



INAOE

**Identificación de estrés a
través de biomarcadores
salivales mediante
Espectroscopía Raman y su
asociación con el inventario de
estrés académico.**

Por:

Lic. Rebeca María Bruzual Roa

Tesis sometida como requisito
parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN LA
ESPECIALIDAD DE ÓPTICA**

En el:

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

Agosto 2022

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

Dr. Jorge Castro Ramos. INAOE

Dr. Aarón Muñoz. UC

©INAOE 2022

Derechos Reservados

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



RESUMEN

En esta tesis se determina el estrés académico mediante biomarcadores salivales, aplicando la técnica de espectroscopía Raman y del inventario psicológico SISCO. Usamos el cortisol y la melatonina como biomarcadores relacionados al estrés académico; identificando las bandas espectrales de los biomarcadores en las muestras de saliva de un conjunto de voluntarios, obteniendo la correlación con el nivel de estrés adquirido por el inventario SISCO. A estos aplicamos el filtrado de Whittaker para limpiar la señal y para analizar el espectro Raman con el menor ruido posible, lo que permitió obtener las bandas espectrales más notables. Medimos muestras de saliva de voluntarios en dos tiempos, sesión 1 sin inducción de estrés y sesión 2 con inducción de estrés. A lo adquirido, le calculamos los coeficientes de correlación lineal de Pearson, y hallamos las bandas principales de ambos biomarcadores. Los resultados del instrumento psicológico clasificaron a los voluntarios por su nivel de estrés: leve, moderado y severo. Finalmente, analizamos los componentes principales, teniendo como observadores el número de voluntarios por biomarcador; como variables iniciales las bandas espectrales principales; y la clasificación del nivel de estrés, analizando así todas las variables en conjunto; logrando clasificarlos cuantitativamente entre la intensidad de las bandas espectrales de saliva y el nivel de estrés.

ABSTRACT

We conducted a study to determine academic stress by means of salivary biomarkers, applying the Raman spectroscopy technique and the SISCO psychological inventory. We used cortisol and melatonin as biomarkers related to academic stress; identifying the spectral bands of the biomarkers in the saliva samples of a set of volunteers, obtaining the correlation with the level of stress acquired by the SISCO inventory. We applied Whittaker filtering to clean the signal and to analyze the Raman spectrum with as little noise as possible, which allowed us to obtain the most notable spectral bands. We measured saliva samples from volunteers at two times, session 1 (without stress induction) and session 2 (with stress induction). To the acquired data, we calculated Pearson's linear correlation coefficients, and found the main bands of both biomarkers. The results of the psychological instrument classified the volunteers by their stress level: mild, moderate and severe. Finally, we analyzed the main components, having as observers the number of volunteers per biomarker; as initial variables the main spectral bands; and the classification of the stress level, thus analyzing all the variables as a whole; managing to classify them quantitatively between the intensity of the saliva spectral bands and the stress level.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, por siempre estar conmigo, por siempre darme la fortaleza de continuar hasta en los días más oscuros, por permitirme estar aquí y lograr llevar esta investigación experimental en tiempo postpandemia. Gracias por las personas que colocó en mi camino, que de una u otra manera me brindaron su apoyo incondicional.

A mis padres y hermanos, que, aunque no estamos juntos ahorita, siempre me apoyaron mucho a la distancia, dándome ánimo y fortaleza para continuar.

A mis asesores Dr. Jorge Castro Ramos, por toda la paciencia que me ha tenido, por todo el apoyo académico brindado, por la oportunidad de formar parte del GIOB, gracias por siempre exigirme lo mejor, por enseñarme sobre la perseverancia y excelencia académica; Dr. Aaron Muñoz por sus consejos, apoyo académico y emocional, por apostar por mí y guiarme todo este camino.

Dra. Moyaho Bernal por su apoyo y compromiso en el trabajo de investigación y sus aportes en el área odontológica para la toma de muestras, además de permitir establecer enlaces con la BUAP, al Dr. Ismael Juárez Díaz por su apoyo en la captación de voluntarios y apoyo en el trabajo de investigación.

A mis compañeros de grupo, integrantes del GIOB, Héctor Nahum Chavarría, Freddy Narea, Caroleny Villalba por su disposición de apoyarme, cuando más lo necesitaba en el proceso de mi trabajo.

Gracias, al INAOE por recibirme en la maestría y haberme proporcionado el apoyo económico en todo mi tiempo de la maestría, a la BUAP por permitirme el ingreso a las instalaciones de la facultad de Estomatología y realizar la recolección de las muestras.

A mis sinodales, Dr. Félix Aguilar y Dra. Anabel Sánchez, por sus valiosas correcciones y sugerencias para la mejor estructura de este trabajo

DEDICATORIA

A Dios

Por qué sin su voluntad, nada se fuera dado, como se dio, desde mi viaje de Venezuela a México, hasta culminar mi investigación en tiempo y forma.

A mis padres, **Carlos Bruzual y María Roa**

Por ser mi razón de ser, por todos los consejos y apoyo en todo este tiempo académico, por demostrarme que si se quiere se puede. Por sus palabras sabias, aunque a la distancia llegaron como un abrazo cuando más lo necesité.

A mi hermana, **Nathalia Bruzual**

Por siempre estar a distancia de una llamada, por siempre estar ahí, por su apoyo incondicional.

A Dr. Aaron Muñoz por darme el impulso de continuar en este maravilloso mundo de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Introducción.....	5
1.2 Limitantes de la investigación.....	6
1.3 Preguntas de investigación	6
1.4 Hipótesis.....	7
1.5 Objetivos generales y específicos.....	7
Referencias	8
CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	11
2.1. Saliva.....	11
2.2. Biomarcadores salivales	14
2.3 Estrés.....	17
2.4 Instrumento Psicológico	18
2.5 Referencias.....	20
CAPÍTULO 3. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	23
3.1 Espectroscopía Raman	22
3.2 Tipos de Ruidos Raman.....	25
3.3 Forma de vibraciones de las moléculas.....	26
3.4 Aplicaciones del efecto Raman.....	27
3.5 Referencias.....	29
CAPÍTULO 4 FUNDAMENTOS MATEMÁTICOS.....	30
4.1 Coeficiente de correlación.....	30
4.2 Análisis de componentes principales.....	31
4.3 Referencias.....	38
CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39

5.1 Ubicación espacio-temporal.....	39
5.2 Población de estudio.	39
5.3 Criterios de selección.	40
5.4 Evaluación psicológica.....	41
5.5 Muestra biológica sujeta a estudio.	42
5.6 Estandarización para la técnica de recolección de saliva.....	42
5.7 Arreglo experimental.....	43
5.8 Software SpectraSuite.....	45
5.9 Obtención de los espectros Raman	47
5.10 Aplicación del filtrado en Espectros Raman.....	47
5.11 Análisis de Espectros Raman.....	48
5.12 Aspectos Bioéticos.....	49
5.13 Referencias.....	51
CAPÍTULO 6. RESULTADOS	52
6.1 Resultados.....	52
6.2 Caracterización del biomarcador cortisol	53
6.3 Caracterización del biomarcador melatonina.....	56
6.4 Adquisición y filtrado de espectros raman de las muestras de saliva.....	58
6.5 Identificación de los biomarcadores en las muestras de saliva.....	62
6.6 Clasificación de voluntarios por nivel de estrés.....	65
6.7 Análisis de las bandas espectrales de los biomarcadores.....	67
6.8 Clasificación a través del análisis de componentes principales.....	72
6.9 Conclusiones del capítulo	79
6.10 Referencias.....	80
CONCLUSIONES	81
TRABAJO FUTURO	82
APÉNDICE A	83
APÉNDICE B	84

Anexo 1. Formato de consentimiento informado.....	84
Anexo 2. Historias clínicas.....	85
Anexo 2. Parámetros clínicos periodontales.....	86
APÉNDICE C	87

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Localización anatómica de los tres pares de glándulas salivales mayores y localización anatómica de los tres pares de glándulas salivales menores	12
2.2 Estructura química del biomarcador cortisol	16
2.3 Estructura química del biomarcador melatonina.....	16
3.1. Combinación de campo eléctrico y campo magnético	24
3.2 Tipos de ruidos	26
3.3 Tipos de vibraciones moleculares.....	27
4.1 Relación entre el valor y signo del coeficiente de correlación lineal.....	31
4.2 Muestra los datos originales del ejemplo de ACP.....	35
4.3 Una gráfica de los datos normalizados, ejemplo del ACP.....	36
4.4 Muestra gráfica del nuevo conjunto de puntos de dato, ejemplo del ACP.....	37
5.1 Método de babeo pasivo.....	43
5.2 Componentes del espectrómetro.....	43
5.3 Configuración experimental para la adquisición de espectros Raman.....	45
5.4 Pantalla del Software Spectra Suite.....	46
5.5 Espectro Raman resultado empleando el filtro de Whitaker-Henderson.....	48
5.6 Diagrama de flujo, del proceso experimental para analizar las variables de entrada.....	50
6.1 Espectro suavizado del biomarcador cortisol.....	53
6.2 Espectro filtrado del biomarcador cortisol.....	53
6.3 Espectro Raman con picos de mayor intensidad del biomarcador cortisol.....	54
6.4 La estructura del cortisol (a) y las convenciones de identificación de anillos y numeración de carbonos presente en el cortisol(b).....	55
6.5 Espectro suavizado del biomarcador melatonina.....	56
6.6 Espectro filtrado del biomarcador melatonina.....	56
6.7 Espectro Raman con picos de mayor intensidad del biomarcador melatonina..	57
6.8 Espectro Raman suavizado de la muestra de saliva	59
6.9 Espectro Raman filtrado de la muestra de saliva	59
6.10 Espectro Raman con picos de mayor intensidad de la muestra de saliva...	60
6.11 Muestra Espectro Raman de cortisol (curva azul) y espectro Raman de muestra de saliva (curva naranja).....	62

6.12 Muestra Espectro Raman de melatonina (curva azul) y espectro Raman de muestra de saliva (curva naranja)	64
6.13 Muestra las componentes principales 1 y 8, de los 32 voluntarios	73
6.14 Muestra las componentes principales 5 y 8, de los 32 voluntarios.....	74
6.15 Muestra las componentes principales 1 y 5, de los 32 voluntarios.....	76
6.16 Muestra las componentes principales 4 y 5, de los 32 voluntarios.....	76
6.17 Muestra las componentes principales 1 y 12, de los 32 voluntarios	78
6.18 Muestra las componentes principales 11 y 12, de los 32voluntarios	78

ÍNDICE DE TABLAS

2.1 Tipos de saliva según la glándula secretora	12
4.1 Datos originales y Datos ajustados, ejemplo de APC.....	35
4.2 Datos transformados, ejemplo de APC	37
6.1 Picos Raman experimental de biomarcador cortisol y picos reportados en la literatura	55
6.2 Picos Raman experimental de biomarcador melatonina y picos reportados en la literatura.....	58
6.3 Picos Raman experimental de muestra de saliva	60
6.4 Bandas espectrales Raman de cortisol, identificadas en los espectros Raman de las muestras de saliva de los voluntarios	63
6.5 Bandas espectrales Raman de melatonina, identificadas en los espectros Raman de las muestras de saliva de los voluntarios.....	64
6.6 Nivel de estrés asociado a cada voluntario, obtenidos en el inventario psicológico SISCO.....	66
6.7 Nivel de estrés e intensidad de la banda espectral $1074 \pm 20 [cm^{-1}]$	67
6.8 Coeficientes de correlación por sesión para las bandas espectrales del biomarcador cortisol.....	69
6.9 Coeficientes de correlación por sesión para las bandas espectrales del biomarcador melatonina.....	71

CAPÍTULO 1

Introducción

Actualmente, se ha comenzado a indagar sobre el valor de la saliva como herramienta de diagnóstico de laboratorio, y recientemente para su empleo como biomarcadores. [1.1]

Las enfermedades psicosomáticas causadas por fuertes procesos emocionales como la depresión, la ansiedad o el estrés, con el tiempo se transforman en una depresión del sistema inmunológico y, por tanto, el ser humano se hace más vulnerable ante agentes externos. Existe un interés en la literatura psicológica con respecto a dichas enfermedades psico-socio-emocionales, las cuales han sido consideradas como una respuesta emocional paradigmática que han ayudado a la investigación de las emociones en el ámbito de la ciencia básica. [1.2]

De todas las enfermedades psicosomática en este estudio se abordará al estrés. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se refiere al conjunto de alteraciones que se producen en el organismo como respuesta física ante determinados estímulos repetidos. [1.3] Actualmente, en psiquiatría, el principal método para diagnosticarlo es la observación y las entrevistas médicas realizadas con el paciente y sus familiares directos. [1.4] Sin embargo, lo ideal sería que se pudiera complementar el diagnóstico para tener una mejor eficacia en la terapia. [1.5] Debido a la multitud de causas que generen estrés, así como la superposición de síntomas con los de otros trastornos mentales, dificultan a menudo a los psiquiatras hacer un diagnóstico adecuado y aplicar un tratamiento eficaz. [1.6]

Son necesarios más estudios para clarificar la relación exacta entre los biomarcadores salivales y el estrés, se ha observado que sustancias como el cortisol, la melatonina, la α -amilasa, la cromogranina A o la inmunoglobulina A son útiles, solas o combinadas, en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con estrés, existiendo una relación directa entre exposición a estrés con cambios en los niveles de estos biomarcadores. [1.7]

El cortisol también llamado hidrocortisona es una hormona esteroidea o glucocorticoide producido por las glándulas suprarrenales que se libera como respuesta al estrés. Entre sus

funciones destacan el aumento de glucemia a través de la gluconeogénesis, la supresión del sistema inmune, la lipólisis o la estimulación de la reabsorción ósea. [1.8] En condiciones fisiológicas estables se ha observado que el cortisol salival está en equilibrio con el cortisol libre plasmático y es independiente del flujo salival, por lo que puede utilizarse para la detección y el seguimiento de ciertas patologías. [1.9]

La melatonina, producida a partir de la serotonina en el cuerpo pineal, guía el cuerpo de una persona a la fase nocturna. Esto ocurre porque la melatonina transmite información óptica relacionada con la duración del día y el ciclo de luz y oscuridad al cuerpo para controlar el mecanismo de los ritmos circadianos. Se conoce que las alteraciones del ritmo circadiano, incluido el insomnio, aumentan el nivel de estrés psicológico y causan depresión. Un alto nivel de estrés psicológico podría causar estrés oxidativo, lo que conduce a una serie de trastornos. [1.10]

Se proponen en el estudio para la identificar el estrés, conocer la concentración de cortisol y melatonina en saliva, entonces el interés de indagar sobre investigaciones anteriores que sirva de referencia.

En el año 2006 Fiocco [1.11] et al., realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la clasificación del ciclo diurno del cortisol en una población de cuarenta y dos personas adultos mayores con quejas subjetivas de memoria y / o informes de síntomas depresivos; para evaluar la función cognitiva en estos individuos se tomaron muestras de saliva durante un período de 2 días posteriormente se les pidió que se sometieran a una evaluación neuropsicológica que evalúa la memoria a corto plazo, la memoria declarativa y el lenguaje. Sus resultados mostraron que el 69% de la muestra presentó un ciclo plano de cortisol salival durante un período de 2 días, mientras que el 19% un patrón inconsistente y el 12% presentó un patrón típico. Además, encontraron una relación entre el aumento de secreción de cortisol con pérdida de memoria y depresión, las cuales se relacionan con el estrés. Ellos concluyeron que los adultos mayores con quejas de problemas de memoria y/o síntomas depresivos no presentan el perfil típico del ciclo de cortisol diurno, y brindan una visión preliminar de cómo el perfil de cortisol diurno se relaciona con la función cognitiva durante el envejecimiento humano. [1.11]

En el mismo año Toda et al., [1.12] realizaron una investigación con el objetivo de evaluar

el efecto de alivio del estrés de los baños de spa a través de medir los marcadores de estrés salival como son el cortisol y cromogranina A (CgA); la muestra que se tomó fue de 12 estudiantes masculinos sanos en la Universidad Osaka; el método de estudio fue la recolección de muestras de saliva antes y después del baño de spa, y 30 minutos después usando Salivette (Sarstedt Co. Ltd., Nümbrecht, Alemania), los niveles de cortisol salival y CgA fueron determinados por ELISA; entre los resultados obtenidos, el nivel de cortisol salival disminuyó después de un lavado y se categorizó a los sujetos en dos grupos: el grupo de alto estrés, el cual mostró niveles más bajos de CgA salival después de un lavado, mientras que el grupo de bajo estrés mostró niveles más altos de CgA salival en la misma condición. Por lo tanto, se concluyó que el baño de spa tiene un efecto moderado sobre el alivio del estrés. [1.12]

En el 2013, Ito et al., [1.10] llevaron a cabo un proceso de comparaciones de los niveles de melatonina en saliva con diferentes factores, incluida la calidad del sueño, el estado y el rasgo de ansiedad y la depresión, con el objetivo de examinar si existe una relación entre la melatonina, presuntamente asociada con el sueño, y el estrés psicológico. La muestra fue de 48 estudiantes japonesas sanas (edad media: 21 años) sin síntomas subjetivos de trastornos del sueño que asistían a la misma facultad de la misma universidad y compartían un estilo de vida común. Los métodos de recolección de saliva se realizó en la fase de proliferación (o fase folicular del ciclo ovárico), en la que las mujeres suelen estar en la condición mental más estable, para evitar que el ciclo estral influya en los resultados; para examinar los niveles de melatonina salival en la vida diaria, los participantes se sometieron a muestreo diurno en una posición sentada antes de almorzar (entre las 11:00 y las 13:00); el muestreo de saliva se realizó durante tres minutos, utilizando un recipiente Salivette (SARSTEDT, Alemania) sin ácido cítrico y luego analizada por un kit de inmunoensayo ligado a enzimas (Buehlmann Direct Saliva Melatonin ELISA (EK-DMS)); para la evaluación de la calidad del sueño se evaluó mediante el PSQI, un cuestionario desarrollado por Buysse y la evaluación de la ansiedad se evaluó en una escala mediante un cuestionario. El STAI es un método de prueba desarrollado por Spielberger en 1983; para la evaluación de la depresión se usó una escala usando el cuestionario SDS, es una escala basada en la autoevaluación desarrollado por Zung; Entre los resultados se obtuvo que los niveles de melatonina salival medidos durante el día y antes de acostarse fueron más altos en las mujeres con una puntuación alta de depresión, en

comparación con aquellas con una puntuación baja, y hubo una correlación entre las puntuaciones de depresión y la saliva. Se concluyó, por tanto, que cuando una persona se encuentra bajo estrés psicológico, se reduce la acción de la melatonina como ligando sobre su receptor. Lo que significa que el estrés psicológico puede inducir estrés oxidativo en el cuerpo. [1.10]

En 2021, Tammayán et al., [1.13] trabajaron en una investigación que entre sus objetivos estuvo comparar las respuestas de biomarcadores de estrés salival comúnmente investigados que representan la actividad hipotálamo-pituitaria-suprarrenal cortisol, la metodología experimental que utilizaron fue someter a los participantes a una presentación oral académica para inducir un nivel alto de estrés en dos ocasiones como presentador y público. La muestra que utilizaron para este estudio fueron veinte estudiantes de posgrado en odontología. La saliva se recolectó dos veces: antes de asistir al seminario y después de una presentación académica (para presentadores) o durante el seminario (para audiencia). Entre los resultados más importantes mostraron que los niveles del biomarcador, fue significativamente mayores en el grupo presentador en comparación con el grupo audiencia. Estos resultados sugieren una reactividad más sensible al estrés académico de cortisol. [1.13]

En 2021 Filipy Borghi et al [1.14], realizaron una investigación que tuvo como objetivo evaluar y asociar el estrés percibido, la resiliencia y el cortisol salival en estudiantes de farmacia en época de exámenes, la metodología que aplicaron fue, instruir a los participantes para que recolectaran por sí mismos muestras de saliva en sus hogares. La ritmicidad del cortisol se evaluó mediante colecciones de saliva en cinco momentos del día; en dos días diferentes: un día de examen (día de estrés) y un día de descanso, que podía ser antes o después del día del examen académico. El tamaño de la muestra fue de 79 estudiantes mayores de 18 años de ambos sexos, que estuvieran cursando entre 1° y 4° año de la carrera, los análisis psicológicos los realizaron con La Escala de Estrés Percibido de Sheldon Cohen y para analizar el cortisol las muestras se centrifugaron a 2800 rpm, a 4 °C y durante 20 min y se analizaron con el kit ELISA comercial. Entre los resultados se obtuvo que las escalas de estrés percibido y resiliencia, esta población obtuvo un estrés psicosocial alto y una resiliencia intermedia. exhibieron ritmicidad de cortisol durante el día, con valores más altos en la mañana y una disminución significativa a lo largo del día en ambos días y se concluyó existe un aumento significativo del cortisol durante el día de exámenes entre los estudiantes,

lo que refleja una producción total de cortisol (AUC) significativamente mayor el día de los exámenes en comparación con el día de descanso. [1.14]

En 2022 Kacper Nijakowski et al, [1.15] llevaron a cabo un estudio preliminar que tuvo como objetivo indicar los posibles vínculos entre las alteraciones en los parámetros bioquímicos salivales (como el cortisol y el estado antioxidante total) y los diferentes niveles de estrés que los acompañan en los estudiantes de odontología durante el año académico. La metodología que utilizaron fue recoger muestras de saliva sin estimulación, por la mañana y por la tarde en cuatro tiempos diferentes: a mediados del año académico, durante el período de exámenes, al comienzo del año académico y a mediados del año académico siguiente y para la parte psicológica determinaron el estrés experimentado actualmente en la escala de calificación numérica de estrés-11. [1.15] La muestra que estudiaron fue de 20 estudiantes de odontología, de ambos sexos, de 20 a 26 años de edad. Para el análisis de las muestras de saliva las centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm con Eppendorf Centrifuge 5702, luego separaron en tubos Eppendorf y congelaron a -80 °C hasta su determinación en laboratorio; para las concentraciones de marcadores seleccionados (cortisol y estado antioxidante total) en la saliva la determinaron utilizando los kits de diagnóstico apropiados (respectivamente, cortisol salival: DRG Diagnostics y capacidad antioxidante humana total: SunRed). Entre los resultados obtuvieron que los niveles de cortisol salival vespertino fueron significativamente más bajos que los niveles matutinos.; además que las concentraciones matutinas de cortisol fueron ligeramente más altas durante el período de exámenes. Las conclusiones más significantes fueron que el cortisol matutino en la saliva podría ser un marcador potencial del estrés percibido en estos estudiantes. [1.15]

En los últimos años se está introduciendo en el campo del diagnóstico médico, técnicas que, mediante el uso de la luz, permiten analizar biomarcadores. Estas técnicas ópticas son rápidas, objetivas y no cruentas, por lo que cumplen las características que se requieren para su aplicación en el diagnóstico de enfermedades a través de la saliva. La espectroscopía Raman, presenta un enorme potencial para realizar las denominadas biopsias ópticas. [1.16]

Se han realizados trabajos previos en los que ha sido estudiado los biomarcadores cortisol y melatonina en saliva desde un enfoque químico a través de estudiar sus concentraciones con kits de reactivos, sin embargo, no se han realizado estudios, donde analicen los biomarcadores cortisol y melatonina en saliva, desde el enfoque óptico empleando

espectroscopía Raman, como se propone en la presente investigación.

1.1 LIMITANTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los espectros, que se adquieren del espectrómetro Raman, presentan ruido de diferentes tipos, como son: ruido de instrumentación, ruido por fluorescencia, ruido del cosmos, y ruido por fuentes externas. Para obtener la información correcta, del espectro que se adquirió al medir la muestra, es de vital importancia eliminar la mayoría de estos ruidos. [1.17] Debido a que en una señal limpia se podrán observar las bandas Raman características de la muestra. Ahora en la investigación, se tomó en cuenta que la muestra es un fluido biológico, como es la saliva humana no estimulada, constituida por diversos compuestos orgánicos e inorgánico, y cada uno de ellos tiene una firma espectral Raman característica. Dos son los biomarcadores que serán estudiados y analizados en esta tesis, el biomarcador cortisol y melatonina ambos tienen sus firmas espectrales Raman, con las cuales se podrá identificar el estrés académico, en las muestras de saliva de los participantes. Se conoce la relación de los biomarcadores cortisol y melatonina con el estrés, pero aún desde la perspectiva de la espectroscopía, no se han analizado estos biomarcadores en saliva y por lo tanto es de importancia comparar los espectros Raman, de los biomarcadores en su estado puro y los espectros Raman de la saliva de los voluntarios, además de verificar con la literatura las bandas espectrales Raman características de los biomarcadores. El análisis matemático a utilizar será, análisis de componentes principales, para lograr obtener una clasificación de los participantes, a través de los espectros Raman de la saliva y los resultados adquiridos por el instrumento psicológico. Por último, para calcular el tamaño de la muestra deseada, para el estudio, se consideró; un nivel de confianza del 95% con una desviación media de 1.96, un margen de error o exactitud del 5% y población de 40. El tamaño de la muestra calculado era de $N= 37$. [1.18] Pero solo se obtuvo un N de 32, debido a que algunos sujetos no lograron cubrir los criterios de selección. Posterior se revisó en la literatura y un N de 32 está entre el rango aceptable, con una precisión del 80%.

1.2 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Se percibirán las bandas espectrales Raman de los biomarcadores cortisol y melatonina en los espectros de saliva no estimulada de los voluntarios?

¿Será posible identificar el nivel estrés a través, de los biomarcadores salivales, cortisol y

melatonina mediante Espectroscopía Raman, y asociar la concentración con los niveles de estrés reportado por el test psicológico?

¿Será posible clasificar los espectros Raman de la saliva no estimulada de los voluntarios por nivel de estrés?

1.3 HIPÓTESIS

Entendiendo que los biomarcadores cortisol y melatonina están presentes en la saliva humana, que son los principales biomarcadores para detectar estrés académico, y mediante el conocimiento de su espectro Raman como sustancia pura. Suponemos que se pueden identificar estos biomarcadores, en el espectro Raman de la saliva y que se pueden asociar con el instrumento psicológico, lo cual permitirá determinar el nivel de estrés académico en el que se encuentra una persona.

1.4 OBJETIVOS

GENERAL

Identificar el nivel de estrés a través de biomarcadores salivales mediante espectroscopía Raman y su asociación con el inventario de estrés académico.

ESPECÍFICOS

- Caracterizar espectralmente los biomarcadores salivales del estrés.
- Obtener el espectro Raman de saliva.
- Dilucidar las bandas espectrales Raman de cortisol y melatonina en el espectro de saliva.
- Correlacionar el inventario SISCO (estrés académico) con espectros Raman salivales.
- Sugerir un método de evaluación del biomarcador salival para diagnosticar el estrés.

En los siguientes capítulos, se expondrá de forma detallada el procedimiento que se realizó, para hallar una solución al problema que nos planteamos sobre; *“Determinar estrés académico mediante biomarcadores saliva con espectroscopía Raman y el inventario psicológico SISCO”*

En el *capítulo 2* se presentan el concepto y las características principales sobre la saliva y los biomarcadores; luego se hablará sobre los conceptos y principales características de

biomarcadores cortisol y melatonina. Por último, se menciona la evolución que ha tenido el concepto de estrés en la historia de la humanidad, además se define el estrés académico, y posteriormente se presenta el instrumento psicológico (SISCO), con el que se evaluará el nivel de estrés en los voluntarios. En el *capítulo 3* se hablará sobre la espectroscopía Raman y sus características principales, debido que será la técnica con la cual se analizarán las muestras de saliva. En el *capítulo 4* se explicarán los métodos matemáticos, de correlación y sus características, además se describirá el proceso para realizar el análisis de componentes principales, método que se utilizará para analizar los datos de las variables principales. En el *capítulo 5* se presentarán las metodologías: para los criterios de selección, para la toma de muestras de saliva, luego el protocolo con el que se llenó el inventario SISCO, también se hablará de las características del espectrómetro Raman que se utilizará para analizar las muestras de saliva, luego del software con el que se adquieren los espectros Raman de las muestras y los filtros que se utilizan para obtener una señal sin tanto ruido, además de explicar el montaje experimental para medir las muestras de saliva. En el *capítulo 6* se presentarán los resultados obtenidos luego de realizar todos los análisis concebidos. Al final se darán las conclusiones que se obtuvieron luego de todo el trabajo realizado, así como los trabajos futuros.

REFERENCIAS

- [1.1] Sánchez P. La saliva como fluido diagnóstico. Ed Cont Lab Clín. 2012;16:93–108.
- [1.2] Sierra J, Ortega V, Ansiedad ZI. Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. Revista mal e sub MAR. 2003;10–59.
- [1.3] At B, Ch W, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J. An inventory for measuring depression. Arch Gen Psychiatry. 1961;4:561–71.
- [1.4] Montgomery SA, Åsberg M. A new depression scale designed to be sensitive to change. Br J Psychiatry [Internet]. 1979;134(4):382–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1192/bjp.134.4.382>
- [1.5] McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance¹¹Published on the World Wide Web on 22 November 2000. Brain Res [Internet]. 2000;886(1–2):172–89. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02950-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02950-4)

- [1.6] Chojnowska S, Ptaszyńska-Sarosiek I, Kępką A, Knaś M, Waszkiewicz N. Salivary biomarkers of stress, anxiety and depression. *J Clin Med* [Internet]. 2021;10(3):517. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10030517>
- [1.7] Sáez L, Rodríguez P, Ochoa G. Biomarcadores salivales en patología de estrés. *Cient Dent*. 2016;13:129–33.
- [1.8] Little JW. Little and Falace's dental management of the medically compromised patient - Elsevier eBook on Intel education study (retail access card). 8th ed. London, England: Mosby; 2012.
- [1.9] Aguilar Cordero MJ, Sánchez López AM, Mur Villar N, García García I, Rodríguez López MA, Ortegón Piñero A, et al. Salivary cortisol as an indicator of physiological stress in children and adults; a systematic review. *Nutr Hosp* [Internet]. 2014;29(5):960–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.29.5.7273>.
- [1.10] Ito Y, Iida T, Yamamura Y, Teramura M, Nakagami Y, Kawai K, et al. Relationships between salivary melatonin levels, quality of sleep, and stress in young Japanese females. *Int J Tryptophan Res* [Internet]. 2013;6(Suppl 1):75–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.4137/IJTR.S11760>.
- [1.11] Fiocco AJ, Wan N, Weekes N, Pim H, Lupien SJ. Diurnal cycle of salivary cortisol in older adult men and women with subjective complaints of memory deficits and/or depressive symptoms: Relation to cognitive functioning. *Stress* [Internet]. 2006;9(3):143–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10253890600965674>
- [1.12] Toda M, Morimoto K, Nagasawa S, Kitamura K. Change in salivary physiological stress markers by spa bathing. *Biomed Res* [Internet]. 2006;27(1):11–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.27.11>
- [1.13] Tammayan M, Jantaratnotai N, Pachimsawat P. Differential responses of salivary cortisol, amylase, and chromogranin A to academic stress. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(8): e0256172. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0256172>

[1.14] Borghi F, Rocha-Teles CM, McFadden SK, da Silva PC, Souza AL, Grassi-Kassisse DM. The influence of the academic exams routine on the perceived stress, resilience and salivary cortisol in Brazilian pharmacy undergraduate students. *Pers Individ Dif* [Internet]. 2021;179(110928):110928. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.paid.2021.110928>

[1.15] Nijakowski K, Gruszczyński D, Łaganowski K, Furmańczyk J, Brożek A, Nowicki M, et al. Salivary morning cortisol as a potential predictor for high academic stress level in dental students: A preliminary study. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022;19(5):3132. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19053132>

[1.16] Valdés R; Técnicas de espectroscopía raman para el estudio de la mucosa oral; Universidad de Vigo; 2016

[1.17] Ruiz-Carbajal J. (2012). Reconocimiento de Picos y Eliminación de Ruidos de Espectros Raman de Muestras Químicas y Biológicas [posgrado]. Instituto Nacional en Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE).

[1.18] Calculadora de tamaño de muestra [Internet]. Questionpro.com. [cited 2022 Jun 6]. Available from: <https://www.questionpro.com/es/calculadora-de-muestra.html>

CAPÍTULO 2

Fundamentos teóricos

En este capítulo se presentarán los conceptos teóricos del fluido salival (biológicos, fisiológicos, físicos, y químicos) que se utilizará en el proceso de identificación de enfermedades. Además de la definición del estrés y las características del instrumento psicológico.

2.1 SALIVA.

La saliva es un líquido segregado por las glándulas salivales de viscosidad variable, de composición parecida a la del plasma; contiene agua, iones, mucina, proteínas plasmáticas, leucocitos y detritos celulares. [2.1] Con el tiempo, se han detectado más sustancias y factores sanguíneos en la saliva, que se suman a su repertorio de analitos. Sin embargo, la saliva se compone principalmente de agua 95-99% y 1-4% de minerales, electrolitos, hormonas, enzimas, inmunoglobulinas, citocinas y otros. [2.1]

2.1.1 Saliva entera.

La saliva entera no es un fluido homogéneo, sino que está formada por secreciones de una serie de fuentes, predominantemente de glándulas extrínsecas, pero también fluidos de las glándulas intrínsecas, secreciones de células epiteliales y líquido crevicular gingival. [2.2] Además, los capilares sanguíneos que vascularizan las glándulas salivales, facilitan la incorporación de analitos en la secreción salival. [2.3] Aunado a hormonas esteroides en la circulación, por ejemplo, el cortisol, que se une predominantemente a proteínas grandes, como la globulina transportadora de corticosteroides (CBG) y la albúmina. Debido a esto se regula la entrada de esteroides a través de las membranas celulares. Esto explica por qué solo el esteroide libre se encuentra en la saliva. [2.4]

2.1.2 Glándulas salivales

Hay tres glándulas salivales extrínsecas (mayores) emparejadas en humanos: la parótida, la submandibular y la sublingual (ver figura 1), así como cientos de glándulas salivales (menores): la labial, palatina y faringe; intrínsecas que se distribuyen sobre todas las mucosas de la cavidad bucal, incluida la punta de la lengua (ver figura 2). [2.5] En la tabla 1, se puede visualizar el volumen de saliva debido a la glándula salival, como también el tipo de saliva que segrega.

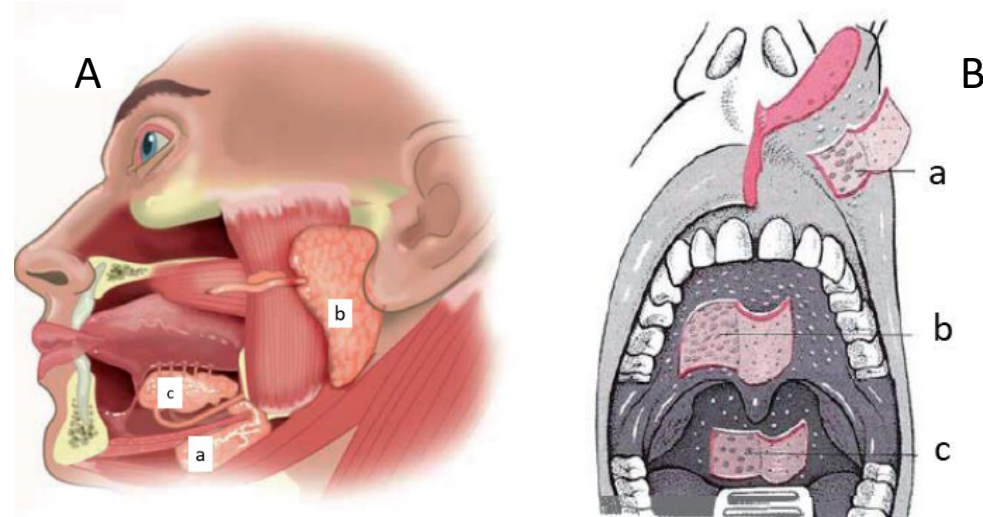


Figura 2.1: A-Localización anatómica de los tres pares de glándulas salivales mayores; B- Localización anatómica de los tres pares de glándulas salivales menores
figura tomada de la referencia [2.1]

Tabla 2.1 Tipos de saliva según la glándula secretora [2.5]

Glándula	Tipo de saliva	Volumen (en reposo)
Submandibulares (Fig. 2.1-A(a))	Mucoserosa	70%
Parótidas (Fig. 2.1-A(b))	Serosa	20%
Sublinguales (Fig. 2.1-A(c))	Mucosa	5%
Menores (Fig.2.1-B)	Mixta (predominio mucoso)	5%

2.1.3 Flujo salival

El flujo salival está controlado por el sistema nervioso autónomo, en sus dos ramas sistema nervioso parasimpático (SNP) y el sistema nervioso simpático (SNS). La inervación del SNP se realiza a través de los nervios craneales; específicamente, las glándulas parótidas son inervadas por el nervio glossofaríngeo (IX) a través del ganglio ótico. El nervio facial (VII) proporciona inervación del SNP a las glándulas salivales submandibulares y sublinguales a través del ganglio submandibular. La activación del SNP aumenta drásticamente con la ingestión de alimentos, debido a la liberación de saliva serosa (rica en agua), que se ve mejorada por las células serosas/acinares. Por otra parte, la activación del SNS en las glándulas salivales grandes se realiza a través de fibras en la región T1-T3 y da como resultado un aumento de la saliva rica en mucina de las células mucosas. El aumento drástico de la estimulación simpática puede provocar una reducción del flujo salival y expresarse xerostomía. [2.5]

2.1.4 Composición de la saliva.

La composición de la saliva en las glándulas mayores difiere drásticamente, con las glándulas parótidas más grandes que solo contienen células serosas, las glándulas submandibulares, contienen aproximadamente la misma cantidad de células serosas y células mucosas; y finalmente, las glándulas sublinguales contienen principalmente células mucosas. [2.6]

La saliva tiene menos proteínas y iones que la sangre. Pero contiene potasio, cloruro sódico, calcio, magnesio, fósforo, carbonatos, urea y trazas de amoníaco, ácido úrico, glucosa y lípidos. La principal proteína salivar es la amilasa, también contiene las proteínas lisozima y albúmina. Además, la composición varía de acuerdo con el ritmo de secreción, por la noche está presente la hormona de la melatonina y por la mañana está en mayor concentración la hormona cortisol. [2.6]

2.1.5 Diagnósticos a través del fluido saliva.

Desde finales del siglo XIX, se conocía la influencia de la saliva sobre la digestión, y a lo largo del siglo XX, se ha investigado sobre las propiedades y composición de la saliva, pero no es hasta los últimos 40 años, cuando se comienza a indagar sobre el valor de la saliva

como material de muestra en las determinaciones de laboratorio, y es principalmente a partir de 1999, cuando se desarrollan grandes iniciativas para la investigación de biomarcadores en saliva. [2.1]

La saliva se ha descrito como el espejo del cuerpo. En un mundo de altos costos de atención médica y un entorno en el que el diagnóstico rápido puede ser fundamental para un resultado positivo del paciente, la saliva está emergiendo como una alternativa viable a las muestras de sangre. [2.7]

2.2 BIOMARCADORES SALIVALES.

También conocidos como marcadores biológicos, “son moléculas que expresan ante alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. [2.8]

Los biomarcadores tienen múltiples usos en relación con la detección temprana de la enfermedad, su progresión, pronóstico y respuesta al tratamiento que se use para la misma. La principal clasificación que se utiliza los divide entre los de exposición y los de enfermedad. Los primeros, se usan para detectar o conocer los factores de riesgos y los segundos para realizar cribados, diagnósticos y monitorizar el curso de la enfermedad. [2.9]

Desde el punto de vista fisiológico, se puede tomar como ejemplo el dolor que genera un estado de estrés en las personas que provoca la activación del SNS. Por este motivo, las principales rutas que se desencadenan son aquellas relacionadas con el SNS. Teniendo en cuenta la fisiopatología del dolor, cuando el estímulo doloroso llega al tallo cerebral, se desencadena una serie de respuestas denominadas supra segmentarias en el tálamo e hipotálamo que provocan alteraciones a nivel circulatorio (aumenta la tensión arterial, frecuencia cardíaca y gasto cardíaco), respiratorio (inicio de hiperventilación que terminará en hipoventilación, además de bronquio constricción refleja), aumenta el tono del músculo esquelético y produce una hiperreactividad endocrino-metabólica (aumento de secreción de catecolaminas, hormonas catabólicas como glucagón, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona antidiurética (ADH), cortisol, renina, angiotensina y aldosterona, disminuyen los niveles de insulina y testosterona).[2.10]

Se propone en esta sección al cortisol y la melatonina como biomarcadores que garanticen la identificación del estrés en la saliva.

2.2.1 Cortisol.

El cortisol también llamado hidrocortisona es una hormona esteroidea producido por las glándulas suprarrenales en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal que se libera como respuesta al estrés. El eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Eje HPA) es un conjunto complejo de influencias directas e interacciones retroalimentadas entre el hipotálamo, una parte del cerebro hueca con forma de fuelle, la glándula pituitaria, una estructura en forma de haba localizada bajo el hipotálamo y la glándula adrenal o suprarrenal, una glándula pequeña, pareada y de forma piramidal localizada en la parte superior de los riñones. [2.11]

Con la respuesta fisiológica al estrés se liberan gluco-corticoides en el torrente sanguíneo a través del citado eje HPA, especialmente cortisol, el glucocorticoide más activo. La liberación de cortisol es pulsátil, su regulación es genética y ambiental, e influyen en ella el ciclo sueño vigilia y la percepción del propio estrés. La hormona cortisol, en condiciones normales, muestra un marcado ritmo circadiano, con un incremento que oscila entre el 50 y el 75% durante los 30 minutos siguientes al despertar (8:00am), seguido de un descenso abrupto inmediato, que se hace luego gradual a lo largo del resto del día, hasta alcanzar un mínimo por la noche (10:00pm). [2.12]

En condiciones fisiológicas estables se ha observado que el cortisol salival está en equilibrio con el cortisol libre plasmático y es independiente del flujo salival, por lo que puede utilizarse para la detección y el seguimiento de ciertas patologías. [2.13]

Entre las características químicas del biomarcador cortisol en la figura 2.2 se observa, la estructura molecular y el tipo de enlace entre sus moléculas de carbono, hidrogeno y oxígeno.

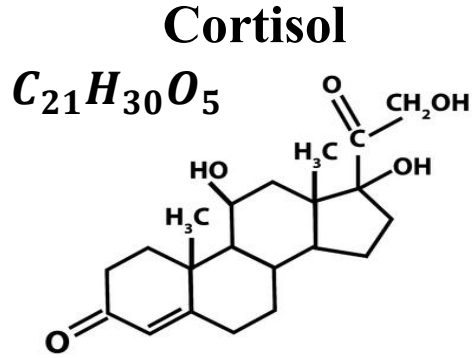


Figura 2.2 Estructura química del biomarcador cortisol.

Figura tomada de la pág. web: https://es.123rf.com/photo_84516354_f%C3%B3rmula-molecular-qu%C3%ADmica-de-la-hormona-cortisol-la-hormona-de-las-gl%C3%A1ndulas-suprarrenales-info-gr%C3%A1ficos-ejem.html

2.2.2 Melatonina.

La melatonina (5-metoxi N-acetiltriptamina) es una neurohormona secretada principalmente por la glándula pineal que puede transmitir colas temporales a varios órganos e incluso al propio núcleo hipotalámico supraquiasmático (SCN). [2.14] En humanos, la secreción de melatonina aumenta poco después del inicio de la oscuridad, alcanza su punto máximo en la media noche (entre las 02:00am y las 04:00 am), y cae gradualmente durante la segunda mitad de la noche. [2.15] Por lo tanto, el ritmo circadiano para la liberación de melatonina está estrechamente sincronizado con las horas habituales de sueño. Además, la exposición a la luz durante la noche de forma aguda suprime la secreción de melatonina. Estudios previos han demostrado que los niveles de melatonina y el tiempo de inicio de la secreción de melatonina son marcadores fiables de la fase circadiana en individuos sanos. [2.14]

Entre las características químicas del biomarcador melatonina en la figura 2.3 se observa, la estructura molecular y el tipo de enlace entre sus moléculas de carbono, hidrogeno, nitrógeno, y oxígeno.

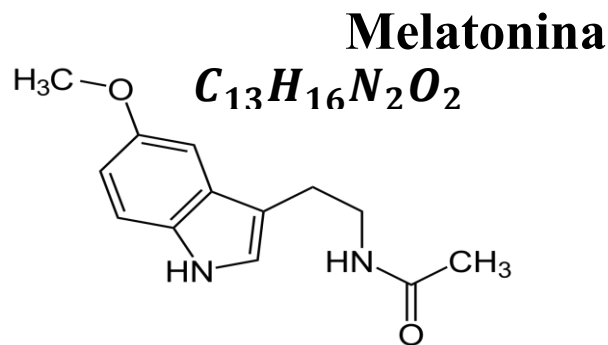


Figura 2.3 Estructura química del biomarcador melatonina.

Figura tomada de la pág. web: <https://www.pngwing.com/es/free-png-sfoew>

2.3 ESTRÉS

En esta sesión se hablará sobre la segunda variable de entrada para nuestra investigación; desde la evolución de la palabra estrés, una breve definición, hasta comentar sobre el estrés académicos y sus características.

2.3.1 Evolución histórica del concepto

El interés por el estudio del estrés es ya antiguo, pudiendo encontrarse sus raíces en distintas etapas de la historia. La utilización del término para referirse a los problemas y adversidades se remonta al siglo XIV. Posteriormente, la formulación más clara del concepto tuvo lugar en el siglo XVII a través del trabajo del físico Robert Hooke. Éste concibe el estrés como la relación entre la "carga" externa ejercida sobre un objeto y la deformación experimentada por el mismo, dependiendo el resultado de las propiedades estructurales del objeto y de las características de la fuerza externa; este planteamiento realizado desde la Física manifiesta el carácter interactivo del concepto. [2.16] La palabra estrés se aplica a los seres humanos en el siglo XVIII para aludir al estado de resistencia ofrecido frente a las influencias extrañas. [2.16] En 1936, Hans Selye introdujo el término estrés como un síndrome específico constituido por cambios inespecíficos del organismo inducidos por las demandas que se le hacen; inicialmente, el estrés se desarrolla a partir de los trabajos de Selye (1936, 1960, 1974) como un término novedoso y relevante en la Medicina. Este autor consideró la respuesta de estrés como un conjunto de respuestas fisiológicas de carácter hormonal que tienen lugar por la activación del eje hipotálamo-hipófiso-córticosuprarrenal, con la correspondiente elevación de la secreción de corticoides y del eje simpático-médulo-suprarrenal, así como la reacción a estímulos inespecíficos. [2.17]

Los investigadores no han conseguido crear aún una definición que satisfaga a todos; de hecho, el estrés se puede conceptualizar desde tres claras y grandes perspectivas teóricas; [2.18] existen definiciones en las que se considera como un estímulo, otras que están centradas en la respuesta producida en el organismo y, en tercer lugar, las definiciones de tipo interactivo o transaccional. Miller en 1997 define el estrés como cualquier estimulación vigorosa, extrema o inusual que, ante la presencia de una amenaza, causa algún cambio significativo en la conducta. [2.19]

2.3.2 Definición del estrés psicológico.

El estrés supone una gran presión, sentirse frustrado, aburrido, encontrarse en situaciones en las que no es fácil el control de las mismas. Éste no se considera una emoción en sí misma, sino que es el agente generador de emociones. En todo caso, el estrés es una relación entre la persona y el ambiente, en la que el sujeto percibe en qué medida las demandas ambientales constituyen un peligro para su bienestar, si exceden o igualan sus recursos para enfrentarse a ellas. [2.20] El estrés puede provocar distintos problemas de salud, entre ellos están el asma, el infarto de miocardio y las alteraciones gastrointestinales e inmunológicas. Las experiencias estresantes proceden de tres fuentes básicas: el cuerpo, el entorno y los pensamientos; la primera fuente de estrés es de carácter fisiológico, por lo que actualmente la saliva ha sido un aspecto interesante que puede ser empleada como biomarcador para enfermedades. [2.20]

El estrés está relacionado con diversos biomarcadores, algunos de ellos se mencionan en la sesión anterior, los cuales son cortisol y melatonina, y son los considerados para llevar a cabo el estudio.

2.3.3 Estrés académico.

El uso del término estrés académico suele hacerse con relativa facilidad, aunque sus verdaderos alcances y limitaciones no sean conocidos. [2.21] En el caso específico del estrés académico la situación se complica cuando nos enfrentamos a una multiplicidad de términos (estrés estudiantil, estrés universitario, estrés escolar y estrés de examen) y a un campo de investigación altamente disperso y sin comunicación interna. [2.22] Para superar esa problemática, en un primer momento se ha construido un modelo conceptual para el estudio del estrés académico que, desde una perspectiva sistémico-cognoscitiva, que

permita conceptualizar al estrés académico bajo los siguientes términos: El estrés académico es un proceso sistémico de carácter adaptativo y esencialmente psicológico. [2.23]

2.4 INSTRUMENTO PSICOLOGICO.

Los instrumentos de evaluación psicológica son las técnicas mediante las cuales se recogen los datos referentes a las características psicológicas de las personas estudiadas. Son muchos los instrumentos que sirven para este fin y variadas son también las formas que adquieren los test, su modo de presentación, el material con que están hechos, el objetivo que persiguen, etc., es tan amplia la cantidad de instrumentos que existen que se encuentran clasificados en diversas categorías. [2.24]

Para la evaluación psicológica del estrés académico, se conocen muchos instrumentos psicológicos, pero en esta sesión se habla de uno en particular, debido a sus características, además, de que tienen validez en población estudiantil mexicana.

2.4.1 Origen del Inventario SISCO.

Barraza [2.25] realiza un estado del arte sobre el estrés académico que lo conduce a reconocer los problemas estructurales del campo de estudio del estrés académico: la existencia de múltiples conceptos e instrumentos para su medición. Este autor desarrolla tres acciones consecutivas: Realiza una reconfiguración teórica del campo de estudio dejando atrás la idea de los tres enfoques conceptuales sobre el estrés; luego construye un modelo teórico conceptual que lo lleva a definir al estrés académico desde una perspectiva procesual y sistémica; Ante el nuevo concepto de estrés académico, derivado del modelo Sistémico Cognoscitivista, surge la necesidad de tener un instrumento que lo mida en sus tres componentes; y es a partir de esa necesidad que se diseña y valida el Inventario SISCO para el estudio del estrés académico.[2.25]

2.4.2 Inventario SISTémico COgnoscitivista para el estudio del estrés académico. (SISCO)

Este instrumento está constituido por 31 ítems distribuidos de la siguiente manera:

Un ítem de filtro que, en términos dicotómicos (si-no), permite determinar si el encuestado es candidato o no a contestar el inventario. En caso de que el investigador lo considere puede utilizar este dato para reportar el nivel de presencia del estrés académico en la población encuestada.

Un ítem que, en un escalamiento tipo Likert, [2.26] de cinco valores numéricos (del 1 al 5; donde 1 es nunca, 2 rara vez, 3 es algunas veces, 4 casi siempre y 5 siempre), permite identificar el nivel de intensidad del estrés académico. Este dato el investigador lo puede utilizar como variable mona-ítem para medir la intensidad del estrés o, en su defecto, eliminarlo.

Ocho ítems que, en un escalamiento tipo Likert de cinco valores categoriales (del 1 al 5; donde 1 es nunca, 2 rara vez, 3 es algunas veces, 4 casi siempre y 5 siempre), permiten identificar la frecuencia en que las demandas del entorno son valoradas como estímulos estresores.

Quince ítems que, en un escalamiento tipo Likert de cinco valores categoriales (del 1 al 5; donde 1 es nunca, 2 rara vez, 3 es algunas veces, 4 casi siempre y 5 siempre), permiten identificar la frecuencia con que se presentan los síntomas o reacciones ante un estímulo estresor.

Seis ítems que, en un escalamiento tipo Likert de cinco valores categoriales (del 1 al 5; donde 1 es nunca, 2 rara vez, 3 es algunas veces, 4 casi siempre y 5 siempre), permiten identificar la frecuencia de uso de las estrategias de afrontamientos. [2.26]

2.4.3 Metodología para evaluar el instrumento psicológico

Se toman para el análisis únicamente los ítems de las preguntas de las tres sesiones mencionadas anteriormente. Lo primero es a cada respuesta de la escala se le asigna los valores ya recomendados para su codificación (vid supra). Luego se obtiene la media aritmética por cada ítem, de cada sección y posteriormente se obtiene la media general. Posteriormente se transforma la media general en porcentaje, a través de regla de tres simple. Por último, una vez obtenido el porcentaje se puede interpretar, a través del baremo normativo centrado en la población en que se validó, el cual va de 0 a 48% nivel leve del estrés, de 49% a 60% nivel moderado del estrés, y de 61% al 100% nivel severo de estrés. [2.27]

Cómo se observó en este capítulo, se comentaron los fundamentos teóricos, sobre la fisiología de la saliva y los biomarcadores salivales, además de la parte psicológica e instrumento necesarios para diagnosticar el estrés. Posterior a ello se presentarán las características sobre la técnica óptica que se utilizara para medir los biomarcadores en la saliva.

REFERENCIAS

[2.1] Ma, P., & Martínez, S. (s/f). LA SALIVA COMO FLUIDO DIAGNÓSTICO. Seqc.es.

Recuperado el 17 de julio de 2022, de <https://www.seqc.es/download/tema/7/3324/346271904/840334/cms/tema-8-la-saliva-como-fluido-diagnostico.pdf/>

[2.2] Marieb EN, Hoehn K. Human anatomy & physiology. 8a ed. Cummings; 2009.

[2.3] Martini F. Fundamentos de anatomía y fisiología. JL. 2009;

[2.4]. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva— A review. Crit Rev Oral Biol Med [Internet]. 2002;13(2):197–212. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/154411130201300209>

[2.5]. Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. Clin Chem [Internet]. 1983;29(10):1752–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/29.10.1752>

[2.6] Chiego DJ. Principios de histología y embriología bucal: Con orientación clínica: Con Orientación Clínica. 4a ed. Chiego DJ, editor. Elsevier; 2014.

[2.7] Kosti, O., Getting, S. J., & Renshaw, D. (Eds.). (2010). Saliva: Physiology and Diagnostic Potential in Health and. En TheScientificWorldJOURNAL.

[2.8] Ruano Pequeño P. Diferencias inter-individuales y variabilidad inter-sesión de potenciales biomarcadores de dolor en sujetos sanos bajo condiciones de ambiente controlado. Universidad de Valladolid; 2018.

[2.9] Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. NeuroRx [Internet]. 2004;1(2):182–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>

[2.10] Pérez --Castañeda-Jorge. Fisiopatología del dolor agudo: alteraciones cardiovasculares, respiratorias y de otros sistemas y órganos. Rev Cubana Anestesiología y Reanimación. 2012;11.

[2.11] Aguilar C, Sánchez L, Mur V, et al. Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico en niños y adultos: revisión sistemática. Nutrición Hospitalaria, 2014. 29(5), 960-968.

[2.12] Bagán S, Jiménez S. Fisiopatología De Las Glándulas Salivales. 1ª ed. Valencia: Medicina oral; 2010: 47-65.

[2.13] Obayashi K. Salivary mental stress proteins. Clin Chim Acta [Internet]. 2013;425:196–201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.028>

[2.14] Rahman SA, Kayumov L, Tchmoutina EA, Shapiro CM. Clinical efficacy of dim light melatonin onset testing in diagnosing delayed sleep phase syndrome. Sleep Med [Internet].

- 2009;10(5):549–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2008.03.020>
- [2.15] Arendt J. Melatonin and human rhythms. *Chronobiol Int* [Internet]. 2006;23(1–2):21–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07420520500464361>
- [2.16] Alonso-Fernández, F. (1997). *Psicopatología del trabajo*. Barcelona: Edikamed.
- [2.17] Sierra J, Ortega V, Ansiedad ZI. Ansiedad, angustia y estrés: tres conceptos a diferenciar. *Revista mal e sub MAR*. 2003;10–59.
- [2.18] Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. Una medida global del estrés percibido. *Revista de Salud y Comportamiento Social*. 1983;24:385–96.
- [2.19] Eisdorfer C. *El estrés y la salud humana*. Nueva York: Springer Verlag; 1982.
- [2.20] Mcewen BS. Stressful experience, brain, and emotions: Developmental, genetic and hormonal influences. En: Gazzaniga MS, editor. *The Cognitive Neurosciences*. 1995. p. 1117–36.
- [2.21] Cooper CL, Travers C. *El estrés de Los profesores*. Ediciones Paidós Iberica; 1997.
- [2.22] Estrés académico: Un estado de la cuestión | [Internet]. *Psicologiacientifica.com*. 2007 [citado el 2 de junio de 2022]. Disponible en: <https://www.psicologiacientifica.com/estres-academico-2/>.
- [2.23] Macías B. *Propiedades psicométricas del Inventario SISCO del estrés académico*. 2007.
- [2.24] Llana DFM. *Instrumentos de evaluación psicológica* [Internet]. Ciudad de la Habana: Ecimed; 2007 [citado el 26 de julio de 2022]. Disponible en: http://newpsi.bvs-psi.org.br/ebooks2010/en/Acervo_files/InstrumentosEvaluacionPsicologica.pdf.
- [2.25] Barraza, A. (2006). Un modelo conceptual para el estudio del estrés académico. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 9(3), 110-129. Recuperado de <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rep/rep/article/view/19028>.
- [2.26] Barraza, A. (2011). Estresores académicos y género. Un estudio exploratorio de su relación en alumnos de licenciatura. *Visión Educativa IUNAES*, 5(12), 33-43. Recuperado de <http://iunaes.mx/wp-content/uploads/2013/04/12-Marzo-de-2012.pdf>.
- [2.27] Barraza-Macías, A. (s/f). *Inventario Sistemático Cognoscitivista para el estudio del estrés académico*. Segunda versión de 21 ítems. 31–33.

CAPÍTULO 3

Espectroscopía Raman

En este capítulo se describe la técnica óptica de la espectroscopía Raman, sus orígenes, sus características, tipos de ruido, y sus aplicaciones a diversas áreas; esta técnica óptica será la empleada para medir las muestras de saliva y adquirir los datos necesarios para un posterior análisis.

3.1 Origen del efecto Raman.

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material ya sea compuesto orgánico o inorgánico permitiendo así su identificación. La espectroscopía Raman está basada en el fenómeno de esparcimiento inelástico. [3.1] Esta es una de las técnicas más usadas en química en la identificación de moléculas. En esta técnica se hace incidir luz de una fuente monocromática de radiación para producir esparcimiento elástico e inelástico en una muestra. [3.2]

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Hindu Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, lo que permitió que ganara el premio Nobel de física en 1930. Este científico dio nombre al fenómeno inelástico de esparcimiento de la luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares. Sus estudios sobre este fenómeno se inspiraron en los trabajos realizados anteriormente por Rayleigh. A diferencia de Rayleigh que afirmaba que el color azul del mar no es más que el azul del cielo visto en reflexión, Raman realizó un experimento sencillo con el que pudo demostrar que el color azul del agua procedía de un fenómeno propio, posteriormente explicado como esparcimiento de la luz debido a su interacción con las moléculas del agua. [3.3] En 1923, mientras estudiaba el esparcimiento de la luz en el agua y en alcoholes purificados, uno de sus alumnos observó un cambio de color en un rayo de luz solar al ser filtrada y atravesada, él y su equipo no fueron capaces de eliminar este efecto y por tanto sospecharon que el fenómeno era una propiedad característica de la sustancia. Tras realizar diversos estudios durante los cinco años siguientes, Raman y su discípulo Krishnan, publicaron el famoso artículo en la revista Nature

en 1928, en el que describieron este nuevo tipo de radiación secundaria. [3.3]

3.1.1 Descripción del efecto Raman.

Las técnicas de espectroscopía se basan en la interacción entre la radiación y la materia. El tipo de interacción que se produce en estos casos depende de las características de dicha radiación incidente (su longitud de onda e intensidad) y de los propios constituyentes de la materia, es decir, su disposición atómica y molecular, dando lugar fundamentalmente a fenómenos de absorción y dispersión de la radiación. En el estudio de la espectroscopía se utiliza el concepto de luz en su acepción más amplia, es decir, entendido como radiación electromagnética que se puede describir mediante dos vectores oscilantes mutuamente perpendiculares, correspondientes a un campo eléctrico (E) y campo magnético (B). [3.4]

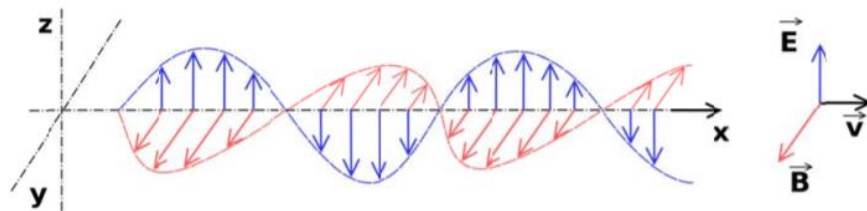


Figura 3.1 Combinación de campo eléctrico y campo magnético oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro

Figura tomada de la referencia: [3.4]

3.1.2 Análisis del esparcimiento Raman.

Cuando la radiación electromagnética interactúa con la materia, los átomos y moléculas que la componen en estado gaseoso, líquido o sólido, pasan a un estado de mayor energía, en el que se mantiene por un período de tiempo muy corto, volviendo posteriormente a su estado energético previo. Los tipos de cambios que se originen debido a la energía de la radiación utilizada determina los distintos tipos de espectroscopías que se conocen. [3.4] Así, a grandes rasgos, en la espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) se utiliza radiación electromagnética en el rango 380-700 nm de longitud de onda, dando lugar a transiciones electrónicas en la materia excitada. Sin embargo, en la espectroscopía infrarroja cercana (700 – 2500 nm) se utilizan fuentes de radiación infrarroja, que emiten fotones menos energéticos,

provocando excitaciones vibracionales y rotacionales en las moléculas, sin que se produzcan transiciones electrónicas. Las espectroscopías vibracionales obtienen la información analítica a partir de los cambios que se originan en las transiciones entre niveles vibracionales de los enlaces químicos de las moléculas bajo el estímulo de una radiación electromagnética. Los átomos que forman una molécula no están en posiciones fijas, sino que están continuamente vibrando y en rotación. [3.4]

Existen otros muchos fenómenos físicos que tienen lugar en estos procesos de interacción radiación-materia que provocan respuestas bien diferenciadas, tales como emisión de radiación calorífica, radiación resonante Rayleigh, fluorescencia o fosforescencia. Todas estas emisiones pueden utilizarse para obtener información sobre las características físico-químicas de la materia. [3.4]

3.2 Tipos de Ruidos Raman

Cuando se estudian muestras químicas y biológicas de materiales usando la técnica de espectroscopía Raman, se requiere tomar espectros Raman de un material con el menor ruido posible para la determinación de picos de intensidad o bandas Raman (figura 3.2- rectángulo color azul) y así determinar la composición de dicho elemento. En el estudio de espectros Raman, se pueden considerar 5 diferentes tipos de ruidos (figura 3.2) que a continuación se enuncian: [3.5]

- *Ruido generado por la muestra (Fluorescencia)*: en la naturaleza, existen materiales que tienen la capacidad de absorber la luz en una longitud de onda y emitir en otra longitud, a estos materiales se les conoce como fluoróforos, por su capacidad de fluorecer. Por lo que el fenómeno de fluorescencia se presenta como un ruido generado por la muestra. En la figura 3.2 es la zona señalada por el color verde.
- *Ruido computacional*: este tipo de ruido se genera al introducir en una computadora la información que se obtiene del detector en el proceso de graficado de estos datos.
- *Ruido de disparo*: este tipo de ruido es inevitable en las mayorías de las muestras, principalmente en muestras líquidas. Es un tipo de ruido electrónico que se presenta cuando un número finito de partículas que transportan energía es suficientemente pequeño para dar lugar a fluctuaciones estadísticas apreciables en una medición. Este ruido es tanto mayor cuanto mayor sea el valor promedio de la intensidad del haz de excitación. Es la zona de figura 3.2 que está señalada de color amarillo.

- *Ruido generado por la instrumentación:* este tipo de ruido depende específicamente de la instrumentación empleada en el análisis, por ejemplo, del detector, que puede detectar el ruido térmico y el ruido de lectura, entre otros.
- *Ruido generado por fuentes externas:* este tipo de ruido se genera cuando el detector no solo registra la intensidad de la luz generada por la muestra, si no también, detecta luz de alguna fuente externa de la instrumentación, por ejemplo, una lámpara y la luz del sol entre otros [3.5]. En la figura 3.2 es la zona que esta señalada de color rojo.

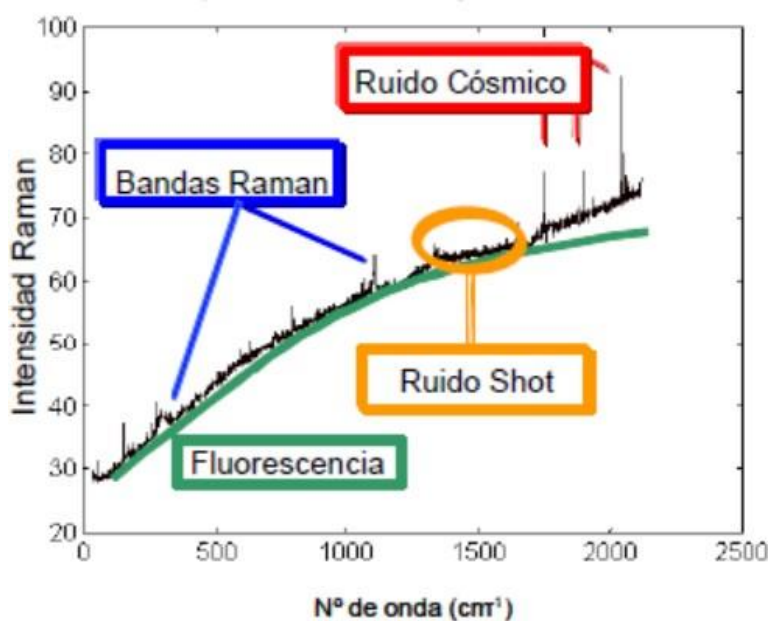


Figura 3.2 Tipos de ruidos, [3.5].

3.3 Formas de vibraciones de las moléculas

Una vibración molecular se produce cuando los átomos de una molécula están en movimiento periódico, mientras que la molécula como un todo tiene constante movimiento traslacional y rotacional. La coordenada de una vibración normal es una combinación de cambios en las posiciones de los átomos en la molécula. Cuando la vibración sucede, los cambios de coordenadas son sinusoidal con una frecuencia ν , la cual es la frecuencia de la vibración. [3.2]

Debido que los átomos que forman una molécula no están en posiciones fijas, sino que están continuamente vibrando y en rotación. Algunas vibraciones moleculares están localizadas en

un grupo funcional (entre dos moléculas unidas por una cadena carbonada), mientras que otras se extienden por toda la molécula (todos los grupos funcionales).

Existen dos modos fundamentales de vibraciones: Fig. 3.3 a) movimiento de alargamiento y compresión alternantes (tensión) que puede ser simétrico (Fig. 3.3 a.1) y asimétrico (Fig. 3.3 a.2); Fig. 3.3 b) cambio en el ángulo de enlace (flexión) que puede ser simétrico en el plano (tijereteo o scissors) (Fig. 3.3 b.1), asimétrico en el plano (rock) (Fig. 3.3 b.2), simétrico fuera del plano (twist) (Fig. 3.3 b.3), y asimétrico fuera del plano (wag) (Fig. 3.3 b.4). [3.4]

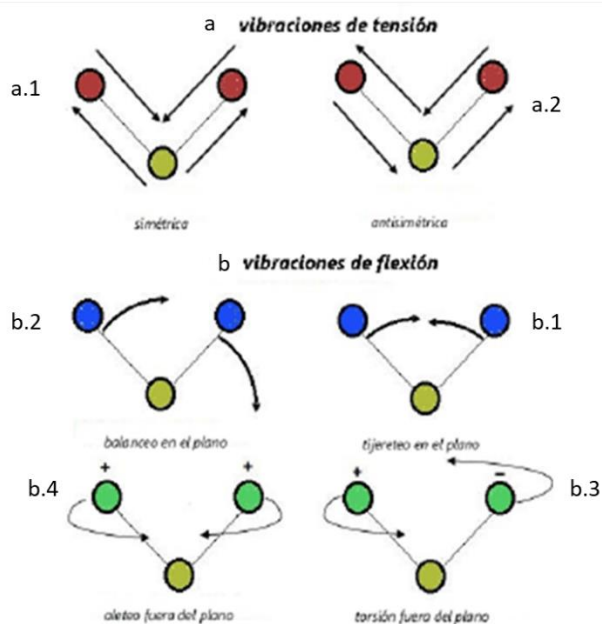


Figura 3.3 Tipos de vibraciones moleculares, figura de la referencia [3.4].

3.4 Aplicaciones del efecto Raman.

En los primeros tiempos de aplicación de esta técnica el análisis de la radiación Raman era una tarea muy compleja y delicada. Posteriormente, gracias al desarrollo de los láseres como fuente de excitación y a la aparición de los dispositivos de carga acoplada (CCD) para la detección de la radiación, la adquisición de la radiación Raman mejoró y se simplificó enormemente. [3.6]

Hoy en día, la espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución, no destructiva, que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación, bien en estado líquido, sólido o gaseoso. Actualmente se ha convertido en una herramienta fundamental en áreas de

conocimiento tan diversas como biología, geología, arqueología, química, física del estado sólido, etc. [3.6]

La espectroscopía Raman tiene ya aplicación en muchos ámbitos de la ciencia como la electrónica, el arte o la ciencia forense. [3.7] Es así que la obtención de espectros Raman de muestras biológicas produce una huella dactilar (fingerprint) que representa las vibraciones moleculares específicas de los enlaces químicos de los componentes principales de las células que constituyen los tejidos, es decir: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. [3.8]

Es importante destacar que, desde el punto de vista experimental, el contenido en agua de los tejidos biológicos no supone altos niveles de fluorescencia al ser evaluados por esta técnica, dado que, utilizando longitudes de onda cercanas al infrarrojo, del orden de 633 a 785 nm o superior, ésta se puede evitar. [3.9]

Respecto a la interpretación del espectro Raman, puede resultar difícil separar con precisión las bandas espectrales por lo que se utilizan a menudo modelos de estudio estadístico, cada vez más complejos, en un intento de diferenciar las distintas señales superpuestas. Para la mayor parte de las aplicaciones biológicas de la espectroscopía Raman el análisis de los resultados es de tal magnitud que requiere herramientas estadísticas potentes. Las más empleadas son el análisis lineal discriminante de Fisher [3.10], máquinas de soporte vectorial,[3.11] redes neuronales artificiales, análisis de componentes principales y otras técnicas de regresión estadística que permiten la extracción de picos significativos en los espectros obtenidos. [3.12]

En el capítulo se presentó las características principales sobre la técnica óptica que se utilizara para analizar las muestras biológicas, además se presentó algunas de sus aplicaciones y mencionaron métodos matemáticos, que el próximo capítulo se comentaran con más ampliamente.

REFERENCIAS

- [3.1] Smith E, Dent G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Wiley; 2005.
- [3.2.] Villanueva-Luna A. (2013). *Espectroscopía Raman en fluidos biológicos extracelulares*. [posgrado]. Instituto Nacional en Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE).
- [3.3] Raman CV, Krishnan KS. A new type of secondary radiation. *Nature* [Internet]. 1928;121(3048):501–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/121501c0>
- [3.4] Valdés Pons R. *Técnicas de espectroscopía Raman para el estudio de mucosa oral*. Física aplicada; 2017.
- [3.5] Ruiz-Carbajal J. (2012). *Reconocimiento de Picos y Eliminación de Ruidos de Espectros Raman de Muestras Químicas y Biológicas* [posgrado]. Instituto Nacional en Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE).
- [3.6] Raman, C. V. (1922). On the molecular scattering of light in water and the colour of the sea. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 101(708), 64–80. <https://doi.org/10.1098/rspa.1922.0025>
- [3.7] Harris AT, Rennie A, Waqar-Uddin H, Wheatley SR, Ghosh SK, Martin-Hirsch DP, et al. Raman spectroscopy in head and neck cancer. *Head Neck Oncol* [Internet]. 2010 [citado el 2 de junio de 2022];2(1):26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20923567/>
- [3.8] Kondepati VR, Heise HM, Backhaus J. Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2008;390(1):125–39. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1651-y>
- [3.9] Downes A, Elfick A. Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine. *Sensors (Basel)* [Internet]. 2010;10(3):1871–89. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/s100301871>
- [3.10] Lachenbruch PA, Goldstein M. Discriminant Analysis. *Biometrics* [Internet]. 1979;35(1):69. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2307/2529937>
- [3.11] Cristianini N, Shawe-Taylor J. *An introduction to support vector machines and other kernel-based learning methods*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press; 2000.
- [3.12] Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal component analysis. *Chemometr Intell Lab Syst* [Internet]. 1987;2(1–3):37–52. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)

CAPÍTULO 4

Fundamentos matemáticos

Posterior a la descripción del fenómeno de esparcimiento Raman y sus características más importantes. En este capítulo se describen los fundamentos matemáticos que se utilizarán para analizar los datos adquiridos de esta investigación, se hablara del coeficiente de correlación lineal de Pearson, método que será utilizado para identificar las variables principales, y finalmente se describirá el análisis de componentes principales.

4.1 Coeficiente de correlación lineal de Pearson

4.1.1 Origen

En 1896, Karl Pearson, colega de Galton, publicó un artículo titulado "*Contribuciones matemáticas a la teoría de la evolución, III. Regresión, herencia y panmixia*"; en el cual analizó las características del coeficiente de correlación. El índice, aun cuando no fue desarrollado por Pearson, lleva su nombre debido a esta publicación. El coeficiente de correlación de Pearson es apropiado únicamente para aquellos casos en que la asociación es lineal y la escala de medición cuantitativa (intervalo o razón). [4.1]

4.1.2 Definición

El coeficiente de correlación de Pearson, pensado para variables cuantitativas (escala mínima de intervalo), es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Adviértase que se dice "variables relacionadas linealmente". Esto significa que puede haber variables fuertemente relacionadas, pero no de forma lineal, en cuyo caso no proceder a aplicarse la correlación de Pearson. [4.2]

La fórmula para el coeficiente de correlación lineal de Pearson es

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 * \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (1)$$

Donde X y Y son las variables a las cuales se le calculará el coeficiente de correlación.

- Su valor fluctúa entre 1 y -1. Cuando la asociación entre X y Y es perfecta "r" es igual

a 1 (todos los valores se ubican en una recta); cuando no existe correlación lineal su valor es 0. [4.1].

- El signo del coeficiente de correlación indica la dirección de la asociación. Cuando el valor de “r” es positivo se dice que existe una correlación positiva o directa; o sea que valores grandes de X están asociados con valores grandes de Y y viceversa, en la figura 4.1 es la flecha $r = 1$ que se desplaza de la zona izquierda inferior hasta la zona superior derecho. Por otra parte, si el signo es negativo la correlación es negativa; valores grandes de X se asocian con valores pequeños de Y y viceversa en la figura 4.1 es la flecha señalada $r = -1$ que se desplaza de la zona izquierda superior a la zona derecha inferior de la figura. [4.1]

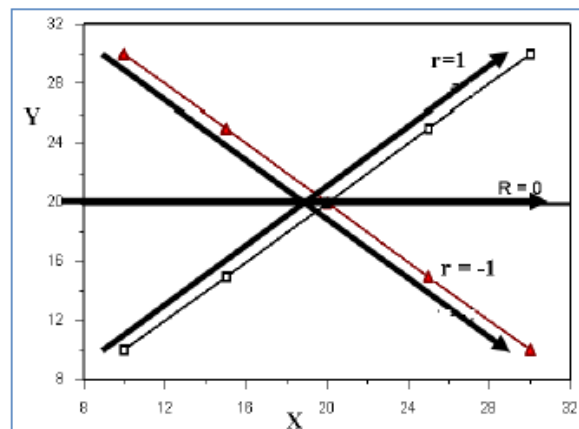


Figura 4.1 Relación entre el valor y signo del coeficiente de correlación lineal de Pearson

Figura tomada de la referencia: [4.1]

4.2 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRICIPALES

Luego de mencionar el coeficiente de correlación y sus características más importantes, ahora en esta sesión es necesario describir el análisis de componentes principales, ya que, será el método empleado para el análisis de los datos de las bandas espectrales principales adquiridas.

4.2.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

Describir cualquier situación real, por ejemplo, las características físicas de una persona, la situación política en un país, las propiedades de una imagen, el rendimiento de un proceso, la calidad de una obra de arte o las motivaciones del comprador de un producto, requiere tener

en cuenta simultáneamente varias variables. Para describir las características físicas de una persona podemos utilizar variables como su estatura, su peso, la longitud de sus brazos y de sus piernas, etc. El análisis de datos multivariantes tiene por objeto el estudio estadístico de varias variables medidas en elementos de una población. Pretende los siguientes objetivos: Resumir el conjunto de variables en unas pocas nuevas variables, construidas como transformaciones de las originales, con la mínima pérdida de información; Encontrar grupos en los datos si existen; Clasificar nuevas observaciones en grupos definidos; por último, relacionar dos conjuntos de variables. [4.2]

4.2.2 Álgebra matricial

La información de partida en el análisis multivariante es una tabla de datos correspondiente a distintas variables medidas en los elementos de un conjunto. La manipulación de estos datos se simplifica mucho utilizando el concepto de matriz y sus propiedades.

El concepto principal de esta sesión es el concepto de vector. Un conjunto de n datos numéricos de una variable puede representarse geoméricamente asociando cada valor de la variable a una dimensión del espacio n dimensional, obteniendo un punto en ese espacio, y también el vector que une el origen con dicho punto. Esta analogía entre variables y vectores es útil, porque los métodos de descripción estadístico de una variable tienen una correspondencia clara con las operaciones básicas que realizamos con vectores. [4.3]

Para trabajar conjuntamente con p variables o vectores definimos el concepto de matriz.

Una matriz es un conjunto de números dispuestos en filas y columnas, puede verse como un conjunto de vectores columna o un conjunto de vectores fila. Se dice que una matriz tiene dimensiones $n \times p$ si tiene n filas y p columnas. Si en una matriz intercambiamos las filas por las columnas, se obtiene una nueva matriz que se denomina la traspuesta de la primera.

Dada una matriz cuadrada hay determinadas propiedades que se espera que sean invariantes ante ciertas transformaciones lineales, que preservan la información existente en la matriz. Por ejemplo, si se transpone la matriz las propiedades básicas de los vectores que la forman no varían, ni la traza ni el determinante se modifican. Si se gira los vectores que la forman, es decir multiplicamos la matriz por una ortogonal, no se alteran ni sus magnitudes ni sus posiciones relativas, por lo que esperamos que las propiedades básicas de la matriz se mantengan. Por ejemplo, si en lugar de trabajar con los ingresos y los costes decidimos

trabajar con los beneficios, contruidos como ingresos-costes, y el volumen de actividad, definido como ingresos más costes, hemos aplicado una transformación ortogonal. Aunque la matriz cuadrada que representa las varianzas y covarianzas de las nuevas variables sea distinta de la original, la esencia del problema es la misma, y esperamos que la matriz de las nuevas variables tenga características idénticas a las de las variables originales.

Para precisar esta idea aparece el concepto de valores y vectores propios de una matriz cuadrada. Los valores propios son las medidas básicas de tamaño de una matriz, que no se ven alteradas si hacemos un cambio de coordenadas que equivale a una rotación de los ejes. Los vectores propios representan las direcciones características de la matriz y no son invariantes.

Al aplicar una matriz cuadrada de orden n , a un vector de dimensión n este se transforma en dirección y magnitud. Sin embargo, para cada matriz cuadrada, existen ciertos vectores que al transformarlos por la matriz solo se modifica su longitud (normal) y no su posición en el espacio. Estos vectores se denominan vectores propios de la matriz. [4.2]

4.2.3 Matriz de varianza y covarianza dado un conjunto de datos

Como se conoce, para variables escalares la variabilidad respecto a la media se mide habitualmente por la varianza, o su raíz cuadrada, la desviación típica. La relación lineal entre dos variables se mide por la covarianza. La covarianza que relación existe entre dos variables (x_j, x_k) [4.2] se calcula con la siguiente formula:

$$s_{jk} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k) \quad (2)$$

Donde n es el número de componentes por variable; variable x_{ij} , donde la i representa cada componente de la columna j ; \bar{x}_j es la media aritmética de la variable x_j ; la variable x_{ik} , donde la i representa cada componente de la columna k ; \bar{x}_k es la media aritmética de la variable x_k

4.2.4 Componentes principales

Un problema central en el análisis de datos multivariantes es la reducción de la dimensionalidad: si es posible describir con precisión los valores de p variables por un pequeño subconjunto $r < p$ de ellas, se habrá· reducido la dimensión del problema a costa de una pequeña pérdida de información.

El análisis de componentes principales tiene este objetivo: dadas n observaciones de p variables, se analiza si es posible representar adecuadamente esta información con un número menor de variables construidas como combinaciones lineales de las originales. Por ejemplo, con variables con alta dependencia es frecuente que un pequeño número de nuevas variables (menos del 20% de las originales) expliquen la mayor parte (más del 80%) de la variabilidad original.

La técnica de componentes principales es debida a Hotelling (1933), aunque sus orígenes se encuentran en los ajustes ortogonales por mínimos cuadrados introducidos por K. Pearson (1901). Su utilidad es doble:

Permite representar óptimamente en un espacio de dimensión pequeña, observaciones de un espacio general p -dimensional. En este sentido componentes principales es el primer paso para identificar posibles variables latentes o no observadas, que estén generando la variabilidad de los datos. 2. Permite transformar las variables originales, en general correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas, facilitando la interpretación de los datos. [4.3]

4.2.5 Cálculo de las componentes principales

El espacio de dimensión r que mejor representa a los puntos viene definido por los vectores propios asociados a los r mayores valores propios de la matriz S . Estas direcciones se denominan direcciones principales de los datos y a las nuevas variables por ellas definidas componentes principales. En general, la matriz X (y por tanto la S) tiene rango p , existiendo entonces tantas componentes principales como variables que se obtendrán calculando los valores propios o raíces características, $\lambda_1, \dots, \lambda_p$, de la matriz de varianzas y covarianzas de las variables, S , mediante:

$$|S - \lambda I| = 0; \quad (3)$$

y sus vectores asociados son:

$$(S - \lambda_i I) a_i = 0; \quad (4)$$

Los términos λ_i son reales, al ser la matriz S simétrica, y positivos, ya que S es definida positiva. Por ser S simétrica si λ_j y λ_h son dos raíces distintas sus vectores asociados son ortogonales. Si S fuese semidefinida positiva de rango $r < p$, lo que ocurriría si $p - r$ variables fuesen combinación lineal de las demás, habría solamente r raíces características positivas y

el resto serían ceros. Llamando Z a la matriz cuyas columnas son los valores de los p componentes de las n observaciones, estas nuevas variables están relacionadas con las originales mediante:

$$Z = XA; \quad (5)$$

donde $A'A = I$. Calcular los componentes principales equivale a aplicar una transformación ortogonal A a las variables X (ejes originales) para obtener unas nuevas variables Z no correlacionadas entre sí. Esta operación puede interpretarse como elegir unos nuevos ejes coordenados, que coincidan con los “ejes naturales” de los datos. [4.3]

4.2.6 Ejemplo del análisis de componentes principales

Paso 1: Obtener los datos iniciales [4.4] cuales son

Se tiene conjunto de datos inventados (columna 1 y 2 de tabla 4.1), de solo 2 dimensiones, y la razón por la que se ha elegido esto, es para poder proporcionar gráficos de los datos, y mostrar lo que está haciendo el análisis PCA en cada paso.

Paso 2: Resta la media

Para que PCA funcione correctamente, debe restar la media de cada una de las dimensiones de los datos.

Cálculo de la media $x=1.81$ $y=1.91$

La resta de la media por los datos originales (columna 3 y 4 de tabla 4.1)

Tabla 4.1: Datos originales y Datos ajustados

x	y	x'	y'
2.5	2.4	0.69	0.49
0.5	0.7	-1.31	-1.21
2.2	2.9	0.39	0.99
1.9	2.2	0.09	0.29
3.1	3	1.29	1.09
2.3	2.7	0.49	0.79
2	1.6	0.19	-0.31
1	1.1	-0.81	-0.81
1.5	1.6	-0.31	-0.31
1.1	0.9	-0.71	-1.01

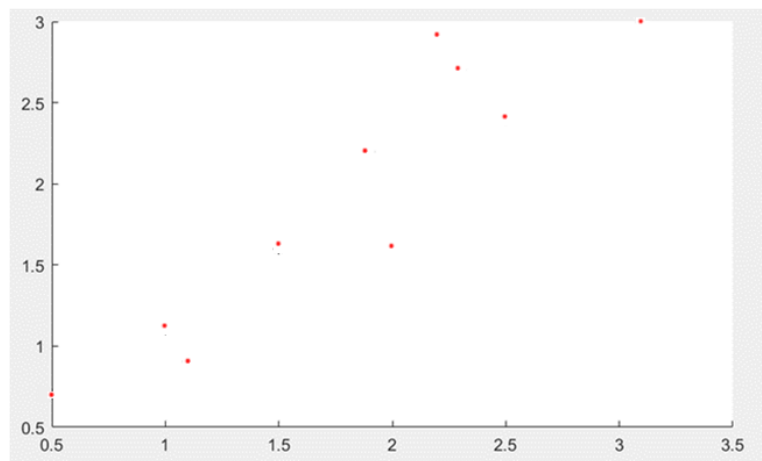


Figura 4.2: Muestra los datos originales del ejemplo de ACP

Paso 3: Calcular la matriz de covarianza

Dado que los datos son bidimensionales, la matriz de covarianza será de 2×2 , la matriz se arma, calculando la covarianza entre la variable x' y y' .

$$cov \begin{pmatrix} 0.61655556 & 0.61544444 \\ 0.61544444 & 0.71655556 \end{pmatrix}$$

Paso 4: Calcule los vectores propios y los valores propios de la covarianza

Dado que la matriz de covarianza es cuadrada, podemos calcular los vectores propios y los valores propios de esta matriz.

Vector propio

$$\begin{pmatrix} -.735178656 & -.677873399 \\ -.677873399 & -.735178656 \end{pmatrix}$$

Valor propio

$$\begin{pmatrix} .0490833989 \\ 1.28402771 \end{pmatrix}$$

Paso 5: elegir componentes y formar un vector de características

Matriz; se puede observar en la figura 4.3 están representado los dos vectores propios, se debe elegir el vector, que su recta este más cerca de los puntos que en este caso son los datos ajustados.

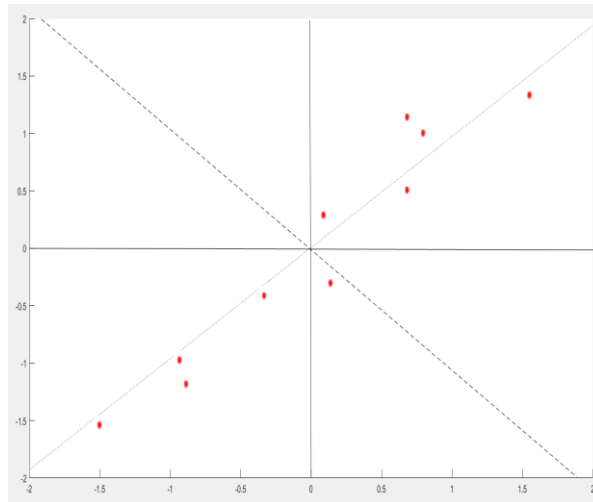


Figura 4.3: Gráfica de los datos normalizados (media restada) con los vectores propios, ejemplo del ACP

Vector de característica

$$\begin{pmatrix} -0.677873399 \\ -0.735178656 \end{pmatrix}$$

Paso 6: derivación del nuevo conjunto de datos

Datos Finales = fila característica vector X fila datos ajuste

Tabla 4.2: Datos transformados

x	y
-0.827	-0.175
1.777	0.142
-0.992	0.384
-0.274	0.130
-1.675	-0.209
-0.912	0.175
0.099	-0.349
1.144	0.046
0.438	0.017
1.223	-0.162

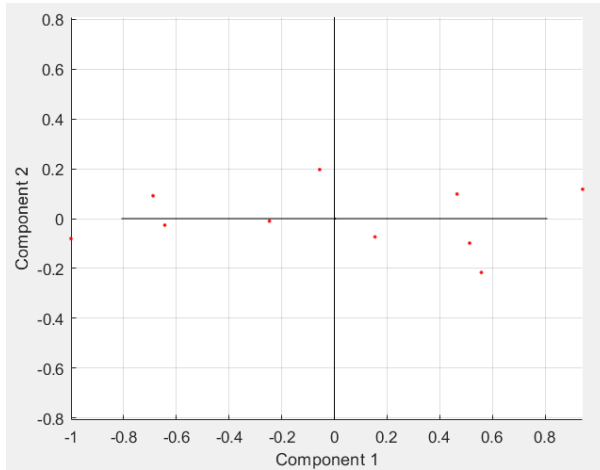


Figura 4.4: muestra la componente 1 y 2 del nuevo conjunto de puntos de datos

En la figura 4.4, están representados los datos la tabla 4.2, debido que el ejemplo era solo de dos variables, lo que obtenemos como resultado es giro de los datos originales. Como se puede ver en la figura 4.4.

Como se puede observar en este capítulo se explicaron las características y método de aplicación para realizar el cálculo del coeficiente de correlación lineal de Pearson y el análisis de componentes principales, la utilidad se verá en el capítulo 6, donde con estos métodos se hará el análisis de los datos adquiridos. En el siguiente capítulo se habla de la metodología de adquisición de los datos experimentales.

REFERENCIAS

- [4.1] Fallas, J. (2012). CORRELACIÓN LINEAL Midiendo la relación entre dos variables. Ucipfg.com. https://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/correlacion_lineal_2012.pdf
- [4.2] Personal.us.es. [citado el 18 de julio de 2022]. Disponible en: <https://personal.us.es/vararey/adatos2/correlacion.pdf>
- [4.2] Researchgate.net. [citado el 17 de julio de 2022]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/DanielPena/publication/40944325_Analisis_de_Datos_Multivariantes/links/549154880cf214269f27ffae/Analisis-de-Datos-Multivariantes.pdf
- [4.3] Smith LI. A tutorial on Principal Components Analysis [Internet]. Otago.ac.nz. 2002 [citado el 21 de julio de 2022]. Disponible en: http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf

CAPÍTULO 5

Metodología de adquisición de muestras

En el presente capítulo se presenta el desarrollo metodológico que se utilizó para adquirir los datos experimentales. Se describen los criterios de selección de los voluntarios, la técnica y condiciones para la recolección de la saliva. Se expone y describen los elementos principales que elementos utilizados en el procesamiento de la muestra.

Como en toda investigación experimental se debe planificar una metodología experimental, para dejar plasmada, todas las características necesarias para una toma de muestra y medición de muestra ideal.

5.1 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL.

Las actividades de la investigación se realizaron bajo la colaboración de la Clínica de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) para la adquisición de las muestras de saliva y en el Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE) en el laboratorio de óptica biomédica con el Grupo de Investigación en Óptica Biomédica (GIOB) para la medición y análisis de los espectros Raman, este trabajo se realizó en el periodo comprendido de enero a junio del 2022.

5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La población muestral la constituyen 32 sujetos, tomados mediante asignación aleatoria simple, con un rango de edad de 19 a 28 años, a los voluntarios se les recolectó las muestras de saliva no estimulada, en dos tiempo, para la sesión 01 estaban en condiciones de relajación (al inicio de un curso académico) y para la sesión 02 estaban bajo situación de estrés (al finalizar el curso académico), que será en el periodo de exámenes y entrega de trabajos, las muestras de saliva contienen la secreción de todas las glándulas salivales, por lo cual se obtiene cuando el voluntario está despierto y en reposo, siendo mínima la estimulación glandular o en ausencia de estímulos exógenos[5.1].

5.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Para obtener resultados confiables, que permitan alcanzar los objetivos planteados sin generar sesgos en las mediciones de los espectros, es primordial una selección eficaz de los voluntarios.

Los criterios inclusión para grupo experimental: son las características que debe cumplir el voluntario, si desea participar en el proyecto.

- Sujetos que acepten libremente en participar y firmen el consentimiento informado.
- Sexo indistinto.
- Sujetos sanos.
- Rango de edad de 19 a 28 años.

Los biomarcadores que se van a estudiar, no se afectan por el sexo del voluntario, pero si se limita el rango de edad, debido que, en diferentes etapas de la vida, se presentan diferentes tipos de estrés, y en este proyecto se está considerando solo el estrés académico. Además, los voluntarios deben estar sanos, debido que los biomarcadores, cortisol y melatonina se alteran por cualquier tipo de enfermedad. [5.2]

Los criterios de exclusión para el grupo experimental: son las características, que por ninguna circunstancia, el voluntario debe presentar, porque generan alteraciones no deseadas en los resultados.

- Índice de masa corporal (IMC) mayor de 35 kg/m^2 .
- Insuficiencia hepática o renal crónica.
- Tabaquismo (> a 3 cigarrillos/día).
- Alcoholismo.
- Embarazo.
- Uso reciente de ketoconazol.
- Presencia de enfermedad periodontal.
- Parasitosis.
- Hipertensión arterial.
- Hipotensión arterial.
- Tratamiento con corticoides en el último año o haber cursado con alguna enfermedad aguda en las últimas dos semanas.

- Problemas personales.
- Rutina de sueño irregular.

El biomarcador cortisol es biomarcador para diferentes tipos de enfermedades y afecciones físicas, por lo cual se descartan todas enfermedades que puedan generar alguna irregularidad en la concentración del biomarcador cortisol, además del estrés académico. Consumir alcohol, tabaco en exceso, también afecta en la toma de muestra, debido que generan irregularidades en el flujo de saliva, se descartan voluntarios con grandes problemas personales, como la pérdida de algún familiar, etc., debido que estas situaciones generan otro tipo de estrés, la presencia de una rutina de sueño irregular, afecta el ciclo circadiano de los biomarcadores, por lo cual, también afectaría, los resultados que se quieren obtener. [5.2]

Los criterios de eliminación de muestra para el grupo experimental: son las características, por las cuales se eliminó la muestra del fluido biológico.

- Muestras que presenten contaminación con sangre o lápiz labial.
- Aquellas que no alcancen la cantidad mínima para su análisis (2 ml).

Debido que la muestra es de un fluido biológico, saliva, se debe considerar descartar cualquier muestra que esté contaminada por factores externos. Si la muestra de saliva no alcanza un mínimo de 2ml, se eliminó debido, que es muy poca la muestras, para los análisis que se le realizarán posteriormente. [5.2]

5.4 EVALUACIÓN PSICOLÓGICA.

La evaluación psicológica se realizó a través de una entrevista al voluntario para explicarle todo lo referente al proyecto de investigación y se le entregó del consentimiento informado (anexo 1 en apéndice B), se le realizó la historia clínica propia del estudio (anexo 2 en apéndice B), y enseguida se le realizó el cuestionario de estrés académico (SISCO) (anexo 3 apéndice B), posteriormente se acudió a la clínica para la recolección de las muestras de saliva parcial no estimulada.

5.5 MUESTRA BIOLÓGICA SUJETA A ESTUDIO.

La saliva que se trabajo es totalmente no estimulada, por lo cual tiene la utilidad de contener la secreción de todas las glándulas salivales, por lo que es un buen indicador, para obtener los

biomarcadores que se quieren estudiar en la saliva, pero también se encuentran microorganismos, entonces se considera no estimulada ya que se obtiene cuando el individuo está despierto y en reposo, siendo mínima la estimulación glandular o en ausencia de estímulos exógenos.

5.6 ESTANDARIZACIÓN PARA LA TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE SALIVA.

Establecidos dichos parámetros, se tomaron en cuenta todos aquellos voluntarios que cumplan con los criterios de inclusión y se procedió a la toma de muestra salival bajo las siguientes condiciones: la toma de la muestra se llevó a cabo en un horario de 8-9 am, ya que la tasa salival varía en diferentes momentos del día, se realizó en un ambiente tranquilo con la finalidad de evitar que se genere algún tipo de estrés. Durante la hora previa a la toma de la muestra, no era posible beber ningún tipo de líquido (incluida el agua), comer, cepillarse los dientes o fumar y se le pidió al voluntario que se enjuagará la boca con agua desionizada y se esperará 10 minutos antes de proporcionar la muestra. [5.2]

La toma de la muestra se realizó en dos momentos diferentes, antes y después de someter al voluntario a una situación estresante.

Previo a la recolección de saliva el investigador rotuló los datos personales del participante (nombre, edad, sexo y el número de muestra). Para la recolección de muestras de saliva parcial no estimulada, se empleó el método de babeo pasivo o técnica de drenaje (como se observa en figura 5.1), para ello el voluntario estuvo sentado en posición de 90°, inclinando la cabeza hacia adelante, la saliva cayó espontáneamente a medida que se fue produciendo, permitiendo vaciar el fluido en un tubo de polipropileno estéril que estuvo cerca de su boca durando un tiempo de 15 minutos. [5.2]

Las muestras obtenidas se colocaron inmediatamente en un recipiente con hielo para ser transportadas al laboratorio (INAOE) y almacenarlas a -20°C hasta su procesamiento.



Figura 5.1 Método de babeo pasivo

Figura tomada de <https://salimetrics.com/wp-content/uploads/2017/04/saliva-instrucciones-de-uso.pdf>

5.7 ARREGLO EXPERIMENTAL.

En esta sesión describiré el espectrómetro y sus partes, láser, puntas de prueba Raman, parámetros experimentales para la obtención de los espectros. [5.3]

5.7.1 Espectrómetro QE65000.

El espectrómetro utilizado fue el espectrómetro QE65000 de Ocean Optics® el cual, incluye un arreglo lineal CCD conectado con todos los circuitos necesarios para la operación, usa un detector enfriado TE (TEC), 1044x64 elementos CCD de Hamamatsu, opera a través de USB (sin funcionamiento del TEC), o de una fuente de alimentación +5VDC, es controlado por un microcontrolador, por lo tanto, todos los parámetros operativos se ejecutan a través del software de interfaz a la unidad, la resolución óptica es de aproximadamente 0.14 a 7.7 nm FWHM ($\sim 6 \text{ cm}^{-1}$), sus dimensiones 182mm x 110mm x 47 mm y su peso 1.18 kg.

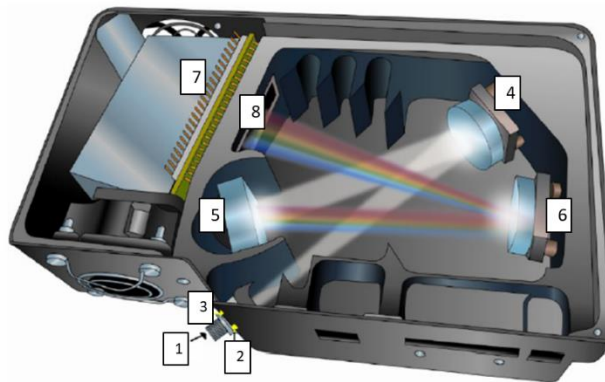


Figura 5.2 Componentes del espectrómetro

Figura tomada de la referencia: [5.2]

5.7.2 Componentes del espectrómetro QE65000

En la figura 5.2 se observa el espectrómetro con las componentes que a continuación se presentan, cada componente tiene un número que corresponde a su ubicación en la figura 5.2:

1. Conector universal estandarizado (SMA): Asegura la entrada de fibra en el espectrómetro. La luz entra a la fibra de entrada y esta lo conduce al banco óptico desde el conector.

2. Rendija (slit): pieza de material oscuro que contiene una abertura rectangular, la cual va montada directamente detrás del conector SMA. El tamaño de la abertura regula la cantidad de luz que entra al banco óptico y controla la resolución espectral.

3. Filtro: restringe las radiaciones ópticas de comprobar la validez de las regiones de longitud de onda determinada. La luz pasa a través del filtro antes de entrar en el banco óptico. Ambos filtros pasa altas y pasa banda están disponibles para limitar la radiación a determinadas regiones de longitud de onda.

4. Espejo colimador: la luz entra en el espectrómetro, pasa a través del conector SMA, la rendija, y filtro, entonces se refleja en el espejo colimador y se convierte en un haz de luz paralelo, para posteriormente incidir en la rejilla de difracción.

5. Rejilla de difracción: descompone la luz proveniente del espejo colimador en sus distintas longitudes de onda. Las rejillas están disponibles en diferentes densidades de líneas, lo que le permite especificar la longitud de onda de cobertura y resolución en el espectrómetro.

6. Espejo de enfoque: recibe la luz reflejada desde la rejilla y enfoca la luz en el detector CCD.

7. Arreglo lineal del CCD: capta la luz proveniente del espejo de enfoque. Cada pixel del arreglo responde a una zona del espectro y crea una respuesta digital, los datos digitales son enviados a la computadora para ser visualizados. Este arreglo cuenta con un enfriador TE que mantiene la temperatura del detector.

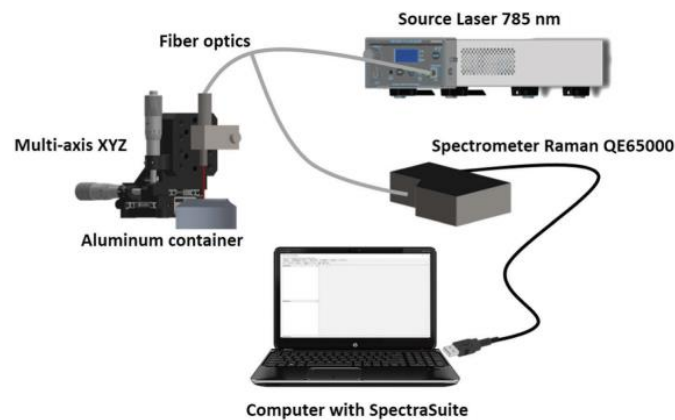
8. Detector con filtro OFLV: Elimina los efectos de segundo orden y se utiliza con una rejilla de HC-1 en un sistema de 200-950 nm de longitud de onda en un QE65000. [5.3]

5.7.3 Características del espectrómetro QE6500

- El rango espectral de 780 a 1000 nm
- La resolución óptica de 0.14 a 7.7 nm y FWHM ($\sim 6 \text{ cm}^{-1}$).
- Tiempo de integración de 8 ms a 15 min.
- Punta de prueba Raman RIP-RPB: El diseño más simple de una sonda de fibra óptica Raman consta de dos fibras montadas juntas. En esta configuración, una fibra se adjunta a la fuente de excitación láser y se ilumina la zona de muestreo. La otra fibra recoge la luz difusa y transmite la energía al espectrómetro. La luz colectada puede ser amplificada por medio de más fibras de colección o mejorar la superposición entre la excitación y la recaudación mediante la adición de fibras óptica de enfocamiento.

5.7.4 Montaje experimental general

Se ocupa para el arreglo experimental un láser como fuente de excitación de 785 nm, además se trabaja con una punta de prueba de dos fibras, de las dos fibras una hace el trabajo de colección y va conectada al espectrómetro y la otra va para la fuente de excitación con una bifurcación de emisión y la otra de colección, que va conectada al espectrómetro desde el cual se envía la señal a la computadora, la cual está conectada al espectrómetro mediante USB y el software que se ocupa es el Spectra Suite® desarrollado por Ocean Optics.



*Figura 5.3 Configuración experimental para la adquisición de espectros Raman
Figura tomada de la referencia: [5.3]*

5.8 SOFTWARE SPECTRASUITE

Luego de medir la muestra con el arreglo experimental, se utiliza un software para adquirir los espectros Raman, entre las características de dicho software está el rango espectral, el cual se trabajó de $200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ y se utilizó el paquete de software SpectraSuite (figura 5.4.), el mismo presenta una barra de herramientas en la que es posible variar parámetros como: tiempo de integración, exploraciones.

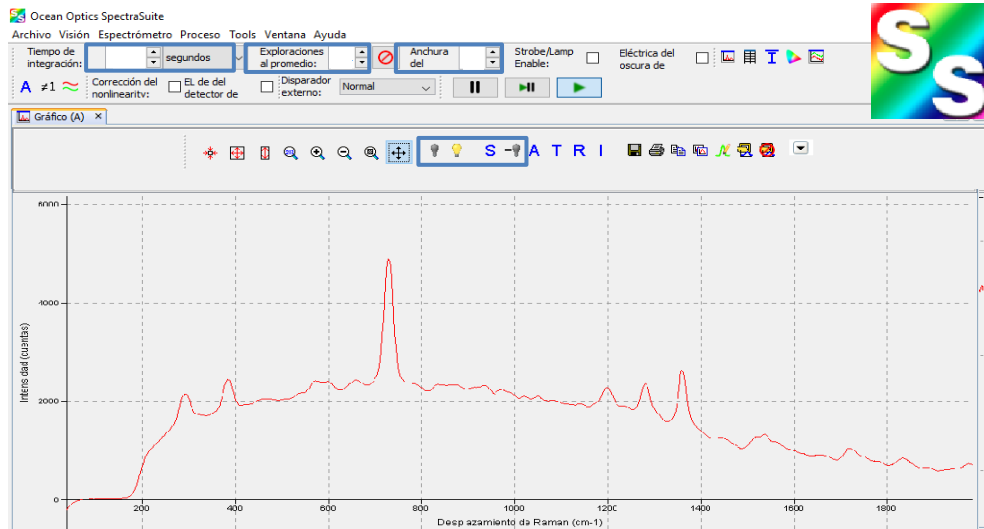


Figura 5.4 Pantalla del Software SpectraSuite, mostrando un espectro Raman con fluorescencia.

Parámetros del software SpectraSuite

En la figura 5.4 se pueden observar los parámetros encerrado en rectángulos de color azul los cuales son:

- Tiempo de integración: se refiere al tiempo en el cual el CCD recoge los fotones, se puede considerar como un tiempo de detección.
- Exploraciones promedio: permite promediar los espectros.
- Boxcar: permite reducir el ruido y suavizar el espectro.
- Control y adquisición de espectros se da clic a ambos iconos que tienen la bombilla oscura, este paso lo que hace es almacenar el espectro oscuro de la muestra y luego deja la señal aproximadamente en cero, luego se abre el obturador de la punta de prueba y se empieza el proceso de medición.

Luego de calibrar el espectrómetro Raman, se colocan los parámetros de control y adquisición en el software mencionados anteriormente, al momento de iniciar la medición se debe observar una señal acotada entre -5 y 5[U.A], que representa el rango del ruido inicial en el software (la señal de ruido se deberá mantener acotado en un rango mínimo comparado con la señal que se quiere adquirir), en la pantalla del software se observan dos ejes, el eje de las ordenadas representa las intensidades en unidades arbitrarias [UA] y en el eje de las abscisas se representan los desplazamientos Raman en unidades [cm^{-1}].

5.9 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS RAMAN.

Para lograr una buena adquisición de espectros Raman, el lugar donde se coloca el espectrómetro debe estar lo más oscuro posibles, para que solo interactúe el láser con la muestra (saliva), debido a que, la luz al entrar a la muestra se esparce en todas las direcciones, en este fenómeno la luz que es reemitida transporta información de los modos vibracionales de la muestra, por ser de interés de estudio el esparcimiento Raman es necesario el empleo de un filtro Notch el cual dejará pasar solo la luz esparcida (Raman) la misma pasa por una rejilla de difracción la cual divide la luz en diferentes longitudes de onda que son detectadas por un CCD siendo posible obtener la firma espectral de la muestra en estudio. Para el proceso de medición de los espectros de la saliva total no estimulada y de los biomarcadores propuestos cortisol y melatonina, se consideraron los siguientes equipos y parámetros experimentales:

- Temperatura ambiente promedio 23 ° C y humedad promedio 43%
- Contendor de aluminio 6065.
- Distancia láser a la muestra 7 mm aproximadamente.
- Se trabajó con un solo grupos experimental, pero con muestras de salivas en dos tiempos; sesión 01 (sin inducción de estrés) y sesión 02(con inducción de estrés)
- Rango de acotado del ruido al iniciar las mediciones -5 a 5.
- Unidades de los ejes para las gráficas: eje vertical que representa las intensidades en unidades arbitrarias [UA] y en el eje de las abscisas se representan los desplazamientos Raman en unidades [cm^{-1}]

Se midieron 20 espectros para cada muestra de saliva total no estimulada y de los biomarcadores propuestos cortisol y melatonina y en cada caso se adquirió una media del espectro, para un rango espectral de 200-1800 cm^{-1} .

5.10 APLICACIÓN DEL FILTRADO EN ESPECTROS RAMAN.

Después de la adquisición de los espectros Raman, se usó el filtro Whitaker-Henderson para los datos espectrales, el cual permite mediante el empleo de un algoritmo suavizar e interpolar los datos ruidosos, nos permite variar λ (parámetro de suavizado) y d (orden de penalización) para controlar el filtrado del espectro Raman. [5.4]

El filtro *Whitaker-Henderson* se empleó principalmente para eliminar el ruido de alta frecuencia del espectro Raman (figura 5.5), para suavizarlo como parte del procesamiento de la señal. Las ventajas de utilizar el filtro son la flexibilidad de su implementación y la eficiencia de los resultados obtenidos.

Además de suavizar la señal, la fluorescencia se elimina ajustando la línea de base mediante la función de *baseline*. El filtrado y la extracción de fluorescencia se realizó utilizando el software MATLAB® (R2020a). [5.4]

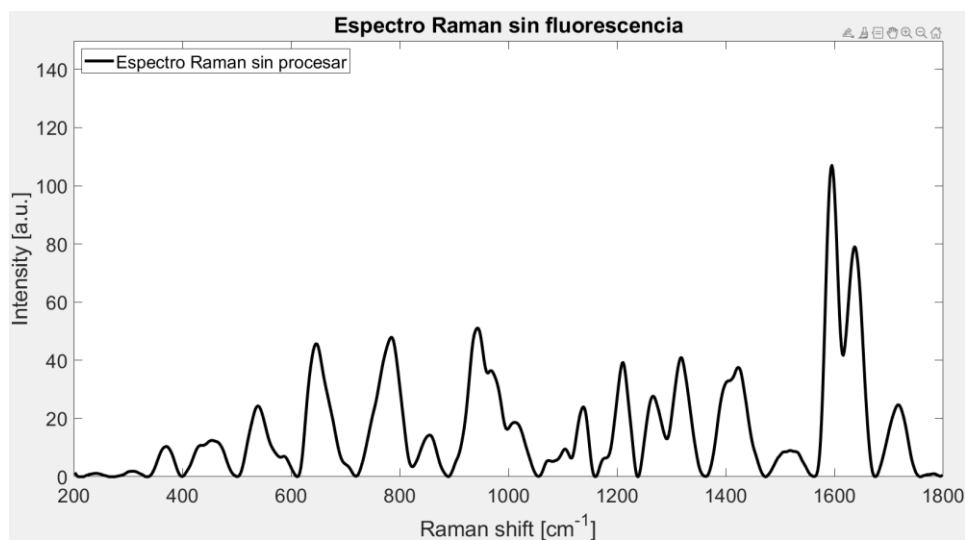


Figura 5.5 Espectro Raman resultado empleando el filtro de Whitaker-Henderson

5.11 ANÁLISIS DE ESPECTROS RAMAN.

A fin de analizar los espectros, lo primero que se realizó fue la caracterización espectral de los biomarcadores, cortisol y melatonina; para luego localizar las bandas Raman de los biomarcadores; posterior se caracterizaron los espectros Raman de las muestras de saliva para

los voluntarios en los dos tiempos (sin inducción de estrés y con inducción de estrés); para comparar y verificar a partir de las intensidades para cada banda Raman del espectro; así hallar la asociación de las concentraciones de estos biomarcadores presentes en la saliva .

Luego a través del coeficiente de correlación lineal de Pearson se ubicaron las bandas espectrales principales, considerando las bandas espectrales de tuvieran una mayor correlación con el nivel de estrés de los voluntarios. Por último, se implementó un proceso de clasificación mediante el análisis de componentes principales(ACP), con el objetivo de obtener una relación entre las bandas espectrales principales y el nivel de estrés adquirido con anterioridad por el inventario psicológico.

5.12 ASPECTOS BIOÉTICOS

El proyecto se llevó a cabo respetando los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos; incluida la investigación del material humano y de información identificables; de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial [5.3]. El artículo 7, establece que “la investigación médica está sujeta normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales”. Apegado al artículo 9 se protegerá la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de los participantes en la investigación. [5.5]

La participación fue voluntaria en todos los casos y cada individuo potencial recibió la información adecuada acerca del proyecto de investigación y de su colaboración en el mismo. Todas las dudas sobre de los objetivos, métodos, disposición de las muestras, beneficios calculados, entre otros, fueron aclaradas por el investigador o por el odontólogo tratante hasta asegurar el completo entendimiento de la información.

Por último, se presenta un diagrama con la metodología propuesta (figura 5.6), que resumen todo lo comentado en este capítulo. En el diagrama se divide en dos ramas principales, es decir, se trabajará con datos obtenidos de formas diferentes y que su análisis es totalmente diferente, hasta el final del diagrama que se obtienes las variables finales para realizar el análisis estadístico y así cumplir los objetivos propuesto en este proyecto.

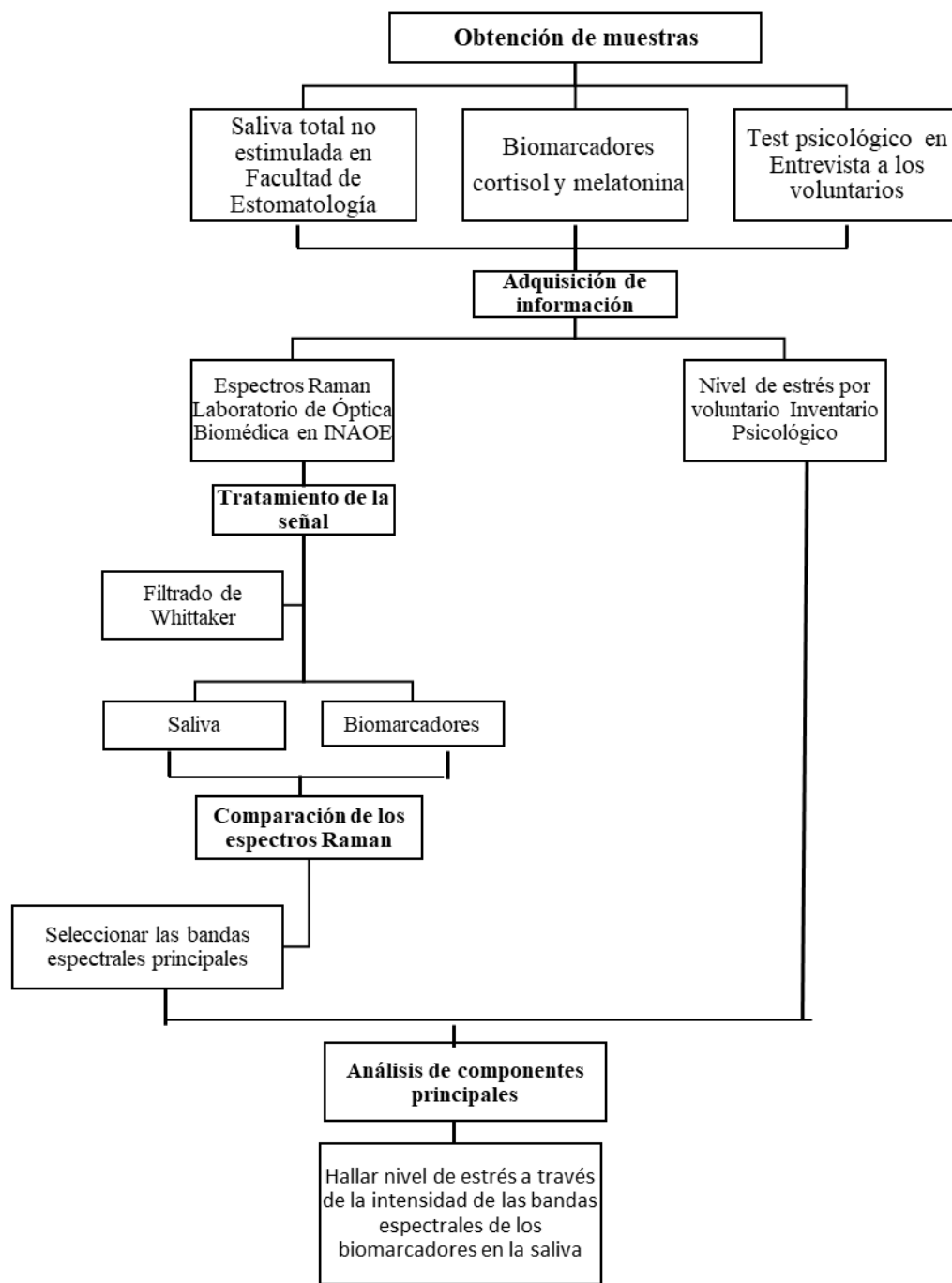


Figura 5.6 Muestra diagrama de flujo, del proceso experimental para analizar las variables de entrada y salida.

En este capítulo se presentó toda la metodología que se utilizará para, la toma de muestra, proceso de medición de la muestra biológicas y metodología de cómo se llenó el instrumento psicológico, en el siguiente capítulo se describe el análisis de datos obtenidos.

REFERENCIAS

- [5.1] Española De Epidemiología S, Públicaoral S. SALIVA Y SALUD DENTAL [Internet]. Sespo.es. [citado el 27 de julio de 2022]. Disponible en: <https://sespo.es/wp-content/uploads/Saliva-y-salud-dental-1998.pdf>
- [5.2] Prueba de cortisol [Internet]. Medlineplus.gov. [citado el 8 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-cortisol/>
- [5.3] Villanueva-Luna A. (2013). Espectroscopía Raman en fluidos biológicos extracelulares. [posgrado]. Instituto Nacional en Astrofísica, óptica y electrónica (INAOE).
- [5.4] Villalba-Hernández, C., Moyaho-Bernal, M. de L. A., Narea-Jiménez, F., Chavarría-Lizárraga, H. N., Galeazzi-Minutti, M. C., Carrasco-Gutiérrez, R., & Castro-Ramos, J. (2022). Periodontitis detection using Raman spectroscopy, support vector machine, and salivary biomarkers. *Journal of Raman Spectroscopy: JRS*, 53(5), 911–923. <https://doi.org/10.1002/jrs.6315>
- [5.5] Asociación Médica Mundial (2013). Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos Departamento de Humanidades Biomédicas. Universidad de Navarra. Pamplona. España. <http://repositorio.mederi.com.co/>

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

Luego de presentar los fundamentos teóricos, la técnica óptica con que se va a trabajar, los fundamentos matemáticos que se aplicaran para una correcta clasificación, además de la metodología experimental. En este capítulo se presentan los resultados experimentales y su análisis respectivo.

En la primera parte se habla de los espectros Raman adquiridos de los biomarcadores cortisol y melatonina, luego se muestran los espectros Raman adquiridos de las muestras de saliva para los voluntarios, en ambas sesiones. Posterior se identificaron los biomarcadores cortisol y melatonina en las muestras de saliva. Después se presenta la clasificación de los voluntarios por el nivel de estrés obtenido en el test psicológico y se le asigna un numero por nivel de estrés para posterior análisis.

Luego se calculan los coeficientes de correlación lineal de Pearson, entre las bandas espectrales Raman de los biomarcadores (cortisol y melatonina) y el nivel de estrés por voluntario; y por último se emplea el análisis de componentes principales (PCA), considerando solo las bandas espectrales principales por biomarcador y el nivel de estrés con la clasificados asignada anteriormente, con lo cual se adquiere una clasificación de los voluntario por la intensidad de las bandas espectrales principales en función de los tres niveles de estrés.

6.1 RESULTADOS

Se trabajó con 32 espectros Raman de voluntarios en la sesión 01(sin inducción de estrés) y 32 en la sesión 02(con inducción de estrés), para cada muestra se realizaron 20 medidas, registrando en total 1240 espectros; divididos en 640 espectros para la sesión 01 y 640 para la sesión 02; para análisis, además de adquirió las señales Raman de los biomarcadores cortisol y melatonina cuyas bandas fueron identificadas en los espectros de las muestras de saliva. A

todos los espectros se le estableció un rango espectral de 200cm^{-1} a 1800cm^{-1} desplazamientos Raman, debido a que esta zona es la mejor para el análisis de la señal; en el ámbito de la evaluación del estrés académico, los 32 voluntarios llenaron el inventario SISCO, a través de un formato online de Google, por lo cual se obtuvieron 32 test, uno por voluntario. (Apéndice C).

6.2 CARACTERIZACIÓN DEL BIOMARCADOR CORTISOL

En esta sección se presenta el proceso de adquisición del espectro Raman para el biomarcador cortisol, además de la firma espectral y las bandas espectrales Raman.

En el proceso de medición de los espectros para el biomarcador, se presentaron distintos tipos de ruidos en la señal obtenida, el más significativo de los ruidos, es debido a la fluorescencia. En la figura 6.1 se observa la señal pura, del espectro Raman para el biomarcador cortisol, es decir, la señal adquirida, a través, del software SpectraSuite. Es una señal que tiene todo tipo de ruidos, los cuales interfieren con la obtención de información.

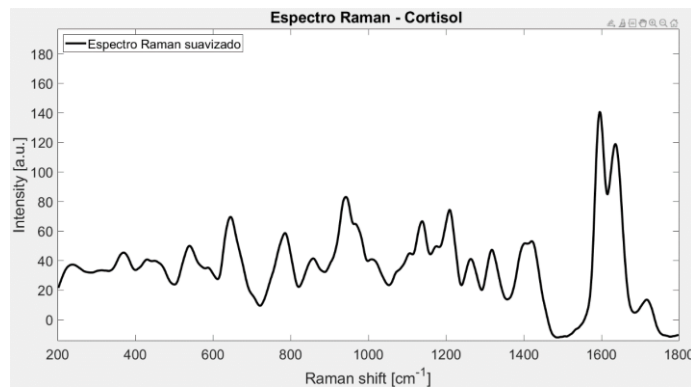


Figura 6.1 Espectro suavizado del biomarcador cortisol.

En la figura 6.2, se presenta el espectro Raman del biomarcador cortisol, luego que se le aplica el filtrado Whitaker-Henderson.

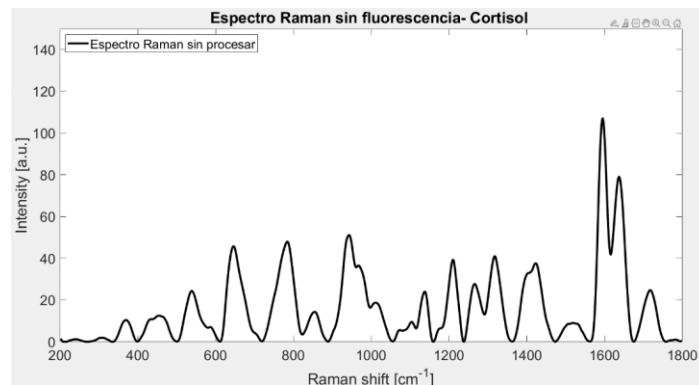


Figura 6.2 Espectro filtrado del biomarcador cortisol

Con el filtrado lo que se logro fue eliminar el ruido generado por la fluorescencia en la señal Raman, además de ajustar el espectro Raman a la línea base, con el fin de que estas variaciones no afecten, cuando se adquieran las intensidades de los picos característicos.

6.2.1 Firma espectral del biomarcador Cortisol

Luego de limpiar la señal de los espectros Raman del biomarcador cortisol, se le aplico un código del software de MALTAB, con el cual, a través de diversos ajustes matemático, funciones como el Gaussiano o Lorentziano, se modelo la curva del espectro Raman, con el fin de identificar los picos de máxima intensidad y señalar las posibles bandas espectrales Raman.

En la figura 6.3 se puede ver el espectro Raman del cortisol luego de aplicarle el código de MALTAB.

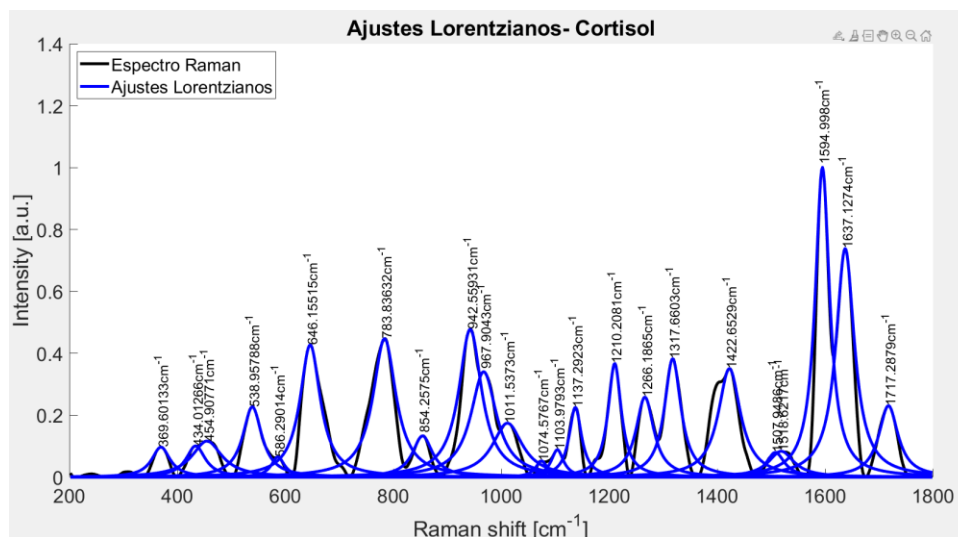


Figura 6.3 Espectro Raman con ajuste de curva y picos de mayor intensidad del biomarcador cortisol

Para el espectro Raman del biomarcador cortisol, que se presenta la figura 6.3, se le aplicó un ajuste de curva del tipo Lorentziano, es decir, se realizó un ajuste a la curva del espectro Raman utilizando la función del Lorentziano [6.1], esto se utiliza para modelar de forma matemática, los datos obtenidos experimentalmente y lograr identificar los picos de mayor intensidad, en el caso del biomarcador cortisol se percibe un numero de 23 picos.

Luego de adquirir la información del espectro Raman para cortisol, se buscó en la literatura,

trabajos anteriores, sobre el espectro Raman del cortisol.

En el 2019; T. Joshua Moore y Bhavya Sharma,[6.2], publicaron un artículo sobre la *detección espectroscópica Raman de cortisol en concentraciones fisiológicas*; en cual presentan una tabla con las bandas espectrales que ellos adquirieron.

Entonces basándose en dicho artículo, se realizó la identificación de las bandas espectrales, que se encontraron experimentalmente. En la figura 6.3, se observan que el código marco 23 picos; los picos que se encuentran desde 200cm^{-1} a 1050cm^{-1} , son considerados modos normales relacionados con la vibración del esqueleto de colesterol [6.2]; en la figura 6.4-b se puede ver la estructura que tiene este esqueleto de colesterol. Luego los picos que presentan desde 1074 cm^{-1} a 1717 cm^{-1} corresponden a vibraciones moleculares, entre los diversos enlaces que se observan en la figura 6.4-b.

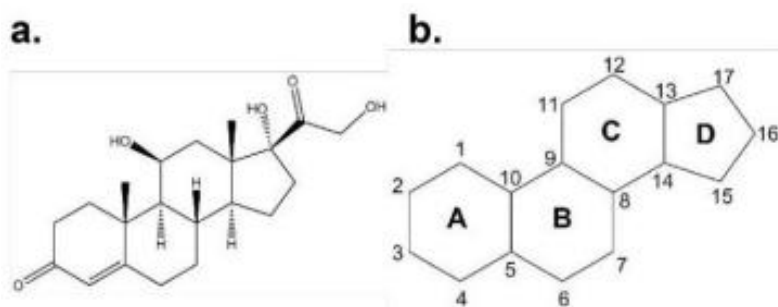


Figura 6.4. La estructura del cortisol (a) y las convenciones de identificación de anillos y numeración de carbonos para el esqueleto de colesterol presente en el cortisol (b)
Figura tomada de la referencia: [6.2]

En la tabla 6.1, se enumeran los picos encontrados experimentalmente, con su referencia en la literatura y el enlace molecular al que corresponde la banda espectral Raman.

Tabla 6.1: Picos Raman experimental de biomarcador cortisol y picos reportados en la literatura

Número de pico	Pico Raman Experimental (cm^{-1})	Referencia en la literatura (cm^{-1}) [6.2]	Enlace molecular
1	1074.576658	1073	Modo de respiración en anillo asimétrico del anillo C del cortisol.
2	1137.292314	1146	CH ₂ twist + CH bend + OH bend
3	1210.208064	1224	Estiramiento asimétrico C-C-C
4	1266.186506	1269	CH curva + CH ₂ curva+OH curva
5	1317.660335	1330	Estiramiento simétrico C-C-C en el anillo A
6	1422.652882	1435	CH ₂ tijera en los anillos A y B
7	1507.948616	1504	Estiramiento C=C ó deformación de anillo simétrico C-C-C

8	1595.998015	1609	Estiramiento C=C
9	1637.127432	1641	C=O en el anillo A de la molécula de cortisol
10	1717.2879	1704	Estiramiento C=O

6.3 CARACTERIZACIÓN DEL BIOMARCADOR MELATONINA

En esta sección se presenta el proceso de adquisición del espectro Raman para el biomarcador melatonina, además de su firma espectral y bandas espectrales Raman.

En el proceso de medir de los espectros para el biomarcador melatonina, se presentaron distintos tipos de ruidos en la señal obtenida, el más significativo de los ruidos, es debido a la fluorescencia.

En la figura 6.5 se observa la señal pura del espectro Raman para el biomarcador melatonina, es decir, es la señal que se adquirió por el software SpectraSuite, al medir el biomarcador melatonina.

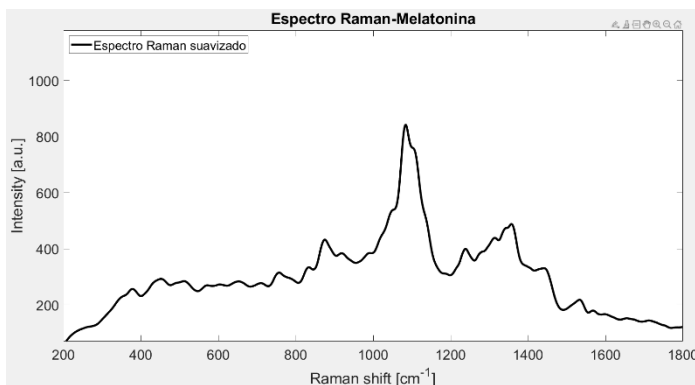


Figura 6.5 Espectro suavizado del biomarcador melatonina

En la figura 6.6 se tiene el espectro Raman del biomarcador melatonina luego de ser limpiado por el filtro Whitaker-Henderson.

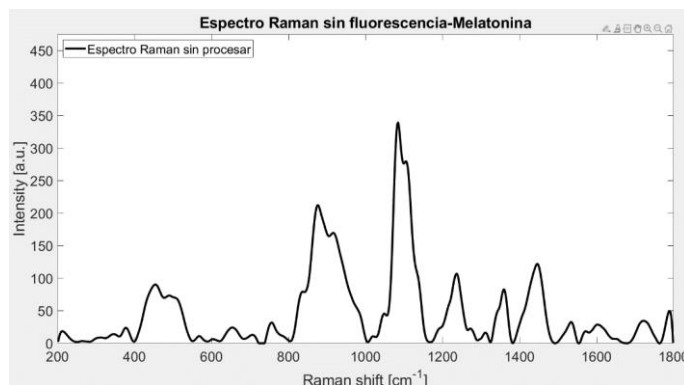


Figura 6.6 Espectro filtrado del biomarcador melatonina

Aplicando el filtro antes mencionado, en la figura 6.6, se logra observar una señal más

limpia, debido que ya no presenta ruido del tipo fluorescente, además se ajusta el espectro a la línea base.

6.3.1 Firma espectral del biomarcador Melatonina

Luego de limpiar la señal de los espectros Raman del biomarcador melatonina, aplico el código en software de MATLAB, mencionado en la sesión anterior. El cual ajustara el espectro Raman a una función matemática conocida, para identificar los picos con mayor intensidad. En la figura 6.7 se presenta el espectro Raman del biomarcador melatonina luego de aplicarle el código de Matlab, para identificar los picos de mayor intensidad y posibles bandas Raman

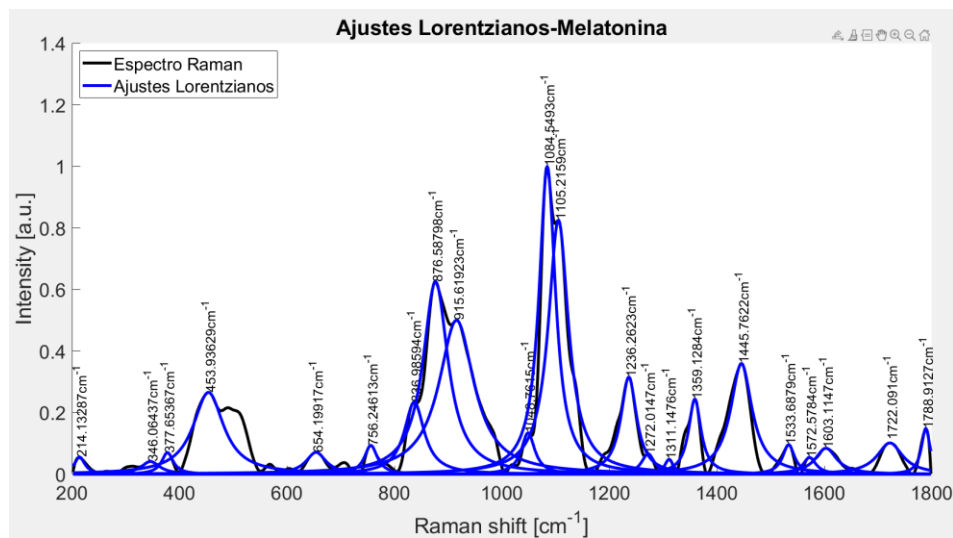


Figura 6.7 Espectro Raman con ajuste de curva y picos de mayor intensidad del biomarcador melatonina

El espectro Raman del biomarcador melatonina de la figura 6.7, presenta un ajuste de curva del tipo Lorentziano, es decir, se utilizó la función Lorentziano, debido que es la función que modela la curva del espectro con mayor similitud [6.1].

Luego de adquirir la información del espectro Raman, se buscó en la literatura trabajos, sobre el espectro Raman de la melatonina.

En el 2015, Guillermo Diaz Fleminga, Rainer Kochb et al., [6.3], publicaron un artículo sobre; *estudio Raman y SERS de N-acetil 5-metoxitriptamina, melatonina: la influencia de los diferentes fragmentos moleculares en el efecto SERS*; en el cual presentan el espectro Raman de la melatonina.

Se baso en dicho artículo para, identificar cuáles de los picos de la figura 6.7, representan a

una banda espectral de la melatonina

En la tabla 6.2, se enumeran los picos encontrados experimentalmente y su respaldo en la literatura, además se presentan los enlaces moleculares, correspondientes a cada banda espectral.

Tabla 6.2: Picos Raman experimental de biomarcador melatonina y picos reportados en la literatura

Número de pico	Pico Raman (cm^{-1}) Experimentales	Referencia en la literatura (cm^{-1}) [6.3]	Enlace molecular
1	346.97	331	Modo de torsión COC anular
2	377.06	386	Modo CCC LAM
3	453.94	456	75% deformación del anillo fuera del plano + 20 % de curvatura en el plano CO
4	654.20	651	Definición de anillo C-C-C
5	756.25	758	Flexión fuera del plano C-H
6	836.99	836	Modo CH en curva
7	876.59	862	Flexión en el plano C-H
8	915.62	928	Flexión CCC
9	1048.76	1045	CH3 balanceo fuera del plano + 20% O-CH3 estiramiento
10	1084.9	1083	O-CH3 estiramiento + 34% pirrol CCC flexión
11	1105.22	1106	Balanceo CH3
12	1236.26	1235	Torsión CH2
13	1272.86	1276	O-Ph extensión
14	1311.15	1311	CH3 simétrico
15	1359.13	1358	70% flexión NH + 20% estiramiento CN + 8% estiramiento C-C
16	1445.76	1449	73% N-H flexión + 45% C-N + 17% C=O estiramiento
17	1572.58	1553	Doblado en plano 90% N-H
18	1603.11	1590	Estiramiento del anillo C-C

Datos teóricos tomados de la referencia 6.3

6.4 ADQUISICIÓN Y FILTRADO DE ESPECTROS RAMAN DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

En esta sesión se presentará el procedimiento que se realizó para adquirir los espectros Raman de las muestras de saliva de los voluntarios. Después de adquirir, filtrar, analizar, y obtener las

firmas espectrales de los biomarcadores, se procedió a repetir el procedimiento, para las muestras de saliva de los 32 voluntarios. Debido que son demasiados espectros, se hará un ejemplo, del procedimiento para adquirir el espectro Raman de una muestra de saliva, con el fin de comprender paso a paso, el proceso de adquisición del espectro Raman para muestras biológicas.

Se comenzó midiendo con el espectrómetro Raman, la muestra de saliva de un voluntario; luego de medir la muestra de saliva 20 veces, se tomó la última medida del espectro Raman para la muestra de saliva.

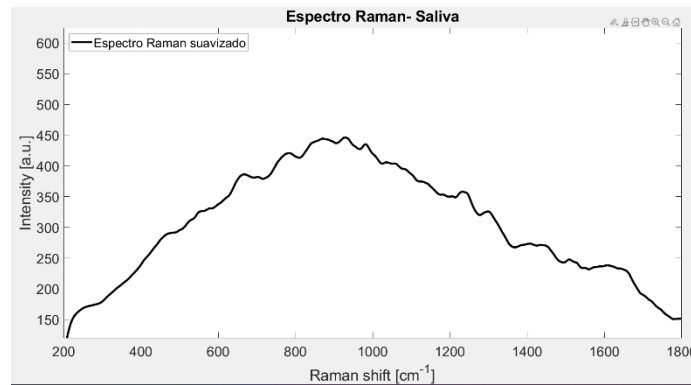


Figura 6.8 Espectro Raman suavizado de la muestra de saliva

En la figura 6.8, se muestra la señal Raman, obtenida del software SpectraSuite; se consideró el último espectro de la muestra de saliva como ejemplo de análisis debido, que normalmente luego de medir una muestra más de 15 veces, se obtiene una señal más estable, conforme al tipo de muestra que se está midiendo.

Después a la señal Raman adquirida, se le aplicó el filtro Whitaker-Henderson, para eliminar el mayor ruido posible. En la figura 6.9, se observa el espectro Raman sin fluorescencia.

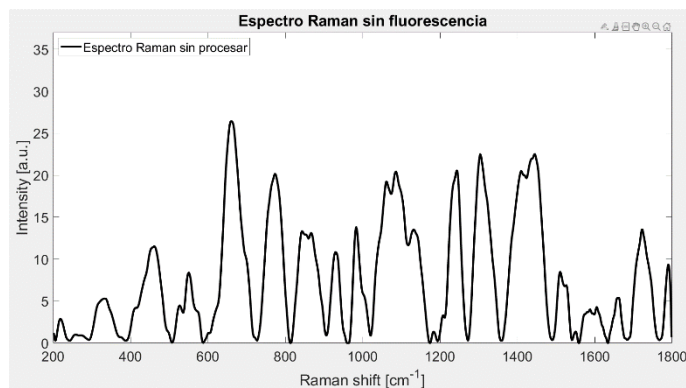


Figura 6.9 Espectro Raman filtrado de la muestra de saliva

En la figura 6.9 se tiene el espectro Raman de la muestra de saliva, después de disminuir el

ruido ocasionado por la fluorescencia; luego se le aplico el código del software Matlab, para realizar el ajuste de curva, con algunas de las funciones matemáticas e identificar los picos con mayor intensidad, con lo cual se obtiene la gráfica de la figura 6.10.

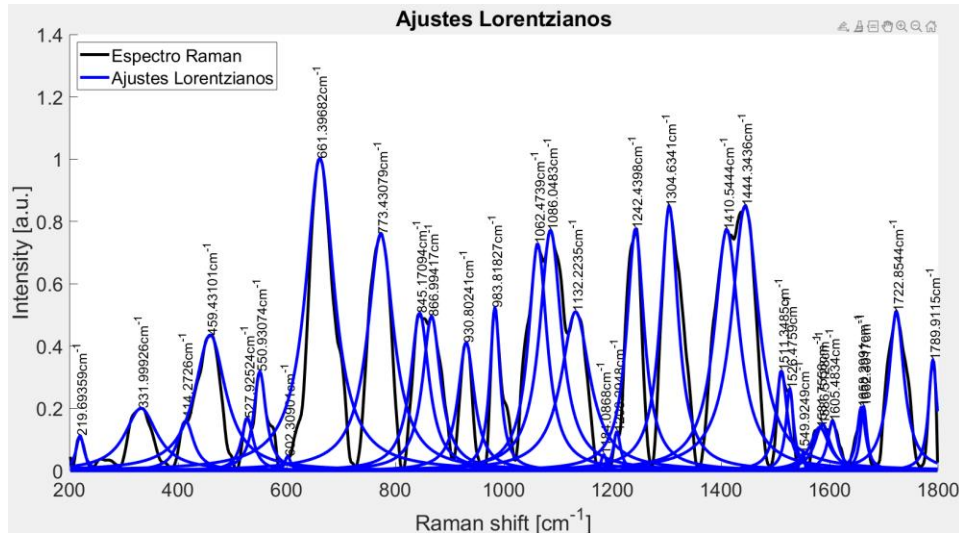


Figura 6.10 Espectro Raman con los picos de mayor intensidad, para la muestra de saliva

En la figura 6.10 se pueden observar varias características, la primera es la importancia de limpiar la señal del espectro Raman, se puede ver claramente la diferencia entre la figura 6.8 y la figura 6.10, otra de las características es que se utilizó un ajuste de curva tipo Lorentziano, debido que es la función que modela con mayor exactitud la curva del espectro Raman.

Ahora recordando la sesión 2.1, la saliva está constituida por diversos compuestos y su firma espectral es la mezcla de todos estos compuestos; para muestra de saliva que se utilizó en el ejemplo, se obtuvieron 32 picos, que se presentan en la tabla 6.3

Tabla 6.3: Picos Raman experimental de muestra de saliva

Número de pico	Pico Raman Experimental (cm⁻¹)
1	219.69
2	332
3	414.27
4	459.43
5	527.93
6	550.93
7	602.31
8	661.4
9	773.43

10	845.17
11	866.99
12	930.8
13	983.82
14	1062.47
15	1086.05
16	1132.22
17	1184.09
18	1208.29
19	1242.44
20	1304.63
21	1410.54
22	1444.34
23	1511.35
24	1526.48
25	1549.92
26	1581.76
27	1586.51
28	1605.48
29	1658.3
30	1662.3
31	1722.85
32	1789.91

Posterior de obtener la información del espectro, como se observa en la tabla 6.3, de proceder a comparar e identificar las bandas espectrales de los biomarcadores en el espectro Raman de la muestra de saliva.

De esta forma se analizó, cada una de las muestras de saliva adquirida, se analizaron 32 muestras de saliva para la sesión 01 y 32 muestras de saliva para la sesión 02. Posterior a cada muestra de saliva se tomó el ultimo espectro Raman, para realizar todo el proceso mencionado en esta sesión y se obtuvo una tabla de datos, por sesión.

En la cual se vació la información de los 32 voluntarios, para luego realizar el proceso de identificación de las bandas espectrales de los biomarcadores cortisol y melatonina.

En la próxima sesión se presenta el procedimiento que se realizó para identificar los biomarcadores cortisol y melatonina en la tabla de datos, adquirida de los espectros Raman de la saliva de los 32 voluntarios, en ambas sesiones.

6.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES EN LAS MUESTRAS DE SALIVA

En esta sesión se presentará el procedimiento que se realizó para identificar las firmas espectrales de los biomarcadores cortisol y melatonina, en los espectros Raman de las muestras de saliva, de los 32 voluntarios, para ambas sesiones; en el proceso se mencionan las bandas espectrales que se utilizaran para posterior análisis.

6.5.1 Identificación del biomarcador cortisol en muestra de saliva

Después de medir, filtrar y analizar los 32 espectros Raman por sesión, recordando que solo se tomó el ultimo espectro por voluntario, para realizar la identificación de la banda espectral del biomarcador cortisol.

Se comenzó realizando el proceso de comparar, la firma espectral Raman del biomarcador cortisol, con cada uno de los espectros Raman de las muestras de saliva como se percibe en la figura 6.11.

Un ejemplo de cómo se realizó este proceso es el siguiente, en la figura 6.11 se puede observar una gráfica con dos curvas; es decir, en una misma grafica se coloca el espectro Raman del cortisol (curva azul) y el espectro Raman de una muestra de saliva (curva naranja).

Se identifican los picos que coinciden, inspeccionando visualmente, para comparar ambos espectros Raman y así hallar los posibles picos que coincidan, después en la información extraída de los espectros, se ubican los picos identificados, para asignar un valor cercano a la banda espectral característica del biomarcador.

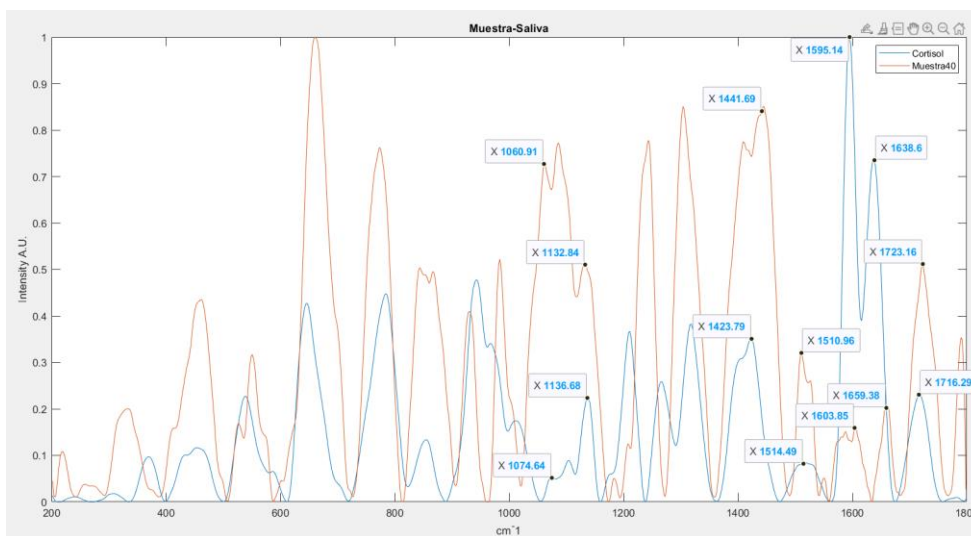


Figura 6.11 Muestra Espectro Raman de cortisol (curva azul) y espectro Raman de muestra de saliva (curva naranja).

En la figura 6.11, están señalados los picos de la curva naranja (muestra de saliva) que coinciden en un rango de $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ desplazamientos Raman, con la curva azul (firma espectral del cortisol), de esta manera luego de analizar cada uno de los 32 espectros Raman por sesión, se identificaron 7 bandas espectrales del biomarcador cortisol en los espectros de saliva de los 32 voluntarios, los cuales se muestran en tabla 6.4.

Recordando la tabla 6.1, donde se presentó las bandas Raman características de cortisol; el cortisol presenta 10 bandas espectrales, pero solo 7 fueron identificadas en la muestra de saliva de los 32 voluntarios. Entonces para los próximos análisis matemáticos solo se consideraron 7 bandas espectrales Raman para el biomarcador cortisol.

Tabla 6.4 Bandas espectrales Raman de cortisol, identificadas en los espectros Raman de las muestras de saliva de los voluntarios.

Número de banda	Banda espectral ($[\text{cm}^{-1}] \pm 20$)
1	1074.112
2	1136.322
3	1423.267
4	1514.494
5	1595.630
6	1636.714
7	1712.547

6.5.2 Identificación del biomarcador melatonina en muestra de saliva

Ahora para el biomarcador de melatonina, tenemos en la figura 6.12, una gráfica donde la curva de color azul representa el espectro del biomarcador melatonina, y la curva de color naranja representa el espectro Raman de una muestra de saliva de un voluntario. Se realizó el proceso de comparación primero de forma visual para detectar aquellos picos que coinciden entre ambos espectros Raman, después se buscó en la información adquirida de los espectros Raman, para dichos picos.

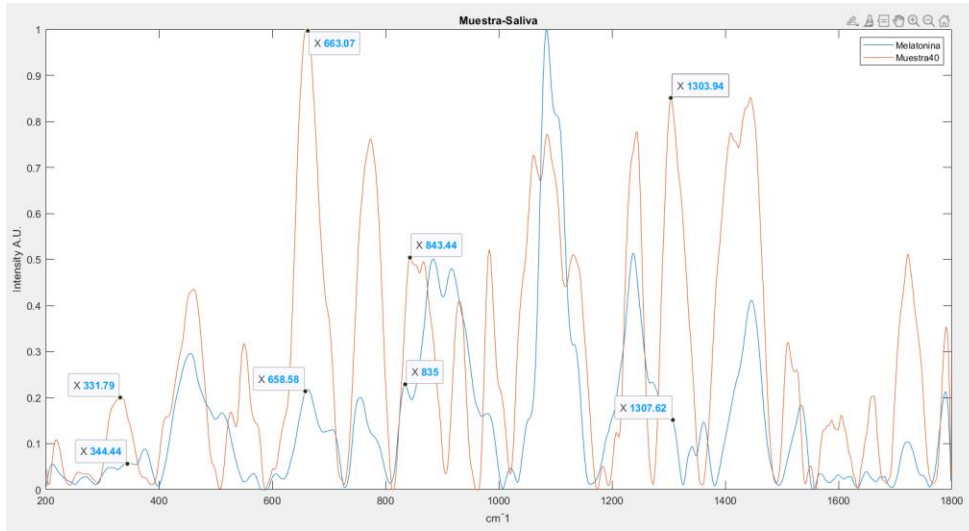


Figura 6.12 Muestra Espectro Raman de melatonina (curva azul) y espectro Raman de muestra de saliva (curva naranja).

En la figura 6.12, están señalados 4 picos que coinciden, entre la curva color naranja (espectro Raman de muestra de saliva) y la curva azul (firma espectral de la melatonina), en un rango de $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ desplazamiento Raman, es decir, cuando se analizó cada uno de los 32 espectros Raman, de las muestras de saliva, de los voluntarios, se consideró el valor del picos que se encontrara en un rango de 20 cm^{-1} desplazamiento Raman, hacia la derecha o hacia la izquierda, de la banda espectral Raman característica del biomarcador. Después de realizar todo este análisis se identificaron 4 bandas espectrales Raman de melatonina en los espectros de saliva. Dichos valores se presentan en la tabla 6.5.

Recordando la tabla 6.2, donde se presentan las bandas espectrales del biomarcador melatonina, solo se identificaron 4 bandas en las muestras de saliva. Una de las características, por la cual no se encontraron más picos, es debido que la toma de muestras se llevó a cabo, por la mañana y el biomarcador melatonina tiene mayor presencia en la saliva, por la noche. A pesar de esto, se consiguió presencia de melatonina en la saliva de todos los voluntarios del estudio.

Tabla 6.5 Bandas espectrales Raman de melatonina, identificadas en los espectros Raman de las muestras de saliva de los voluntarios.

Número de banda	Banda espectral ($[\text{cm}^{-1}] \pm 20$)
1	346.064
2	654.199
3	836.985

4	1311.147
---	----------

Se puede concluir de esta sesión, diversas características importantes, a considerar, la más importante, fue que se demostró de manera experimental, la presencia de los biomarcadores cortisol y melatonina en las muestras de saliva, en los 32 voluntarios, para ambas sesiones. Además, se demostró una diferencia entre los biomarcadores cortisol y melatonina, en el número de bandas espectrales Raman identificadas, esto es debió a un efecto a los ritmos circadiano de ambos biomarcadores, que mientras el cortisol presenta un pico de mayor concentración por la mañana, la melatonina presenta el pico de mayor concentración por la noche.

En la próxima sesión se presentará, el procedimiento para, analizar los datos adquiridos por el instrumento psicológico SISCO.

6.6 CLASIFICACIÓN DE VOLUNTARIOS POR NIVEL DE ESTRES

En esta sesión se presenta la clasificación de los voluntarios en el ámbito psicológico, a través de los datos adquirida al calcular el nivel de estrés, en los test psicológicos aplicados a los 32 voluntarios.

Recordando la sesión 2.4.3, donde se menciona la metodología de evaluar el inventario psicológico SISCO, se obtuvieron los siguientes datos.

En la tabla 6.6, los niveles de estrés están sesionados de la siguiente forma: de 0% a 48% es el nivel leve; de 49% a 60% es el nivel moderado; y de 61% a 100% es el nivel severo. Se obtuvo que, en el nivel leve están 4 voluntarios, en el nivel moderado están 14 voluntarios y en nivel severo están 14 voluntario.

Aquí se presenta una primera clasificación de los voluntarios en el ámbito psicológico; en la columna 3 de la tabla 6.6, se observa que ha cada grupo se le asigna un número del 1 al 3, siendo el nivel leve 1, nivel moderado 2 y nivel severo 3. Con el fin de utilizar dicha clasificación para el análisis de los datos.

Tabla 6.6 Nivel de estrés asociado a cada voluntario, obtenidos en el inventario psicológico

SISCO.

Número de voluntario	Nivel de estrés académico	Número Asignado
1	58%	2
2	53%	2
3	73%	3
4	43%	1
5	43%	1
6	69%	3
7	64%	3
8	71%	3
9	69%	3
10	58%	2
11	49%	2
12	56%	2
13	56%	2
14	54%	2
15	62%	3
16	58%	2
17	60%	2
18	56%	2
19	71%	3
20	66%	3
21	68%	3
22	69%	3
23	52%	2
24	45%	1
25	65%	3
26	70%	3
27	67%	3
28	57%	2
29	63%	3
30	56%	2
31	60%	2
32	47%	1

De esta forma se culmina la adquisición de datos experimentales, que posteriormente se utilizarán métodos de análisis para obtener la correlación planteada como objetivo del proyecto.

6.7 ANALISIS DE LAS BANDAS ESPECTRALES DE LOS BIOMARCADORES

En esta sesión se presentarán los resultados conseguidos luego de calcular los coeficientes de correlación lineal de Pearson entre las variables adquiridas en las sesiones anteriores.

6.7.1 Ejemplo del cálculo para obtener el coeficiente de correlación lineal de Pearson

Retomando de la tabla 6.4, las 7 bandas espectrales del biomarcador cortisol y de la tabla 6.6-columna 2, el nivel de estrés por voluntarios; además de considerar la ecuación 1 de la sesión 4.1.2, con la cual se calcula el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Se calculo el coeficiente de correlación lineal de Pearson; tomando como la variable “X” al nivel de estrés (tabla 6.6-columna 2) y la variable “Y” la intensidad que presenta cada voluntario en una banda espectral en específico (tabla 6.7-columna 3).

Para el ejemplo, se tomó una banda espectral Raman del biomarcador cortisol 1074 cm^{-1} de la sesión 01. Después de organizo las variables, que se utilizaron, verificando, que tuvieran el mismo número de componentes, ambas variables, es decir, que por cada nivel de estrés (variable X), le debe corresponder una intensidad de la banda espectral del voluntario (variable Y).

Luego se tomó el valor de intensidad, en la banda espectral 1074 cm^{-1} , para cada uno de los 32 espectros Raman, uno por cada voluntario, en la tabla 6.7 se presentan los valores que se utilizaron para el cálculo del coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Tabla 6.7 Nivel de estrés e intensidad de la banda espectral $1074\text{ cm}^{-1} \pm 20\text{ [cm}^{-1}\text{]}$, por voluntario para la sesión 01 del biomarcador cortisol.

Número de voluntario	Nivel de estrés académico	Intensidad [a.u]
	Variable “X”	Variable “Y”
1	58%	6.9298
2	53%	8.1483
3	73%	5.3159
4	43%	27.1232
5	43%	7.5605
6	69%	5.9834
7	64%	3.382
8	71%	8.737
9	69%	18.8577
10	58%	11.2216
11	49%	9.1369
12	56%	9.1319

13	56%	9.5406
14	54%	35.6105
15	62%	7.8349
16	58%	18.1097
17	60%	8.3899
18	56%	8.066
19	71%	8.133
20	66%	2.061
21	68%	8.5481
22	69%	4.5646
23	52%	10.2703
24	45%	6.8845
25	65%	6.0051
26	70%	6.6414
27	67%	28.7477
28	57%	8.3697
29	63%	6.7365
30	56%	5.6448
31	60%	7.6913
32	47%	19.1972

Después de organizar los datos necesarios para el cálculo, se aplicó la función de coeficiente de correlación lineal de Pearson en el programa de Matlab (ver APÉNDICE A).

El resultado que se obtuvo del código de Matlab (Apéndice A- figura 1), fue un coeficiente de correlación de -0.27 entre las variables antes mencionadas. Este valor indica una correlación negativa, entre las variables, es decir, mientras los valores de la variable “X”, la cual es el nivel de estrés por voluntario, van aumentando; los valores de la variable “Y”, en este caso la intensidad en la banda espectral 1074 cm^{-1} por voluntario van disminuyendo.

Del resultado obtenido, en el ejemplo para calcular el coeficiente de correlación lineal de Pearson, se pueden relatar varios puntos importantes; es una herramienta útil para conocer cuánto es el nivel de correlación entre dos variables, además a través del signo del resultado, conocer qué tipo de correlación está presente entre ambas variables, desventaja de este tipo de correlación, solo se evalúa si hay una correlación lineal entre las variables, es decir, que si la correlación es de otro tipo, no se podrá identificar, a través del coeficiente de correlación lineal de Pearson.

Posterior a explicar paso por paso, el procedimiento para el cálculo del coeficiente de

correlación lineal de Pearson. Se presentará en las próximas subsecciones, los resultados obtenidos del coeficiente de correlación lineal de Pearson, para cada banda espectral de los biomarcadores cortisol y melatonina, en ambas sesiones de muestras de saliva.

6.7.2 Biomarcador cortisol

Se calculo el coeficiente de correlación lineal de Pearson, a las 7 bandas espectrales del cortisol, para la sesión 01 y la sesión 02 adquiridas de las muestras de saliva de los voluntarios. Por cada banda espectral, se tomó el valor de la intensidad, por espectro de saliva, es decir, cada espectro Raman representa un voluntario, y cada espectro tiene la presencia de las 7 bandas espectrales, cada banda espectral tiene un valor de intensidad, y este es el valor necesario para calcular la correlación entre el nivel de estrés y la intensidad de los 32 voluntario. Así que utilizando el código de Matlab del *Apéndice A-figura1*, se calculó la correlación entre cada banda espectral y el nivel de estrés para los 32 voluntario. De este cálculo se obtuvo los valores plasmados en la tabla 6.8.

Tabla 6.8 Coeficientes de correlación por sesión para las bandas espectrales del biomarcador cortisol.

Número de banda	Banda espectral ($[cm^{-1}] \pm 20$)	Coeficiente de correlación lineal de Pearson	
		Sesión 01	Sesión 02
1	1074.112	-0.270	0.040
2	1136.322	-0.099	0.236
3	1423.267	-0.269	0.287
4	1514.494	0.162	0.170
5	1594.630	0.062	-0.105
6	1636.714	0.217	0.087
7	1712.547	0.040	-0.053

De la tabla 6.8, se puede obtener información útil, de la relación entre la concentración del biomarcador cortisol en las muestras de saliva y el nivel de estrés de los 32 voluntarios, para ambas sesiones.

Recordando que la sesión 01, son las muestras de saliva, para los voluntarios sin inducción de estrés y la sesión 02, son las muestras de saliva, para los voluntarios con inducción de estrés; tenemos de la tabla 6.8, que los picos $1074,11\text{ cm}^{-1}$, $1136,32\text{ cm}^{-1}$, $1423,26\text{ cm}^{-1}$, y $1514,49\text{ cm}^{-1}$, presentan un valor de correlación mayor, en la sesión 02, es decir, cuando los voluntarios están con inducción de estrés, este resultado demuestra, que el estrés inducido

en los voluntarios, aumenta el valor de la intensidad en estas bandas espectrales.

Con este resultado tenemos un primer indicativo, que si se puede detectar la variación de concentración de cortisol en las muestras de saliva. Ahora para las bandas espectrales $1594,63\text{ cm}^{-1}$, $1636,71\text{ cm}^{-1}$, y $1712,54\text{ cm}^{-1}$ obtenemos el resultado contrario, presentan un valor de mayor correlación para la sesión 01, es decir, cuando los voluntarios están sin inducción de estrés. Igualmente demuestran una variación en la concentración de cortisol en la saliva, si se comparan los valores de ambas sesiones.

Entonces aquí obtenemos otra clasificación de los voluntarios, ahora considerando las bandas espectrales, donde 5 de ellas presentan mayor concentración en la sesión 02 y 3 presentan mayor concentración en la sesión 01.

En la próxima subsección se presentará la relación entre las bandas espectrales de la melatonina y el nivel de estrés para los 32 voluntarios.

6.7.3 Biomarcador melatonina

Considerando ahora las bandas espectrales del biomarcador melatonina que están en la tabla 6.5, como la variable “Y” y el nivel de estrés de la tabla 6.6, como la variable “X”, luego se calculó los coeficientes de correlación lineal de Pearson entre las variables “X y Y”, obteniendo como resultados, los coeficientes de correlación para las 4 bandas espectrales del biomarcador melatonina. Recordando que, se tomó el valor de la intensidad, en cada banda espectral Raman, es decir, para cada uno de los 32 espectros Raman, se tomó el valor de intensidad, en cada uno de los cálculos, considerando la banda espectral como constante.

Los resultados del cálculo, para las 4 bandas espectrales, están plasmado en la tabla 6.9., los coeficientes de correlación, por cada banda espectral en la sesión 01 y la sesión 2, del biomarcador melatonina.

Tabla 6.9 Coeficientes de correlación por sesión para las bandas espectrales del biomarcador melatonina.

Número de banda	Banda espectral ($[cm^{-1}] \pm 20$)	Coeficiente de correlación lineal de Pearson	
		Sesión 01	Sesión 02
1	346.064	-0.089	-0.225
2	654.199	-0.247	0.301
3	836.985	-0.219	0.299
4	1311.147	-0.457	0.224

De la tabla 6.9, se pueden obtener información útil de la relación entre la concentración de melatonina en la saliva y el nivel de estrés por voluntario para ambas sesiones.

A diferencia del biomarcador cortisol; en este caso las cuatro bandas espectrales del biomarcador melatonina, presentan un valor de mayor correlación en la sesión 02, es decir, cuando los voluntarios están con inducción de estrés. Este resultado demuestra, que el estrés inducido, afectada la concentración de melatonina en la saliva de los voluntarios.

Lo que se quiso explicar en esta sesión, fue como, a través, de calcular el coeficiente de correlación lineal de Pearson, para cada banda espectral de ambos biomarcadores, demostrar la diferencia de las concentraciones, en los biomarcadores cortisol y melatonina en las muestras de saliva, cuando los voluntarios están sin inducción de estrés y con inducción de estrés.

Pero, aunque en los resultados de la tabla 6.8 y 6.9 se observa la diferencia, los valores de correlación en general son muy bajos, debió que para obtener una correlación aceptable debe estar cerca al ± 1 . Además, con este método de correlación solo se puede obtener la relación entre dos variables, por lo cual se está perdiendo gran parte de información en general, por otro lado, puede suceder que la relación entre las variables no se lineal y debido a esto, los valores de correlación están dando tan pequeños.

Por lo cual, en la próxima sesión se analizará todas las variables obtenidas hasta este momento juntas, a través, del análisis de componentes principales.

Para mostrar una clasificación más amplia y considerando, para el biomarcador cortisol las 7 bandas espectrales contra el nivel de estrés por voluntario; y para el biomarcador melatonina las 4 bandas espectrales contra el nivel de estrés por voluntario.

Las variables para tomar en cuenta son, la intensidad por banda espectral y el nivel de estrés por voluntario, para aplicar en la próxima sesión el análisis de componentes principales.

6.8 CLASIFICACIÓN A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Luego de calcular los coeficientes de correlación lineal de Pearson, en esta sesión se presentará el proceso que se realizó, para el análisis estadístico, además de presentar los gráficos, donde se unifica toda la información experimental adquirida.

En esta primera parte de la sesión se presentará el análisis de componentes principales, por biomarcador, primero el cortisol y posterior la melatonina.

6.8.1 Biomarcador cortisol

Después de calcular los coeficientes de correlación lineal de Pearson, se observó la relación que se obtuvo entre las 7 bandas espectrales y el nivel de estrés para la sesión 01 y la sesión 02 (tabla 6.8).

Ahora para el análisis de componentes principales, se comenzó tomando el valor de las 32 intensidades por cada banda espectral, es decir, tenemos 7 variables con 32 componentes cada una, posteriormente se tomó el valor asignado a cada nivel de estrés (tabla 6.6-columna3), para los 32 voluntarios, así se obtuvo que los datos originales para el análisis de componentes principales, son 8 variables de 32 componentes cada una.

Este proceso de selección se realizó para ambas sesiones, es decir, tendremos dos análisis de componentes principales, para el biomarcador cortisol, uno sin inducción de estrés y otro con inducción de estrés.

Luego de organizado, todos los datos que se quieren analizar, se utilizó un código en el software Matlab (APÉNDICE A), para aplicar el análisis de componentes principales y obtener una gráfica con las nuevas componentes.

Con el cual se obtuvo la distribución de la figura 6.13, para la sesión 01

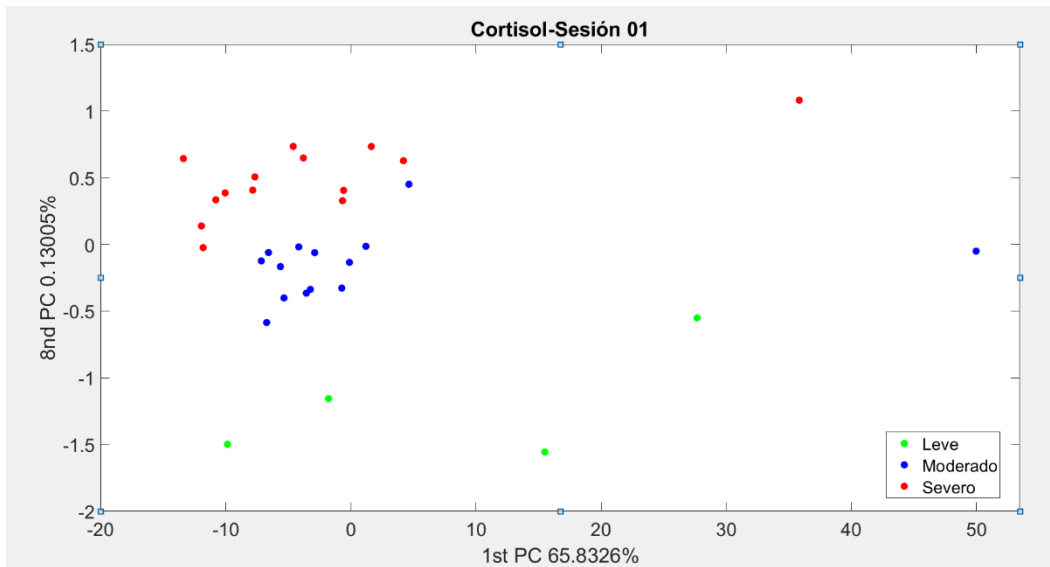


Figura 6.13 Muestra las componentes principales 1 y 8, de los 32 voluntarios.

De la figura 6.13 se observan características importantes de este tipo de análisis estadístico, entre ellas están, poder graficar 8 variables en un gráfico de dos dimensiones, obtener la mayor información posibles de los 32 voluntarios, en dos componentes principales, además de obtener una clasificación de las intensidades de las bandas espectrales por el nivel de estrés de cada voluntario, como se puede observar en la leyenda de la figura 6.13, cada color representa un nivel de estrés y cada punto representa a un voluntario.

La distribución de los puntos también es una característica a considera, debió que todos los voluntarios con un nivel de estrés severo están ubicados en la parte superior de la gráfica y a medida se el nivel de estrés va disminuyendo, los grupos de puntos también se van desplazando a la parte inferior de la gráfica.

Luego se repite el proceso de análisis para los datos de la sesión 02 y se obtuvo la distribución de la figura 6.14.

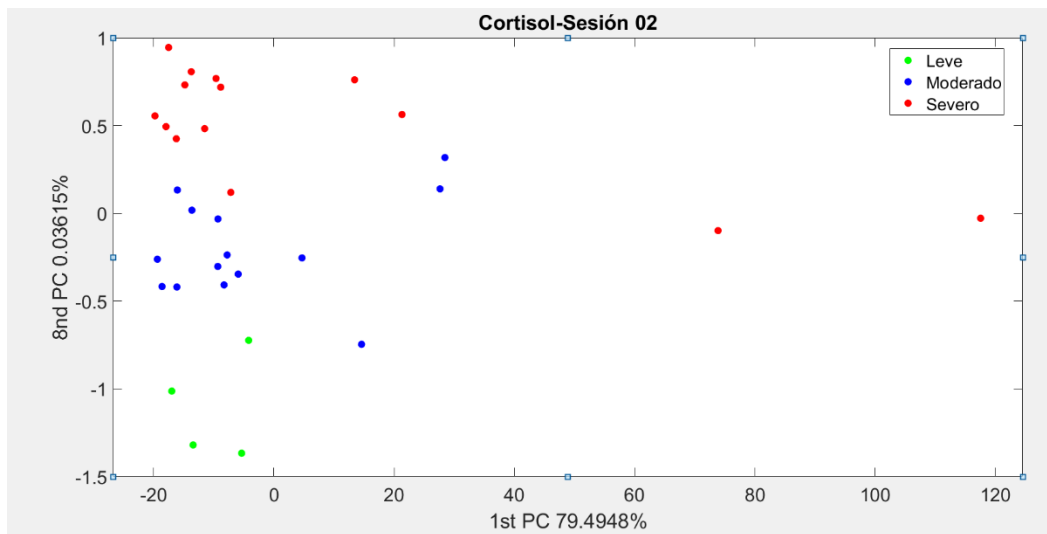


Figura 6.14 Muestra las componentes principales 1 y 8, de los 32 voluntarios.

Ahora en la sesión 2 se puede ver en figura 6.14, características similares al análisis de la sesión 1, entre ellas están, se graficó 8 variables en un gráfico de dos dimensiones y se obtuvo una clasificación de las intensidades de las bandas espectrales por el nivel de estrés de cada voluntario. En la gráfica cada grupo está identificado con un color, como se ve en la leyenda y representa un nivel de estrés.

Cada punto en la gráfica representa un voluntario, y la distribución de los puntos nos da la información que mientras menos estrés presenta, el grupo de puntos estará en la zona más baja del gráfico.

Así es como, a través, del biomarcador cortisol, se puede considerar dividir la distribución de puntos en el gráfico, de la figura 6.13 y 6.14, en tres zonas claramente identificadas por el nivel de estrés.

De esta forma solo considerando las intensidades de las 7 bandas espectrales, de una muestra de saliva, se podrá ubicar a un voluntario externo en uno de los tres grupos, debido a las similitudes obtenidas en sus intensidades.

6.8.2 Biomarcador melatonina

Con el biomarcador melatonina es tiene que luego de calcular los coeficientes de correlación lineal de Pearson, se observó la relación que se obtuvo entre las 4 bandas espectrales y el nivel

de estrés para la sesión 01 y la sesión 02 (tabla 6.9).

Ahora para el análisis de componentes principales, el proceso es igual que para el biomarcador cortisol; se comenzó tomando el valor de las 32 intensidades por cada banda espectral, es decir, tenemos 4 variables con 32 componentes cada una, posterior se tomó el valor asignado a cada nivel de estrés (tabla 6.6-columna3), para los 32 voluntarios, así se obtuvo que los datos originales para el análisis de componentes principales, son 5 variables de 32 componentes cada una.

Este proceso de selección se realizó para ambas sesiones, es decir, tendremos dos análisis de componentes principales, para el biomarcador melatonina, uno sin inducción de estrés y otro con inducción de estrés.

Luego de organizado, todos los datos que se quieren analizar, se utilizó un código en el software Matlab (APÉNDICE A), para aplicar el análisis de componentes principales y obtener una gráfica con las nuevas componentes. Con el cual se obtuvo la distribución de la figura 6.15, para la sesión 01.

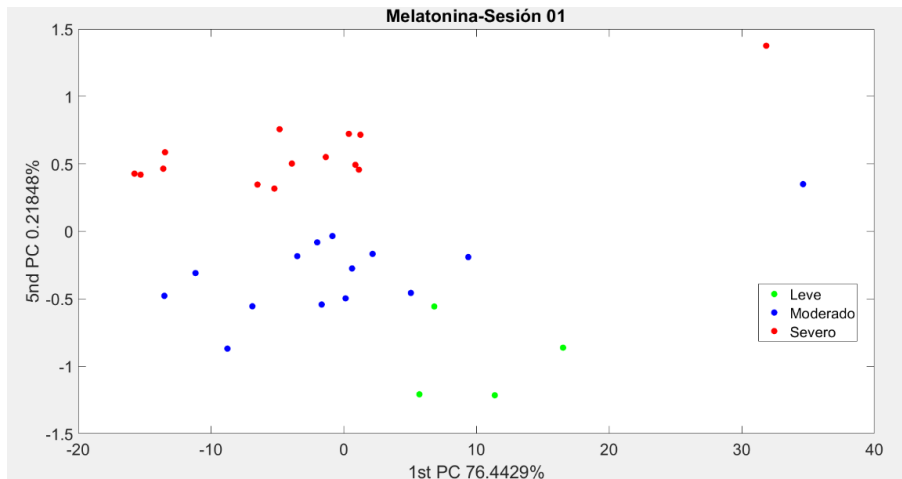


Figura 6.15 Muestra las componentes principales 1 y 5, de los 32 voluntarios

Para la sesión 1 del biomarcador melatonina, obtenemos del análisis la distribución de puntos de la figura 6.15, se pueden ver características como, tener 5 variables y lograr un gráfico de dos dimensiones y obtener una clasificación de las intensidades de las bandas espectrales por el nivel de estrés de cada voluntario, con las componentes principales 1 y 5. Considerando lo que nos muestra la leyenda de la gráfica, los voluntarios que presentan un nivel de estrés leves están ubicados en la zona inferior de la gráfica, es decir, que con este análisis podemos

identificar qué nivel de estrés presenta un voluntario con solo medir su espectro Raman y comparar con los datos ya obtenidos.

Luego se repite el proceso de análisis para los datos de la sesión 02 y se obtuvo la distribución de la figura 6.16.

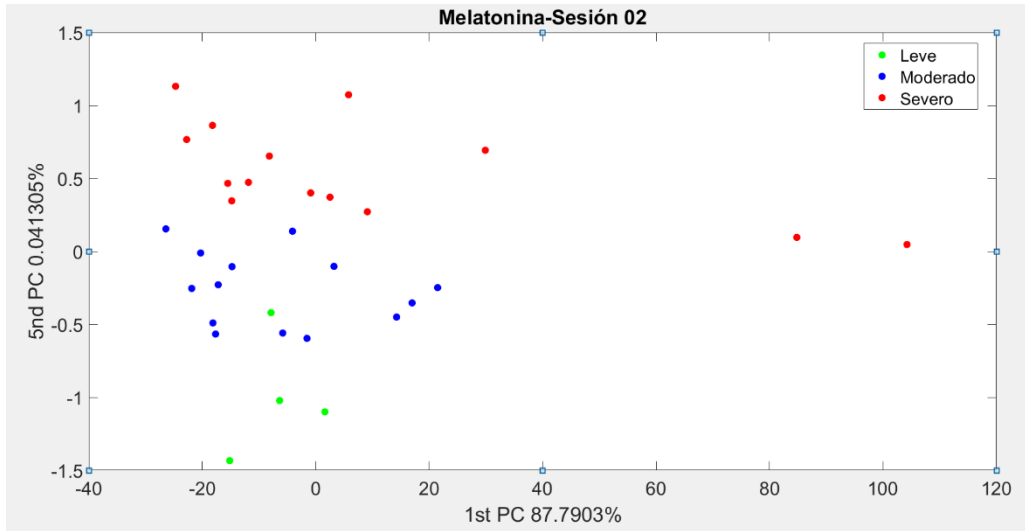


Figura 6.16 Muestra las componentes principales 4 y 5, de los 32 voluntarios

En la sesión 2 del biomarcador melatonina, para la figura 6.16 se pueden ver características similares al análisis de las sesiones 1, como son, tener 5 variables y generar un gráfico de dos dimensiones y obtener una clasificación de las intensidades de las bandas espectrales por el nivel de estrés de cada voluntario. Con una distribución de los puntos muy clara en el espacio de la gráfica, la cual, si nos guiamos por la leyenda, el grupo de voluntarios leve están ubicado en la esquina derecha inferior y se van desplazando los grupos de puntos hasta tener los voluntarios de estrés severos en la zona superior de la gráfica.

De esta forma, a través, del biomarcador melatonina, también se puede identificar el nivel de estrés, solamente midiendo el espectro Raman de una muestra de saliva y ubicando las intensidades de las bandas espectrales principales.

Después de aplicar el análisis de componentes principales, a los biomarcadores por separado y obtener una muy buena clasificación de los datos experimentales, para las sesiones 01 y 02 de las muestras de saliva.

Se consideró realizar el análisis de componentes principales de los dos biomarcadores juntos y solo separar para la sesión 01, es decir sin inducción de estrés, y para la sesión 02, es decir,

con inducción de estrés.

En esta segunda parte de la sesión, lo que se presenta, es la clasificación de 32 voluntarios, a través del análisis de las componentes principales, considerando todas las variables de ambos biomarcadores juntas, por cada sesión

6.8.3 Biomarcadores cortisol y melatonina

Tenemos un numero de 12 variables para analizar, las cuales son: las 7 bandas espectrales del cortisol (tabla 6.4), las 4 bandas espectrales de la melatonina (tabla 6.5) y el nivel de estrés por voluntario (tabla 6.6-columna3), es decir, tenemos 12 variables con 32 componentes cada una, por sesión.

Entonces se realizó el análisis de componentes principales, para las sesiones de muestras de saliva, es decir, para la sesión 01 sin inducción de estrés y para la sesión 02 con inducción de estrés.

Luego de organizado, todos los datos que se quieren analizar, se utilizó un código en el software Matlab (APÉNDICE A), para aplicar el análisis de componentes principales y obtener una gráfica con las nuevas componentes.

Con el cual se obtuvo la distribución de la figura 6.17, para la sesión 01

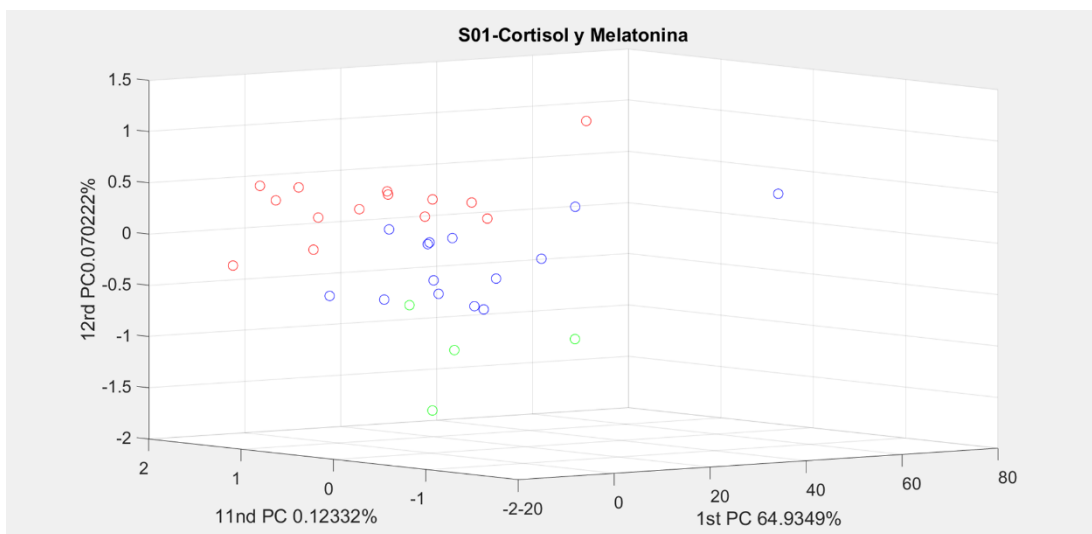


Figura 6.17 Muestra las componentes principales 1, 11, 12, de los 32 voluntarios.

Posterior se repite de análisis, pero para los datos de la sesión 02 y se obtuvo la distribución

de la figura 6.18

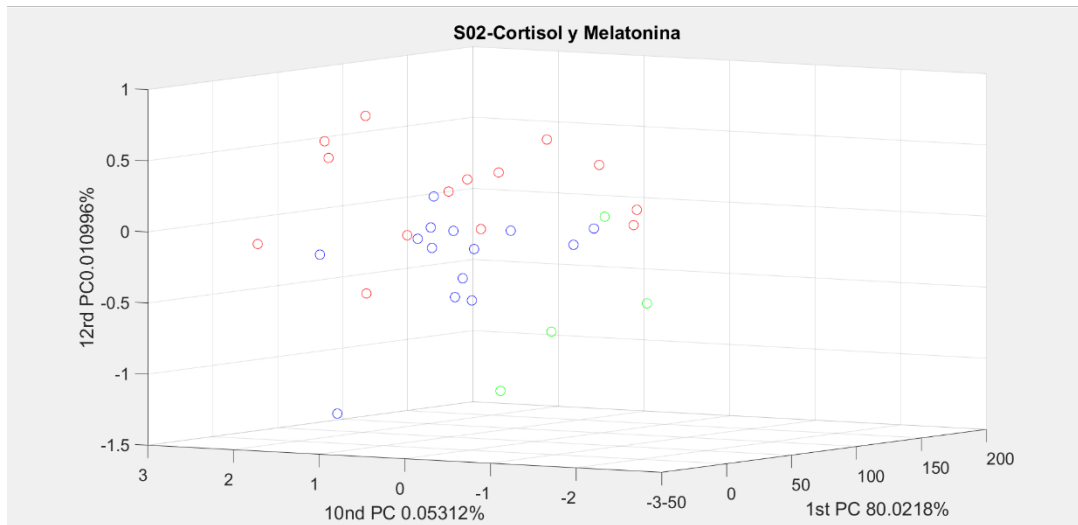


Figura 6.18 Muestra las componentes principales 1, 10 y 12, de los 32 voluntarios.

En esta sesión se realizó el análisis de componentes principales, con ambos biomarcadores (cortisol y melatonina), con la finalidad de tener la mayor información posible por voluntario y lograr obtener una clasificación satisfactoria.

En las figuras 6.17(sesión 1) y 6.18 (sesión 2), se observa, algunas características similares a las obtenidas anteriormente, considerando que en este caso de utilizaron 12 variables para cada sesión de muestra de saliva. Y se graficó toda esta información en tres componentes principales en cada caso, se utilizó graficas de 3D, para apreciar la distribución de los puntos de mejor manera.

Además de puede ver en ambas gráficas la presencia de los 32 voluntarios distribuidos en los tres grupos, cada uno representa un nivel de estrés, se puede ver que el nivel de estrés leve es verde, el moderado azul y el rojo severo.

La distribución de los puntos por grupo, mantienen en su mayoría el mismo comportamiento, es decir, donde la mayoría de los voluntarios del mismo nivel de estrés están ubicados en la misma zona de las gráficas.

Con lo cual se puede considerar, que, tomando el valor de las 12 bandas espectrales, de los biomarcadores cortisol y melatonina, en una muestra de saliva, se puede identificar el nivel de estrés que presenta el voluntario.

6.9 CONCLUSIÓN DEL CAPÍTULO

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que, con análisis de componentes principales, la correlación entre la información de los espectros Raman y la información del instrumento psicológico SISCO. Se realizó la aplicación de una técnica no invasiva y cuantitativa, con la cual, a través, de una muestra de saliva aproximada a 2 ml, se puede obtener el nivel de estrés de un paciente, debido a las firmas espectrales Raman de los biomarcadores cortisol y melatonina.

REFERENCIAS

- [6.1] Martínez y Germán Martín González JLG-S. Método gaussiano de suavización de datos experimentales [Internet]. 16 de diciembre de 2013 [citado el 4 de agosto de 2022]. Disponible en: <http://file:///C:/Users/58414/Downloads/Dialnet-MetodoGaussianoDeSuavizacionDeDatosExperimentales-4733347.pdf>
- [6.2] Moore TJ, Sharma B. Direct surface enhanced Raman spectroscopic detection of cortisol at physiological concentrations. *Anal Chem* [Internet]. 2020;92(2):2052–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04532>
- [6.3] Fleming GD, Koch R, Perez JM, Cabrera JL. Raman and SERS study of N-acetyl-5-methoxytryptamine, melatonin—The influence of the different molecular fragments on the SERS effect. *Vib Spectrosc* [Internet]. 2015;80:70–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2015.08.002>

CONCLUSIONES A LA TESIS

Seguidamente se presentan las conclusiones que dan solución a las preguntas de investigación propuestas en un inicio:

Si, se perciben bandas espectrales Raman en las muestras de saliva no estimulada de los voluntarios, para los biomarcadores salivales. Identificando 7 bandas espectrales Raman para el biomarcador cortisol y 4 bandas espectrales Raman para el biomarcador melatonina. Además, es posible identificar el nivel de estrés, a través de las intensidades presentes en las bandas espectrales Raman, de los biomarcadores salivales. Obteniendo del análisis, una sensibilidad: del 75% para el nivel de estrés leve, 86% para el nivel de estrés moderado, y 64% para el nivel de estrés severo. También se tiene una especificidad: del 96% para el nivel de estrés leve, 67% para el nivel de estrés moderado, y 94% para el nivel de estrés severo. De igual manera es posible clasificar los espectros Raman de la saliva no estimulada de los voluntarios, por el nivel de estrés, a través, del análisis de componentes principales, de las bandas espectrales Raman de los biomarcadores salivales. Se obtuvo del análisis una exactitud: del 94% para el nivel de estrés leve, 75% para el nivel de estrés moderado, y 81% para el nivel de estrés severo. Así mismo una precisión: del 75% para el nivel de estrés leve, 67% para el nivel de estrés moderado, y 90% para nivel de estrés severo. Por ultima una precisión general del análisis del 75%.

Entonces, se puede concluir que, con el empleo de la espectroscopía Raman en los biomarcadores cortisol y melatonina es posible identificar el estrés académico. Este estudio representa una herramienta complementaria en el área de la psicología, debido a que sería un método no invasivo y cuantitativo, que serviría para diagnosticar si el paciente tiene estrés académico y en qué nivel de estrés se encuentra.

TRABAJO FUTURO

Este proyecto corresponde a una primera propuesta para detectar a través de biomarcadores salivares, el estrés académico mediante el empleo de espectroscopía Raman, sin embargo, para darle más sustento a esta propuesta, es necesario el desarrollo de otras pruebas cuantitativas, para comparar los resultados experimentales, por lo que se postula en un futuro verificar las concentraciones de los biomarcadores, a través, del kit de reactivos químico ELISA. Además del empleo de redes neuronales para la identificación automática del nivel de estrés, mediante los espectros Raman. También se propone aumentar el número de voluntarios y de esta manera tener mayor cantidad de datos espectrales para el análisis estadístico.

APÉNDICE A

Códigos de los programas Matlab

En la figura 1, se observa el código que se utilizó para calcular todos coeficientes de correlación lineal de Pearson. En la figura 2, se observa el código que se aplicó para obtener el análisis de las componentes principales y las gráficas de la distribución de puntos.

```
close all
clear all
clc
load 'NOMBREDELDOCUMENTO.txt' %Cargar Documento
X = NOMBREDELDOCUMENTO(:,1); % Se le asigna la columna 1 la variable X
Y = NOMBREDELDOCUMENTO(:,2); % Se le asigna la columna 2 la variable Y
r = corr(X,Y,'Type','Pearson'); % Se calcula el coeficiente de correlacion y se asina a r
                                % Type = tipo de correlacion
                                %Pearson = correlacion lineal de Pearson
```

Figura 1: código para calcular el coeficiente de correlación de Pearson.

```
close all; clear all; clc

load 'NOMBRE_DEL_DOCUMENTO' %Cargar Datos
[coeff,score,latent~,explained] = pca(NOMBRE_DEL_DOCUMENTO)% Analisis de componentes principales
figure(1),gscatter(score(:,1),score(:,2),NOMBRE_DEL_DOCUMENTO(:,end),'gbr')% Genera la figura
xlabel(['1st PC ',num2str((explained(1))),'%']) % Nombre de los ejes
ylabel(['2nd PC ',num2str((explained(2))),'%'])
legend('Leve','Moderado','Severo') % Leyenda
title('NOMBRE_DEL_DOCUMENTO') % Titulo
set(gca,'FontSize',18) %variable por defecto y tamaño de la fuente
```

Figura 2: código para calcular el análisis de componentes principales.

```
close all; clear all; clc

load 'NOMBREDELDOCUMENTO.txt' %Cargar Datos
[coeff,score,latent~,explained] = pca(Pico_5_S02_Melatonina)
azulcolor=[0 0 1];
rojocolor=[1 0 0];
verdecolor=[0 1 0];
colors=[verdecolor;azulcolor;rojocolor];
markersize = 100;
figure(1),scatter3(score(:,1), score(:,4), score(:,5),markersize, colors(NOMBREDELDOCUMENTO(:,end),:))
xlabel(['1st PC ',num2str((explained(3))),'%'])
ylabel(['4nd PC ',num2str((explained(4))),'%'])
zlabel(['5rd PC',num2str((explained(5))),'%'])
title('S02-Cortisol y Melatonina')
set(gca,'FontSize',18)
```

Figura 3: código para calcular el análisis de componentes principales, 3D

APÉNDICE B

Anexo 1. Formato de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO		
		
Identificación de estrés a través del biomarcador salival cortisol mediante Espectroscopía Raman y su asociación con el inventario de estrés académico.		
<p>La presente investigación tiene como objetivo el detectar el estrés mediante espectroscopía de Raman saliva a través del empleo de los biomarcadores. Su participación será como voluntario para coleccionar muestra de saliva total</p> <p>La finalidad del estudio es hallar la huella espectral de estas muestras, la cual se obtendrá por espectroscopía Raman, permite "identificar" los componentes químicos constituyentes de este fluido. Los resultados que se obtengan con el uso del espectrómetro serán empleados para determinar si la espectroscopía Raman tiene la capacidad de identificar el estrés psico social mediante biomarcadores.</p> <p>Por otra parte, no existe riesgo alguno durante la toma de muestra salival y se protegerá en todo momento la confidencialidad de dicha información, mediante la proporción de datos anónimos o codificados a los investigadores y limitando el acceso al material de terceros.</p> <p>Además, se llevará a cabo un cuestionario denominado Inventario de estrés académico (SISCO), para asociarlo a lo que salga en la espectroscopía de Raman,</p>		
Yo, _____		
Nombre(s)	Apellido paterno	Apellido materno
<p>he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.</p>		
_____	_____	_____
Firma del participante		Fecha
_____	_____	_____
Testigo 1	Fecha	
_____	_____	_____
Testigo 2	Fecha	
<p>He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.</p>		
_____	_____	_____
Firma del investigador		Fecha

Anexo 2. Historia clínica.

Cada ítem debe responderse con una marca, como "sí" o "no". Si un individuo responde "sí", y debe registrar la gravedad de la afección. Por ejemplo: si una persona experimenta xerostomía (sequedad en la boca), la respuesta debería ser registrado en una escala de 10 puntos (0 = no seco a 10 = muy seco). Este cuestionario se categorizó en diferentes secciones de información a continuación, se presenta en forma tabulada:

Características demográficas e información personal	
Nombre:	
Sexo	
Edad	
País de nacimiento	

Historial médico y Hábito de tabaco y alcohol		
¿Tiene alguna enfermedad sistémica? (Énfasis en insuficiencia hepática o renal crónica)	Si	No
¿Toma medicamentos a diario?, Si está tomando medicamentos, ¿qué tipo de medicamentos / drogas está tomando?(Énfasis en medicamentos como Ketoconazol,corticoides)	Si	No
¿Alguna vez ha recibido radioterapia de cabeza o cuello?	Si	No
¿Alguna vez ha sufrido algún trastorno de glándula salival?	Si	No
¿Alguna vez ha sufrido de artritis o alguna otra enfermedad autoinmune?	Si	No
¿Tiene alguna alergia?	Si	No
¿Tiene diabetes?	Si	No
¿Fuma?	Si	No
¿Bebe alcohol u otras bebidas (p. Ej., bebidas carbonatadas)?	Si	No
¿Presenta rutina de sueño irregular?		
¿Está embarazada?		
¿Actualmente se encuentra cursando por algún problema de tipo personal, que le genere estrés?		
¿Cuándo fue la última vez que se desparasitó?		
¿Es hipertenso?		
¿Es hipotenso?		

Higiene oral		
¿Tiene una lesión (s) oral (p. Ej., Llega / úlcera)?	Si	No
¿Sientes una sensación de ardor en la boca?	Si	No
¿Tu boca se siente seca?	Si	No
¿Usas dentaduras postizas?	Si	No
¿Utiliza hilo dental a diario?	Si	No
¿Usas enjuague bucal a diario?	Si	No
OTROS		
¿Tu boca se siente seca cuando comes?	Si	No
¿Tienes problemas para dormir debido a la sequedad?	Si	No
¿Chupa dulces o masca chicle para aliviar la sequedad en la boca?	Si	No
¿Tu piel facial se siente seca?	Si	No
¿Tus ojos se sienten secos?	Si	No
¿Se siente seca la parte interna de la nariz?	Si	No
¿Tu garganta se siente seca?	Si	No

Anexo 3. Cuestionario de estrés académico (SISCO)


INVENTARIO SISCO DE ESTRÉS					
Preguntas	Opciones				
¿Has tenido momentos de preocupación o nerviosismo?	Si			No	
La competencia con los compañeros de grupo:	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Sobrecarga de tareas y trabajos escolares:	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Trastornos en el sueño (insomnio, pesadilla):	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Fatiga crónica (cansancio permanente):	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Problemas de concentración:	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Desgano para realizar las labores escolares:	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre
Ventilación y confidencial (verbalización de la situación que te preocupa):	1 es nunca	2 rara vez	3 es algunas veces	4 casi siempre	5 siempre

APÉNDICE C

En la figura 1, 2, 3, con capturas de pantalla de la interfaz de Google, donde los voluntarios llenaron su test, el instrumento psicológico SISCO.

EL INVENTARIO SISCO DE ESTRÉS ACADÉMICO 2022

El formulario es auto administrado su resolución no implica más de 10 minutos.
Se está realizando un proyecto de investigación, cuyo objetivo es determinar el estrés académico en estudiantes, a través del Inventario SISCO de estrés académico.

bruzurebe@gmail.com [Cambiar de cuenta](#) 

***Obligatorio**

Correo *

Tu dirección de correo electrónico

[Siguiete](#) [Borrar formulario](#)

Nunca envíes contraseñas a través de Formularios de Google.

Este contenido no ha sido creado ni aprobado por Google. [Notificar uso inadecuado](#) - [Términos del Servicio](#) - [Política de Privacidad](#)

Google Formularios

Figura 1: Página de inicio del formulario.

Carta de consentimiento informado

Se está realizando un proyecto de investigación, cuyo objetivo es determinar el estrés académico en estudiantes de estomatología

Procedimientos:

Al participar en el estudio ocurrirá lo siguiente:

-Contestará un cuestionario referente al estrés académico.

Confidencialidad: Toda la información que usted nos proporcione para el estudio es de carácter

estrictamente confidencial y será utilizada para la investigación exclusivamente.

Usted quedará identificado(a) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán

publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que los participantes no podrán ser identificado(a)s.

Riesgos Potenciales: Ninguno

Confirme que ha leído y entendido el consentimiento informado, y desea participar. *

Sí

No

[Atrás](#)

[Siguiete](#)

[Borrar formulario](#)

Figura 2: Página del consentimiento informado del formulario.

Durante el transcurso de este semestre:

De acuerdo al Inventario de estrés académico (SISCO) si en este semestre has experimentado las siguientes preguntas.

¿Has tenido momentos de preocupación o nerviosismo? *

- Sí
- No

En una escala del 1 al 5 donde: 1 es nunca, 2 rara vez, 3 es algunas veces, 4 casi siempre y 5 siempre, señala con que frecuencia. TE INQUIETARON LAS SIGUIENTES SITUACIONES:

La competencia con los compañeros de grupo: *

- Nunca (1)
- Rara Vez (2)
- Algunas Veces (3)
- Casi siempre (4)
- Siempre (5)

Figura 3: Página de algunas de las preguntas del formulario.

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSeCDganWPvvdMHhltTJWB_Wslv_V92lYg0V7o_bOie4WY_Uyg/viewform