínicos muy rigurosos.

### ***Descripción de los datos***

Tener una extracción diferente para cada muestra permitió observar las características principales de la planta medicinal, si bien algunos compuestos químicos presentes en la planta solo son solubles al agua y otros a etanol, principalmente, tener una preparación de la muestra por distintas técnicas permitió proveer características importantes en la forma del espectro Raman de la hierba al algoritmo. Una vez graficados los espectros Raman obtenidos se observó que de las bandas Raman 0 a 200 y de 1800 a 2000  $cm^{-1}$  se tenía información irrelevante y se decidió descartar esta información debido a que generaría un gasto computacional innecesario.

### ***Obtención de señales elementales***

El experimento fue realizado para 75 señales diferentes, en general se encontró la misma cantidad de átomos que caracterizaban a cada señal, los criterios de selección de átomos permitieron descartar más de 100 átomos que tenía información con poco aporte a la reconstrucción del espectro Raman de Milenrama. Después de reconstruir la señal fue necesario normalizar el espectro y remover la fluorescencia con el método Baseline (basado en el método Savitzky-Golay). Este método mostró un mejor resultado dejando los mínimos del espectro Raman en el eje x mientras que los otros dos métodos de remoción de fluorescencia propuestos en la metodología (Vancouver y MinMax) queda-

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

ban por encima o por debajo del eje x. La remoción de fluorescencia permitió observar de manera clara las bandas Raman características de este espectro, lo cual podrá ser una guía para todos aquellos que quieran medir esta planta con espectroscopía Raman, debido a que no se encuentra reportada en la literatura aún.

### ***Resultados de las pruebas con ruido sintético añadido***

Al ser el espectro Raman de Milenrama nuevo no se tenía un espectro de Referencia que permitiera observar si el algoritmo propuesto lograba encontrar características importantes inmersas en ruido, para poder probar la robustez del algoritmo se realizaron pruebas con ruido sintético añadido a las señales de prueba, los resultados mostraron que el algoritmo descartaba todo el ruido añadido y no era considerado en los átomos que describían a la señal, el proceso de selección de átomo se continuó sin cambios en comparación con el experimento sin ruido añadido y se llegó a la misma forma del ER de Milenrama, en futuras pruebas si se deseará saber si ciertas muestras contienen Milenrama entre sus componentes se podrá usar este algoritmo para determinar si los compuestos químicos se encuentran en la muestra analizada o no. El algoritmo propuesto ha sido usado como clasificador en otros trabajos, sin embargo, en este trabajo se quiere demostrar que usarlo para caracterización también es viable y que puede encontrar las características elementales de cualquier señal que se desee analizar.

### ***Comparación gráfica entre el fármaco y la planta medicinal***

El propósito de la tesis es observar la comparación entre un espectro Raman de Milenrama contra un ER de Ranitidina y analizar su nivel de correlación. Sin embargo, se reconocía que los espectros Raman de plantas medicinales pueden ser problemáticos debido a la gran cantidad de compuestos químicos que contienen, y el Espectro Raman de Milenrama tenía la desventaja de no haber sido reportado antes, esto hacía que aparte de limpiar la señal de ruido indeseado también se necesitaba tener la certeza de estar encontrando el espectro Raman correcto. Después de haber pasado por un proceso qui-

miométrico que permitió filtrar y caracterizar a la planta, se llegó a un espectro Raman que se pudo comparar directamente con el fármaco. Como experimento complementario se realizaron comparaciones con el medicamento fabricado por tres distintos tipos de laboratorios, lo que producen el medicamento y tiene la patente, los que producen el medicamento con la fórmula de la patente y realizan todas las medidas de seguridad llamados genéricos y los que producen los medicamentos con laboratorios de similares, que estos últimos tienen la característica de ser mucho más baratos en el mercado que las otras dos versiones. Además, se realizó la comparación con Ranitidina con subsalicilato de bismuto. De todas las comparaciones se corroboró que el compuesto de ranitidina tiene un grado de correlación con la Milenrama y se sugiere que es debido a que tanto la Milenrama como la ranitidina atacan a la bacteria HP.

El grado de correlación entre Milenrama y Ranitidina sola fue en promedio de 0.2 mientras que con la Ranitidina compuesta con subsalicilato de bismuto fue de 0.36, además se asociaron bandas Raman a los compuestos responsables de las propiedades medicinales de la milenrama y se encontró que existen bandas Raman características de los Taninos (responsables de las propiedades cicatrizantes) en ambos espectros (planta medicinal y fármaco).

La resolución que tenga cada espectrómetro influirá en que banda Raman se situarán los picos relevantes. Entre más puntos haya mejor será la reconstrucción. La resolución del equipo QE65000 es de 2 nm lo cual equivale a 5 desplazamientos Raman como tolerancia para el punto real de la banda Raman observada. El pico máximo que se encuentra en los datos con softwares computacionales no quiere decir que sea necesariamente la banda Raman física del compuesto, si no que eso puede variar por la distribución de los datos.





---

## Capítulo 5

# Conclusiones y trabajo futuro

---

### 5.1. Conclusiones

- Se encontraron bandas Raman características del medicamento en la planta medicinal (tabla 4.3), algunas de estas bandas Raman están reportadas como características de compuestos químicos responsables de las propiedades medicinales de la planta (tabla 4.5).
- Se sugiere que hay una mayor similitud entre Milenrama y Ranitidina con subsalicilato de bismuto, debido a que ambas atacan a la bacteria *Helicobacter Pylori*.
- Se caracterizó al ER de la planta medicinal Milenrama con Sparse, con esta caracterización se determinó la presencia de compuestos químicos que le proveen propiedades medicinales (figura 4.10). Se puede realizar este procedimiento a cualquier producto lo que cumpliría con la función de control de calidad, ya que permite saber si los productos naturales realmente contienen lo que anuncian en sus etiquetas y publicidad.
- Se podría evaluar el ER de productos comerciales que aseguran tener Milenra-

ma y con base en el ER de Milenrama, que se obtuvo en el presente trabajo, comprobar si verdaderamente esta presente.

- Esta metodología puede ser reproducido para cualquier otra planta y medicamento que estén asociados a la misma enfermedad que principalmente tengan las mismas vías de acción para enfermedades.
- El algoritmo propuesto Sparse es útil para caracterizar señales y determinar qué características representativas de la señal analizada se desean conservar, se puede utilizar como un filtro selectivo de las características que presenta la señal analizada. Los criterios de selección pueden ser modificados de acuerdo con lo que se desea observar, o no, en la reconstrucción de la señal.
- Se detectó la presencia de Taninos y Flavonoides en la planta medicinal, lo cual está asociado a las propiedades medicinales cicatrizantes y antibióticas del medicamento.

### **5.2. Trabajo a futuro**

Si bien es comprobable que la planta medicinal tiene similitudes con el fármaco aún es necesario determinar a qué compuesto químico corresponde cada banda Raman característica en cada espectro Raman estudiado. Esto permitirá tener un estudio completo sobre la funcionalidad química de ambos tratamientos y permitirá tener una mayor conciencia sobre su uso como tratamiento médico.

Además de ello, al igual que los fármacos, la planta debe pasar por prueba de toxicidad y dosificación, estas pruebas permitirán saber la reacción del tratamiento directamente sobre la enfermedad y cuales podrían ser los riesgos al consumirla, estas pruebas pueden ser realizadas con muestras biológicas a las que se les induzca la enfer-

medad y se use a la Milenrama como tratamientos de esta.

Se sugiere que se prueben algunos métodos de purificación de los extractos obtenidos a fin de tener el grupo de compuestos afines que permitan obtener mayores índices de correlación contra los compuestos farmacéuticos tradicionales.



---

# Bibliografía

---

- [1] Organización Mundial de la Salud, *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2013. OCLC: 881242676.
- [2] G. B. Mahady, S. L. Pendland, A. Stoia, F. A. Hamill, D. Fabricant, B. M. Dietz, and L. R. Chadwick, “In Vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders,” *Phytotherapy Research*, vol. 19, no. 11, pp. 988–991, 2005.
- [3] R. Raña Garibay, R. Raña Garibay, J. M. Villanueva Carreto, María de los Ángeles Avendaño Reyes, J. R. Nogueira de Rojas, and R. R. Jiménez Córdoba, “Guías clínicas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por úlcera péptica. Generalidades,” *Revista de Gastroenterología de México*, vol. 74, pp. 144–148, Apr. 2009.
- [4] A. Lifshitz Guinzberg, “Las alternativas farmacéuticas: Medicamentos innovadores, de patente, genéricos, similares y otros,” *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, vol. 54, no. 5, pp. 46–49, 2011.
- [5] D. M. Gates, H. J. Keegan, J. C. Schleter, and V. R. Weidner, “Spectral Properties of Plants,” *Applied Optics*, vol. 4, p. 11, Jan. 1965.
- [6] A. Paudel, D. Raijada, and J. Rantanen, “Raman spectroscopy in pharmaceutical product design,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 89, pp. 3–20, July 2015.

## Bibliografía

---

- [7] E. Fermi, "Anomalous Groups in the Periodic System of Elements," *Nature*, vol. 121, pp. 502–502, Mar. 1928.
- [8] R. Pérez Pueyo, *Procesado y Optimización de Espectros Raman mediante Técnicas de Lógica Difusa: Aplicación a la identificación de Materiales Pictóricos*. Ph.D. Thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, Jan. 2005.
- [9] J. M. G. Vallejo, "Espectroscopía infrarroja (I): Vibraciones moleculares," Dec. 2012.
- [10] "Raman spectroscopy," Sept. 2019. Page Version ID: 917174695.
- [11] R. M. Howard, *Principles of Random Signal Analysis and Low Noise Design*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., July 2002.
- [12] M. C. A. E. V. Luna, *Espectroscopia Raman en fluidos biológicos extracelulares*. PhD thesis, Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, Santa María Tonantzintla, Puebla, México, 2013.
- [13] A. Bansal, V. Chhabra, R. K. Rawal, and S. Sharma, "Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 4, pp. 223–233, Aug. 2014.
- [14] J. C. Martínez E., N. Chequer, K. Cruz-Solano, O. Elias-Campos, F. Flores-Amaro, L. del Carmen Luna-Chavez, D. Martínez-Pedroza, M. MartínezRangel, O. Murillo-Ayala, L. Paniagua-Picasso, A. Reyes-Pablo, and J. Solís, "Diferenciación de ácido acetilsalicílico utilizando la técnica de Espectroscopía Raman y el análisis de componentes principales," *Acta Universitaria*, vol. 22, p. 40, June 2012.
- [15] J. Mao and J. Xu, "Discrimination of herbal medicines by molecular spectroscopy and chemical pattern recognition," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 65, pp. 497–500, Oct. 2006.

- 
- [16] N. Li, Y. Wang, and K. Xu, "Fast discrimination of traditional Chinese medicine according to geographical origins with FTIR spectroscopy and advanced pattern recognition techniques," *Optics Express*, vol. 14, no. 17, p. 7630, 2006.
- [17] Y. Lai, Y. Ni, and S. Kokot, "Discrimination of Rhizoma Corydalis from two sources by near-infrared spectroscopy supported by the wavelet transform and least-squares support vector machine methods," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 56, pp. 154–160, July 2011.
- [18] Y. Chen, M.-Y. Xie, Y. Yan, S.-B. Zhu, S.-P. Nie, C. Li, Y.-X. Wang, and X.-F. Gong, "Discrimination of Ganoderma lucidum according to geographical origin with near infrared diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques," *Analytica Chimica Acta*, vol. 618, pp. 121–130, June 2008.
- [19] Y.-A. Woo, H.-J. Kim, K.-R. Ze, and H. Chung, "Near-infrared (NIR) spectroscopy for the non-destructive and fast determination of geographical origin of Angelicae gigantis Radix," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, pp. 955–959, Jan. 2005.
- [20] A. O. Zalacain, "Near-infrared spectroscopy in saffron quality control," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 24, pp. 9337–9341, 2005. PMID: 16302744.
- [21] L. Wang, F. S. C. Lee, and X. Wang, "Near-infrared spectroscopy for classification of licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) and prediction of the glycyrrhizic acid (GA) content," *LWT - Food Science and Technology*, vol. 40, pp. 83–88, Jan. 2007.
- [22] X. Duan, D. Zhang, L. Nie, and H. Zang, "Rapid discrimination of geographical origin and evaluation of antioxidant activity of *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* by Fourier transform near infrared spectroscopy," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 122, pp. 751–757, Mar. 2014.
- [23] D. Y. Lee, S. H. Kim, Y. C. Kim, H. J. Kim, and S. H. Sung, "Discrimination of *Scrophulariae Radix* according to geographical origin and determination of active constituents by
-

## Bibliografía

---

- near infrared spectroscopy (NIRS),” *Microchemical Journal*, vol. 99, pp. 213–217, Nov. 2011.
- [24] W. Li, L. Xing, Y. Cai, and H. Qu, “Classification and quantification analysis of Radix scutellariae from different origins with near infrared diffuse reflection spectroscopy,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 55, pp. 58–64, Jan. 2011.
- [25] J. Zhu, B. Chen, and H. Yan, “Rapid identification of peucedanum geo-graphical growing areas through near infrared spectroscopy,” pp. 1772–1776, IEEE, 2011.
- [26] Y. Bai, X. Wang, J. Lei, and et al, “Discrimination of Fructus forsythiae according to geographical origin with near-infrared spectroscopy,” pp. 175–178, IEEE, 2012.
- [27] B. Li, Y. Wei, H. Duan, L. Xi, and X. Wu, “Discrimination of the geographical origin of Codonopsis pilosula using near infrared diffuse reflection spectroscopy coupled with random forests and k-nearest neighbor methods,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 62, pp. 17–22, Sept. 2012.
- [28] W. Li, Z. Cheng, Y. Wang, and H. Qu, “Quality control of Lonicerae Japonicae Flos using near infrared spectroscopy and chemometrics,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 72, pp. 33–39, Jan. 2013.
- [29] H.-K. Wu and S.-J. Sheu, “Capillary electrophoretic determination of the constituents of paeoniae radix,” *Journal of Chromatography A*, vol. 753, pp. 139–146, Nov. 1996.
- [30] M. Elad, *Sparse and redundant representations: from theory to applications in signal and image processing*. New York: Springer, 2010. OCLC: ocn646114450.
- [31] J. Marovac, “Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco,” *Revista médica de Chile*, vol. 129, pp. 99–106, Jan. 2001.
- [32] “Farmacología general. Una guía de estudio | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical.”



- [33] D. A. Domínguez Pérez and M. N. Pérez Rul, “Los medicamentos similares:¿ una nueva clase de medicina o sólo una estrategia comercial?,” 2009.
- [34] B. J. Marshall, D. B. McGeachie, P. A. Rogers, and R. J. Clancy, “Pyloric Campylobacter infection and gastroduodenal disease,” *Medical Journal of Australia*, vol. 142, no. 8, pp. 439–444, 1985.
- [35] V. V. Spain, “Ranitidina.”
- [36] A. Bye, J. Evans, D. Huckle, and P. J. Rue, “(54) Ranitidine Compositions,” p. 3.
- [37] S. I. Ali, B. Gopalakrishnan, and V. Venkatesalu, “Pharmacognosy, Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Achillea millefolium* L.: A Review,” *Phytotherapy Research*, vol. 31, no. 8, pp. 1140–1161, 2017.
- [38] S. F. Zaidi, J. S. Muhammad, S. Shahryar, K. Usmanghani, A.-H. Gilani, W. Jafri, and T. Sugiyama, “Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 141, pp. 403–410, May 2012.
- [39] L. S. Taylor and F. W. Langkilde, “Evaluation of solid-state forms present in tablets by Raman spectroscopy,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 89, no. 10, p. 12, 2000.
- [40] D. Pratiwi, J. Fawcett, K. C. Gordon, and T. Rades, “Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 54, pp. 337–341, Nov. 2002.
- [41] F. C. Thorley, K. J. Baldwin, D. C. Lee, and D. N. Batchelder, “Dependence of the Raman spectra of drug substances upon laser excitation wavelength,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 37, pp. 335–341, Jan. 2006.
- [42] L. Gómez Osuna, “Aplicación de la espectroscopia Raman al estudio analítico de fármacos,” Sept. 2011.

## Bibliografía

---

- [43] J. Arruabarrena Gamboa, *Espectroscopia NIR y Raman para el control de calidad en industria farmacéutica*. Universitat Autònoma de Barcelona,, 2014.
- [44] A. Villanueva-Luna, J. Castro-Ramos, and C. M. Ortiz-Lima, “Raman spectroscopy and its applications,” *Optica Pura y Aplicada*, vol. 46, Feb. 2013.
- [45] M. C. e. a. Samuel, “Análisis de medicamentos mediante espectroscopía Raman,”
- [46] P. Wang and Z. Yu, “Species authentication and geographical origin discrimination of herbal medicines by near infrared spectroscopy: A review,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 5, pp. 277–284, Oct. 2015.
- [47] P. Rösch, W. Kiefer, and J. Popp, “Chemotaxonomy of mints of genus *Mentha* by applying Raman spectroscopy: Mint Chemotaxonomy by Raman Spectroscopy,” *Biopolymers*, vol. 67, no. 4-5, pp. 358–361, 2002.
- [48] H. Schulz, “Rapid analysis of medicinal and aromatic plants by non-destructive vibrational spectroscopy METHODS,” *Acta Horticulturae*, pp. 181–187, Feb. 2005.
- [49] H. Schulz, G. Özkan, M. Baranska, H. Krüger, and M. Özcan, “Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 39, pp. 249–256, Oct. 2005.
- [50] A. T. P. J. S. Joshi, Bhawani Datt Srivastava and A. Ayala, “A combined experimental (IR, Raman and UV–Vis) and quantum chemical study of canadine,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 191, pp. 249–258, Feb. 2018.
- [51] S. Chen, X. Lin, C. Yuen, S. Padmanabhan, R. W. Beuerman, and Q. Liu, “Recovery of Raman spectra with low signal-to-noise ratio using Wiener estimation,” *Optics express*, vol. 22, no. 10, pp. 12102–12114, 2014.
- [52] X. Fan, X. Wang, X. Wang, Y. Xu, J. Que, H. He, X. Wang, and M. Tang, “A reconstruction algorithm based on sparse representation for Raman signal processing under high background noise,” *Journal of Instrumentation*, vol. 11, pp. P02002–P02002, Feb. 2016.

- [53] D. Wu, M. Yaghoobi, S. Kelly, M. Davies, and R. Clewes, "A sparse regularized model for Raman spectral analysis," in *2014 Sensor Signal Processing for Defence (SSPD)*, pp. 1–5, IEEE, 2014.
- [54] C. E. Núñez, "Extracciones con equipo Soxhlet," *Obtenido el*, vol. 15, 2008.
- [55] S. Carlos, "Manual básico de liofilización," p. 8.
- [56] J. R. Vargas, "Extracción con fluidos supercríticos: aplicaciones de interés farmacéutico," p. 36.
- [57] "Figura 6: Esquema de un equipo Soxhlet tradicional. Tomado de:...."
- [58] H. A.-R. L. G.-B. J. A. Díaz-Hernández, R. Peregrina-Barreto and A. E. Ortiz-Esquivel, "Automatic stellar spectral classification via sparse representations and dictionary learning," *Experimental Astronomy*, vol. 38, pp. 193–211, Nov. 2014.
- [59] M. Aharon, M. Elad, and A. M. Bruckstein, "On the uniqueness of overcomplete dictionaries, and a practical way to retrieve them," *Linear algebra and its applications*, vol. 416, no. 1, pp. 48–67, 2006.
- [60] J. Bruneton, *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. 2001.
- [61] C. Corredor, T. Teslova, M. V. Cañamares, Z. Chen, J. Zhang, J. R. Lombardi, and M. Leona, "Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 49, pp. 190–195, Mar. 2009.
- [62] Y. Lei, Z. Tang, R. Liao, and B. Guo, "Hydrolysable Tannin as Environmentally Friendly Reducer and Stabilizer for Graphene Oxide," p. 5, 2011.
- [63] A. S. Lee, P. J. Mahon, and D. C. Creagh, "Raman analysis of iron gall inks on parchment," *Vibrational Spectroscopy*, vol. 41, pp. 170–175, Aug. 2006.
- [64] F. de Souza and A. Spinelli, "Caffeic acid as a green corrosion inhibitor for mild steel," *Corrosion Science*, vol. 51, pp. 642–649, Mar. 2009.