



**I  
N  
A  
O  
E**

# **Obtención de espectros de la piel mediante espectroscopía Raman**

Por

**Ing. Adrián Eugenio Villanueva Luna**

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.

Supervisada por:

**Dr. Sergio Vázquez y Montiel**

**Dr. Jorge Castro Ramos**

©INAOE 2009

Derechos Reservados

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





# RESUMEN

El estudio de la piel mediante espectroscopía Raman es una de las innovaciones en las últimas décadas. Esta técnica de diagnóstico tiene pocos años que se utiliza en el área de la medicina, para la detección de cáncer de piel, de pulmón y detección de aterosclerosis, entre otras enfermedades.

En esta tesis se describe un método de procesamiento de datos utilizando wavelets biortogonales y symlets. Este método se usa para la eliminación del ruido y la fluorescencia de fondo presentes en espectros Raman. La eliminación de la fluorescencia se obtiene mediante la descomposición del espectro usando wavelets biortogonales. Además se eliminan las componentes de alta frecuencia para eliminar el ruido residual y las de baja frecuencia para eliminar la fluorescencia. Con esto se obtiene un espectro Raman libre de ruido y fluorescencia. En este trabajo se obtienen espectros de algunos fármacos, líquidos, carne de pollo, cerdo y de la piel humana. Las líneas espectrales obtenidas en los espectros se analizaron e identificaron con la literatura y han sido asignadas.

# DEDICATORIA

A mis padres **Rosa y Nicolás**

Por brindarme la oportunidad de estudiar aquí y darme todo su apoyo.

A mis hermanos **María del Carmen, Armando, Martha Edith, Verónica y Aracely Guadalupe**. Por todo su apoyo en momentos difíciles.

A **Esmeralda** por su amor, cariño, comprensión y por ser la inspiración en mi vida.

# AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le agradezco al Dr. Aarón Flores Gil, por haber sido mi motivador e inculcador de venir hacer el posgrado en esta institución. A mi asesor Dr. Jorge Castro Ramos con el cual pasé mucho tiempo en el laboratorio discutiendo y tratando de discernir cuando teníamos una línea espectral o simplemente ruido. Y a sus valiosas discusiones que sirvieron para llevar acabo este trabajo. Y por sus importantes aportaciones, que me hacían reflexionar sobre los resultados obtenidos. A mi otro asesor el Dr. Sergio Vázquez y Montiel, por su valiosa apoyo y colaboración en el desarrollo de esta tesis. A Eber Orozco, por su valioso entusiasmo y sus consejos en el desarrollo de esta tesis. A mis colegas y amigos, Carlos Ortiz, Daniel Sánchez, Gabriel Aguilar, Juan Pablo Padilla por sus consejos y valiosas críticas sobre este trabajo. A mis compañeros de generación Miguel, Javier, Lupita, Anel y Noemí. A las secretarias Patty, Eicela y Aurora por su carácter tan amable y la disposición de apoyarme en todos los detalles de la Coordinación de Óptica. Un agradecimiento muy especial a Liliana Perea, por haberme ayudado y enviado los artículos que necesitaba para hacer este trabajo. Al FUNDEC por haber brindado su apoyo económico. Karla Hernández por todo su apoyo en los trámites que tuve que hacer. Al CONACYT por haberme dado su apoyo económico a lo largo de toda la maestría. Al INAOE por el acceso a sus laboratorios. A mis sinodales, Gonzalo Urcid Serrano y Agustín Santiago Alvarado por sus valiosas correcciones y sugerencias para la mejor estructura de este trabajo.

## Tabla de contenido

RESUMEN.....	III
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
CAPÍTULO 1: <i>INTRODUCCIÓN</i> .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
Bibliografía .....	6
CAPÍTULO 2: <i>LA PIEL HUMANA</i> .....	9
2. LA PIEL HUMANA .....	10
2.1 Definición.....	10
2.2 Estructura general histológica .....	11
2.2.1 Epidermis.....	12
2.2.2 Dermis .....	15
2.2.3 Tejido subcutáneo .....	16
2.3 Aminoácidos .....	16
2.4 Proteínas .....	19
2.5 Lípidos.....	20
2.6 Carbohidratos .....	20
Conclusiones .....	20
Bibliografía .....	21
CAPÍTULO 3: <i>ESPECTROSCOPIA RAMAN</i> .....	23
3. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	24
3.1 Introducción .....	24
3.2 Definición.....	24
3.3 Descripción del efecto Raman.....	25
3.4 Ruidos en espectroscopía Raman .....	30
3.4.1 Ruido de disparo (Shot noise) .....	30
3.4.2 Ruido generado por la muestra.....	32
3.4.3 Ruido generado por la instrumentación .....	33
3.4.4 Ruido computacional .....	33
3.4.5 Ruido generado por fuentes externas.....	33

Conclusiones .....	37
Bibliografía .....	38
CAPÍTULO 4: <i>WAVELETS</i> .....	40
4. WAVELETS .....	41
4.1 Introducción .....	41
4.2 Wavelets.....	43
4.2.1 Wavelets discretas .....	46
4.2.2 Wavelets symlets.....	49
4.2.3 Wavelets biortogonales .....	50
Bibliografía .....	54
CAPÍTULO 5: <i>ARREGLO EXPERIMENTAL</i> .....	56
5. ARREGLO EXPERIMENTAL .....	57
5.1 Espectrómetro QE65000 .....	57
5.2.1 Componentes del espectrómetro QE65000.....	58
5.3 Punta de prueba Raman RIP-RPB.....	60
5.3.1 Fondo de la fibra .....	60
5.3.2 Diseño con filtraje eficiente .....	61
5.4 Láser 785 nm.....	63
5.5 Arreglo experimental.....	63
Conclusiones .....	65
Bibliografía .....	65
CAPÍTULO 6: RESULTADOS .....	66
6. RESULTADOS .....	67
6.1 Método de procesamiento .....	67
6.1 Experimentos con Fármacos .....	73
6.1.1 Aspirina.....	74
6.1.2 Albendazol.....	75
6.1.3 Paracetamol .....	75
6.1.4 Ranitidina .....	76
6.1.5 Dyiodo .....	77
6.2 Experimentos con Líquidos.....	78
6.2.1 Colágeno.....	78

6.2.2	Acetona .....	79
6.2.3	Alcohol 96.....	80
6.2.4	Alcohol Isopropílico.....	81
6.2.5	Glucosa .....	82
6.2.6	Alcohol y Acetona.....	84
6.2.7	Alcohol, glucosa, acetona.....	85
6.2.8	Alcohol y colágeno .....	86
6.2.9	Acetona y Colágeno.....	87
6.2.10	Lipofundin .....	87
6.3	Experimento con carne de cerdo y pollo.....	88
6.3.1	Piel de pollo.....	89
6.3.2	Piel de cerdo.....	90
6.3.3	Grasa de corazón de pollo.....	91
6.3.4	Corazón de pollo .....	91
6.3.5	Grasa de cerdo .....	92
6.3.6	Grasa de pollo .....	93
6.3.7	Hueso res.....	94
6.3.8	Hueso pollo.....	95
6.4	Experimentos con Piel.....	96
6.4.1	Dedo pulgar .....	98
6.4.2	Dedo medio.....	99
6.4.3	Dedo anular.....	99
6.4.4	Dedo índice.....	100
6.4.5	Dedo meñique.....	101
6.4.6	Palma de la mano.....	102
6.4.7	Dorso de la mano .....	103
6.4.8	Antebrazo.....	104
6.4.9	Muñeca de la mano.....	105
	Conclusiones .....	105
	Bibliografía .....	106
	<i>CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES</i> .....	109
	CONCLUSIONES .....	110



TRABAJOS A FUTURO.....	111
APÉNDICE .....	113
APÉNDICE A: CODIGO DEL PROCESAMIENTO DE DATOS .....	114
Publicaciones obtenidas de este trabajo .....	117

## Lista de figuras

2.1 Capas de la piel .....	12
2.2 Capas de la epidermis.....	13
3.1 Diagrama de Jablonski .....	27
3.2 Espectro Raman del sulfuro, mostrando los cambios Stokes y antistokes .....	29
3.3 Tipos de ruidos.....	36
4.1 Espectro wavelet resultante de escalar la wavelet madre en el dominio del tiempo .....	45
4.2 Wavelet Symlet 6 .....	50
4.3 Wavelet biortogonal, descompuesta y reconstruida .....	52
4.4 Wavelet biortogonal 6.8, descompuesta y reconstruida .....	53
5.1 Componentes del QE65000.....	58
5.2 Diagrama de la punta de prueba.....	62
5.3 Arreglo experimental.....	64
5.4 Arreglo experimental en el laboratorio .....	65
6.1 Diagrama a bloques del programa de procesamiento.....	70
6.2 Diferentes etapas de procesamiento del espectro Raman. a) datos sin procesar, b) señal sin ruido, c) usando las wavelets biortogonales .....	71
6.3 Detalles y espectro Raman. ....	72
6.4 Detalles y espectro Raman. En esta figura se eliminan las componentes de alta y baja frecuencia solo dejando las componentes centrales.....	73
6.5 Espectro Raman de la aspirina .....	74
6.6 Espectro Raman del albandazol .....	75
6.7 Espectro Raman del paracetamol .....	76
6.8 Espectro Raman de la ranitidina.....	77
6.9 Espectro Raman del diyodo.....	78
6.10 Espectro Raman del colágeno .....	79
6.11 Espectro Raman de la acetona.....	80
6.12 Espectro Raman del Alcohol 96.....	81
6.13 Espectro Raman del alcohol isopropílico.....	82
6.14 Espectro Raman de la glucosa.....	83
6.15 Espectro Raman de alcohol y acetona.....	84
6.16 Espectro Raman del alcohol, glucosa y acetona.....	85
6.17 Espectro Raman del alcohol y colágeno.....	86

6.18 Espectro Raman de la acetona y colágeno .....	87
6.19 Espectro Raman del lipofundin .....	88
6.20 Espectro Raman de la piel de pollo .....	89
6.21 Espectro Raman de la piel de cerdo .....	90
6.22 Espectro Raman de la grasa de corazón de pollo .....	91
6.23 Espectro Raman del corazón de pollo .....	92
6.24 Espectro Raman de la grasa de cerdo.....	93
6.25 Espectro Raman de la grasa de pollo.....	94
6.26 Espectro Raman del hueso de res .....	95
6.27 Espectro Raman del hueso de pollo .....	96
6.28 Arreglo experimental utilizado para los experimentos con piel .....	97
6.29 Arreglo experimental de la piel hecho en el laboratorio .....	97
6.30 Espectro Raman del dedo pulgar.....	98
6.31 Espectro Raman del dedo medio .....	99
6.32 Espectro Raman del dedo anular .....	100
6.33 Espectro Raman del dedo índice .....	101
6.34 Espectro Raman del dedo meñique .....	102
6.35 Espectro Raman de la palma de la mano.....	103
6.36 Espectro Raman del dorso de la mano .....	103
6.37 Espectro Raman del antebrazo .....	104
6.38 Espectro Raman de la muñeca de la mano .....	105

### Lista de tablas

Tabla 1 Líneas espectrales del colágeno .....	79
Tabla 2 Líneas espectrales de la acetona.....	80
Tabla 3 Líneas espectrales del alcohol 96.....	81
Tabla 4 Líneas espectrales del alcohol isopropílico.....	82
Tabla 5 Líneas espectrales de la glucosa.....	83
Tabla 6 Líneas espectrales del alcohol y acetona.....	85
Tabla 7 Líneas espectrales del alcohol, glucosa y acetona.....	86
Tabla 8 Líneas espectrales del alcohol y colágeno.....	86
Tabla 9 Líneas espectrales de la acetona y colágeno .....	87
Tabla 10 Líneas espectrales del lipofundin .....	88
Tabla 11 Líneas espectrales de la piel de pollo .....	89
Tabla 12 Líneas espectrales de la piel de cerdo .....	90
Tabla 13 Líneas espectrales de la grasa de corazón de pollo .....	91
Tabla 14 Líneas espectrales del corazón de pollo .....	92
Tabla 15 Líneas espectrales de la grasa de cerdo.....	93
Tabla 16 Líneas espectrales de la grasa de pollo.....	94
Tabla 17 Líneas espectrales del hueso de res .....	95
Tabla 18 Líneas espectrales del hueso de pollo .....	96
Tabla 19 Líneas espectrales del dedo pulgar.....	98
Tabla 20 Líneas espectrales del dedo medio.....	99

Tabla 21 Líneas espectrales del dedo anular .....	100
Tabla 22 Líneas espectrales del dedo índice .....	101
Tabla 23 Líneas espectrales del dedo meñique .....	102
Tabla 24 Líneas espectrales de la palma de la mano.....	103
Tabla 25 Líneas espectrales del dorso de la mano .....	104
Tabla 26 Líneas espectrales del antebrazo .....	104
Tabla 27 Líneas espectrales de la muñeca de la mano .....	105

A decorative graphic of a scroll with a light gray border and rounded corners. The scroll is partially unrolled at the top and bottom edges, with the unrolled parts shaded in a light gray color. The text is centered within the scroll.

# **CAPÍTULO 1:** ***INTRODUCCIÓN***

# 1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopía es una herramienta muy poderosa, con la cual se puede obtener información acerca de las moléculas, además proporciona la huella digital de la muestra a estudiar. Como Paul Carey ha dicho: la espectroscopía Raman en Bioquímica, “es el gigante dormido que despierta” [1]. Cuando las moléculas se excitan con longitudes de onda dentro del espectro visible se obtiene la fluorescencia de los componentes naturales ocultando completamente el espectro Raman. Esto se debe al hecho de que el rendimiento cuántico de la fluorescencia es del orden de 1 y el rendimiento cuántico de la espectroscopía Raman es alrededor de 6-10 órdenes de magnitud más pequeña. Se han investigado sistemáticamente los espectros Raman de células y tejidos a fin de saber si la espectroscopía Raman puede ayudar en un diagnóstico médico. La Espectroscopía Raman proporciona la metodología para el análisis *in situ* de una variedad de materiales incluyendo las lentes biomédicas [2], córnea [3], piedras biológicas [4], tejidos duros [5], tracto ginecológico [6], pared arterial [7], de mama [6], de colon [8], la vejiga [7] y los tejidos del cerebro [8]. La excitación en el visible de los tejidos biológicos es de intensa fluorescencia que interfiere con el espectro Raman. Para evitar esos problemas, se emplean excitaciones UV-IR. La espectroscopía Raman en el infrarrojo cercano ha sido ampliamente utilizada debido a los recientes avances en los detectores CCD, espectrógrafos de alto rendimiento, diodo láser, filtros holográficos y filtros Raman de borde, todo optimizado para su uso en la región IR-cercano.

La señal Raman es generalmente débil, debido a la luz láser de baja intensidad de excitación que se emplea con el fin de evitar el daño en los tejidos. La emisión de fluorescencia interfiere con la débil señal Raman. Los efectos de la fluorescencia se pueden

eliminar por medio de la excitación con infrarrojo cercano, como la proporcionada por un láser Nd: YAG o mediante el uso de procesos de enfriamiento [9]. También utilizando enfoques de tratamiento de datos numéricos para la reducción de la relación señal-ruido, tales como las que emplea el método de máxima entropía [10, 11]. Alternativamente, Hasegawa ha propuesto la utilización de un proceso de señal numérica, el análisis de componentes principales (PCA), para separar el espectro Raman de la fluorescencia de fondo [12, 13]. Barclay demostró que se puede comprimir el espectro usando herramientas matemáticas como lo son las transformadas wavelets discretas con la mayoría de los resultados predecibles y con la mínima distorsión de la señal al eliminar el ruido [14]. Schulze ha reportado de un catálogo exhaustivo los datos numéricos de transformación de fondo para eliminar las señales de los espectros de Raman [15]. Entre los diversos procesos de filtrado numérico, el método de la transformada Wavelet ha sido propuesta para suprimir el ruido no correlacionado [16] y el fondo de fluorescencia [17] de las señales en el espectro Raman. Ehrentreich propone la descomposición de las wavelets y su utilización para eliminar el ruido y resaltar los picos principales [18]. Las familias Daubechies, Coiflet and Symmlet fueron evaluadas por Ramos [19] para eliminar el ruido de disparo. Mahadevan-Jansen ha propuesto un método automatizado para restar fluorescencia, sobre la base de una modificación de los mínimos cuadrados y su ajuste de curvas Lorentzianas [20]. Cao propone un método polinómico adaptivo, con el cual se determinan los parámetros principales del espectro [21]. Camerlingo propuso un método para extraer la señal de fluorescencia de fondo utilizando wavelets biortogonales [22].

El interés para desarrollar este trabajo se debe a que la espectroscopía Raman es una técnica novedosa, la cual se puede aplicar al diagnóstico médico. Otra de las razones es que en el

INAOE no se cuenta con una base de espectros Raman de diferentes compuestos ya sean líquidos o fármacos. Como en el instituto se desea desarrollar el área de óptica los espectros Raman en la piel no han sido explorados. Otra de las razones por lo que es necesario tener esta base es que existen diferentes técnicas para procesar los datos, todas estas técnicas varían dependiendo del tipo de muestra. Y al contar con ella se puede comparar las mediciones que se realicen en el futuro.

Debido a lo anteriormente mencionado los objetivos de este trabajo son:

1. Proponer un arreglo experimental para obtener fácilmente los espectros Raman.
2. Obtener espectros de la piel humana por medio de espectroscopía Raman, con tiempos de integración controlados y potencia regulada para evitar el daño en el tejido.
3. Proponer un método de procesamiento de datos para obtener espectros sin ruidos y sin fluorescencia de fondo que no alteren la información.
4. Obtener espectros Raman de diferentes compuestos, tales como los fármacos, líquidos, carnes de pollo y cerdo y comparar con los reportados en la literatura.

En el capítulo 2 se describen la piel y la estructura de sus capas internas, además de información sobre aminoácidos, proteínas y lípidos. En el capítulo 3 se define la espectroscopía Raman, la descripción del efecto en que se basa, y los diferentes ruidos que se presentan cuando se obtienen los espectros. En el capítulo 4 se presentan los conceptos necesarios para entender las wavelets, y se definen las wavelets symlets y las biortogonales. En el capítulo 5 se describen las diferentes componentes que tiene el arreglo experimental, tal como el espectrómetro, la punta de prueba y el láser. En la última parte se describe el

montaje experimental que se utilizó para tomar los espectros presentados en este trabajo. En el capítulo 6 se describen el método de procesamiento desarrollado para eliminar el ruido de disparo y el ocasionado por la fluorescencia. Además se muestran los resultados obtenidos y los diferentes experimentos realizados antes de obtener espectros en la piel humana. También se proporcionan los tiempos de integración, la potencia utilizada y algunas asignaciones de las líneas principales obtenidas en estos espectros Raman que se describen. Finalmente se dan las conclusiones generales de ésta tesis.



## Bibliografía

1. P. Carey, Paper 365, FACSS Conference Austin, (1998).
2. N.T. Yu, D.C. De Nagel, P.L. Pruett and J.F.R. Kuck, Jr., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (1985) 7965.
3. K. Larsson and L. Hellgren, Experientia, 30 (1974) 481.
4. H. Ishida, R. Kamoto, S. Uchida, A. Ishitani, Y. Ozaki, K. Iriyama, T. Tsukie, K. Shibata, F. Ishihara and H. Kameda, Appl. Spectrosc., 41 (1987) 407.
5. M.J. Barnes, Collagen Relat. Res., 5 (1985) 65.
6. R.R. Alfano, C.H. Liu, W.L. Sha, H.R. Zhu, D.L. Akins, J. Cleary, R. Prudente and E. Cellmer, Lasers Life Sci., 4 (1991) 23.
7. M.A. Walters, Y.C. Leung, N.C. Blumenthal, R.Z. Le Geros and K.A. Konsker, J. Inorg. Biochem., 39 (1990) 193.
8. M.S. Feld, R. Manoharan, J. Salenius, J. Orenstein- Carndona, T.J. Romer, J.F. Brennan III, R.R. Dasari and Y. Wang, SPIE Proc., 2388 (1995) 99.
9. W. Ke and J. Wu, *Comparison of several methods of fluorescence quenching in protein molecules*, Spectrochim.Acta A 51 L25. 1995.
10. L. Greek, L. Shane, H. G. Schulze, M. W. Blades, A. V. Bree, B. B. Gorzalka and R. F. B. Turner, *SNR enhancement and deconvolution of Raman spectra using a two-point entropy regularization*, Appl. Spectrosc. 49 425, 1995.
11. C. Craggs, K. P. Galloway and D J. Gardiner, *Maximum entropy methods applied to simulated and observed Raman spectra*, Appl. Spectrosc. 50 43, 1996.

12. K. Venkatakrishna, J. Kurien, K. M. Pai, M. Valiathan, N. N. Kumar, C. M. Krishna, G. Ullas and V. B. Kartha, *Optical pathology of oral tissue: a Raman spectroscopy diagnostic method*, Curr. Sci. 80 665. 2001.
13. T. Hasegawa, J. Nishijo and J. Umemura, *Separation of Raman spectra from fluorescence emission by principal component analysis*, Chem. Phys. Lett. 317 642. 2000.
14. V. J. Barclay, R. F. Bonner, and I. P. Hamilton, *Application of Wavelet Transforms to Experimental Spectra: Smoothing, Denoising, and Data Set Compression*, Anal. Chem., 1997, 69 (1), 78-90
15. G. Schulze, A. Jirasek, M. M. L. Yu, A. Lim, R. F. B. Turner and M. W. Blades, *Investigation of selected baseline removal techniques as candidates for automated implementation*, Appl. Spectrosc. 56 545, 2005.
16. W. Cai, L. Wang, Z. Pan, J. Zuo, C. Xu and X. Shao, *Application of the wavelet transform method in quantitative analysis of Raman spectra*, J. Raman Spectrosc. 32 207, 2001.
17. T. T. Cai, D. Zhang and D. Ben-Amotz, *Enhanced chemical classification of Raman images using multiresolution wavelet transformation*, Appl. Spectrosc. 55 1124, 2001.
18. F. Ehrentreich and L. Summchen, *Spike Removal and Denoising of Raman Spectra by Wavelet Transform Methods*, Anal. Chem. 2001, 73, 4364-4373.
19. Pablo Manuel Ramos and Itziar Ruisánchez, *Noise and background removal in Raman spectra of ancient pigments using wavelet transform*, J. Raman Spectrosc. 2005; 36: 848–856.

20. C.A Lieber, A. Mahadevan-Jansen, "Automated method for subtraction of fluorescence from biological Raman spectra", *Applied spectroscopy*, vol.7 num. 11, 2003.
21. Alex Cao, Abhilash K. Pandya, Gulay K. Serhatkulu, Rachel E. Weber, Houbei Dai, Jagdish S. Thakur, Vaman M. Naik, Ratna Naik, Gregory W. Auner, Raja Rabah and D. Carl Freeman, *A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence*, *J. Raman Spectrosc.* 2007; 38: 1199–1205.
22. C. Camerlingo, F. Zenone,.; G.M. Gaeta.; R. Riccio.; M. Lepore, *Wavelet data processing of micro-Raman spectra of biological samples*, *Meas. Sci. Technol.* 2006, 17, 298-303.



**CAPÍTULO 2: *LA  
PIEL HUMANA***

## 2. LA PIEL HUMANA

La piel humana es uno de los objetivos bajo estudio en esta tesis, debido a que se tomarán espectros en diferentes partes de ella, tales como: los dedos, palma y el antebrazo. Por tal motivo es importante dar una breve descripción de ella. En este capítulo se describen las diferentes capas que conforman la piel, en la primera sección se da una definición de la piel humana. En la sección dos se describen las diferentes capas que la conforman y su función principal, en la sección tres se definen los aminoácidos, proteínas, lípidos y carbohidratos.

### 2.1 Definición

La **piel** es el mayor órgano del cuerpo humano. Ocupa aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, y su espesor varía entre los 0.5 mm (en los párpados) a los 4 mm (en el talón). Su peso aproximado es de 5 kg. Actúa como barrera protectora que aísla al organismo del medio que lo rodea, protegiéndolo y contribuyendo a mantener íntegras sus estructuras, al tiempo que actúa como sistema de comunicación con el entorno, y éste varía en cada especie [1].

Las tres capas principales desde la superficie a la profundidad, son:

- a) la epidermis,
- b) la dermis y
- c) la hipodermis

De la piel dependen ciertas estructuras llamados anexos cutáneos que son los vellos, las uñas, las glándulas sebáceas y las sudoríparas.

En la piel del ser humano, sobretodo la del varón se produce más secreción sebácea que la que tiene la mujer. Esto es debido a la mayor cantidad de andrógenos (hormona sexual masculina) que produce el varón. Como consecuencia, la piel masculina es más gruesa, y grasa que la femenina [1].

## 2.2 Estructura general histológica

La piel está compuesta de:

- **Corpúsculos de Meissner** (*Georg Meissner*): Presentes en el tacto de piel sin vellos, palmas, plantas, yema de los dedos, labios, punta de la lengua [2].
- **Corpúsculos de Krause**: que proporcionan la sensación de frío.
- **Corpúsculos de Paccini**: que dan la sensación de presión.
- **Corpúsculos de Ruffini**: que registran el calor.
- **Corpúsculos de Merkel**: que registran al tacto superficial.

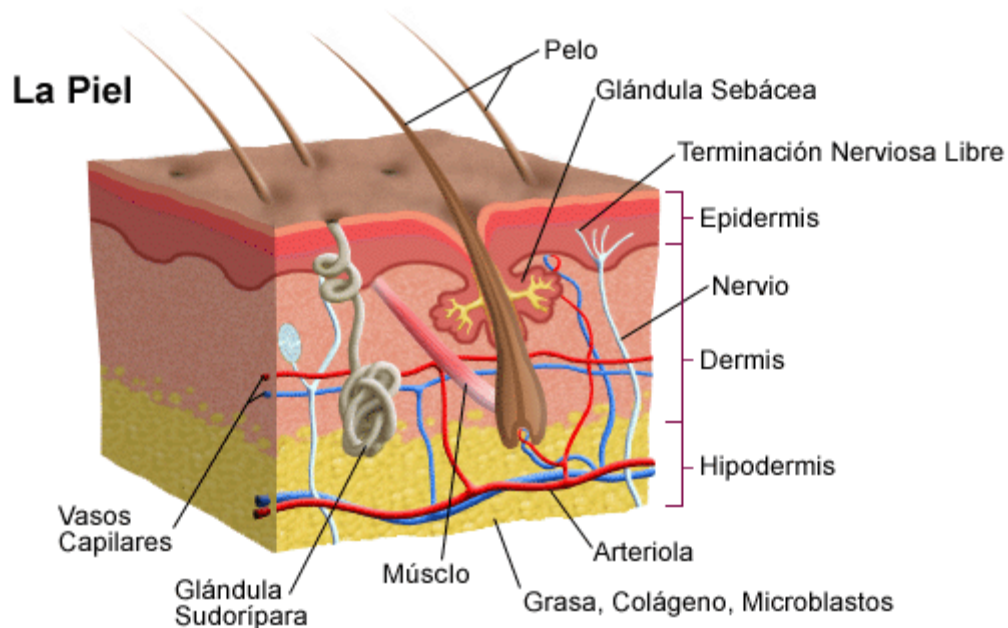
Existen dos tipos de piel:

- **Piel blanda**: la piel blanda es aquella que se encuentra principalmente en los párpados y las zonas genitales.
- **Piel gruesa**: la piel gruesa se localiza en la piel labial, plantar y palmar, además ésta se caracteriza por tener un estrato corneo muy desarrollado, a comparación del resto de la piel.

Mientras que en corrientes médicas, como la histoanatomía y dermatología se estudia en 3 estratos:

- Epidermis.
- Dermis.
- Tejido subcutáneo

Cada una de las capas tiene funciones y componentes diferentes que se interrelacionan.

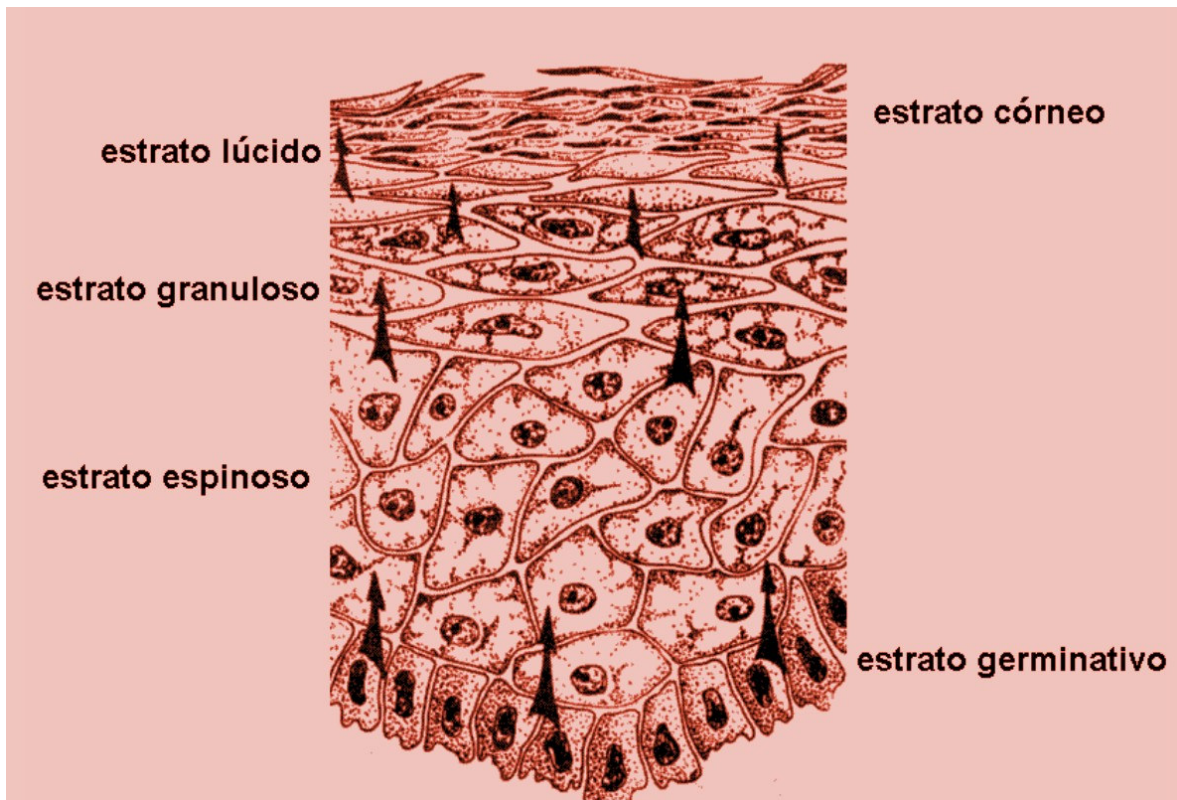


### 2.1 Capas de la piel

#### 2.2.1 Epidermis

La epidermis se compone en su mayoría por queratinocitos, que se encuentran segmentados en el estrato corneo, además de un factor importante que son los melanocitos o también llamados como los pigmentocitos, que dan la pigmentación a la piel y que se encuentran justamente sobre el estrato germinativo. En la piel se pueden apreciar bajo cortes histológicos células de Langerhans y linfocitos, que se encargan de dar protección inmunológica, además de hallar a los mecanorreceptocitos o células de Merckel [3].

La epidermis también contiene melanocitos que producen melanina (el pigmento de la piel). Algunos la dividen en 5 partes. En la figura 2.2 se muestran las diferentes capas de la epidermis [1]:



## 2.2 Capas de la epidermis

- **Estrato germinativo** se compone de una capa de células cilíndricas bajas u ovals, su citosol demuestra la presencia de tonofibrillas, además que las células de dicho estrato se relaciona por la unión desmosómica, además de anclarse a la membrana basal por uniones hemidesmosómicas.
- **Estrato espinoso** se conforma por células con forma poligonal, los núcleos son redondos y el citosol es de características basofílicas. Tiene un mayor contenido de tonofibrillas que las del estrato germinativo. Las prolongaciones del citosol



se asemejan a espinas, por lo que también reciben células espinosas, justamente porque las tonofibrillas son más numerosas en dichas prolongaciones dando la forma de espinas.

- **Estrato granuloso** se compone de 3 a 5 capas de células aplanadas, el citosol contiene gránulos basófilos denominados gránulos de queratohialina. La queratohialina es una sustancia precursora de la queratina. Cuando los queratinocitos llegan a la última capa de este estrato las células epidérmicas mueren y al morir vierten su contenido al espacio interceular.
- **Estrato lúcido** se distingue por tener una zona muy delgada de características eosinófilas. Los núcleos comienzan a degenerar en las células externas del estrato granuloso y desaparecen en el estrato lúcido.
- **Estrato córneo** de células planas queratinizadas anucleadas, también llamadas células córneas. Esta capa se distingue como la más gruesa y eosinófila. El estrato córneo está formado por hileras aplanadas y muertas que son los corneocitos. Los corneocitos están compuestos mayormente por queratina. Todos los días se eliminan capas de corneocitos.
- **Estrato disyunto** es la continua descamación de las células córneas.

Las células que migran desde el estrato germinativo tardan en descamarse alrededor de 4 semanas. Esto depende de la raza y género, así como también de la especie cuando se estudia en animales.

### 2.2.2 Dermis

La dermis es una capa profunda de tejido conjuntivo en la cual se tienen la peculiaridad de la abundancia de las fibras de colágeno y elásticas que se disponen de forma paralela y que le dan a la piel la consistencia y elasticidad característica del órgano. Histológicamente se divide en 2 capas [3]:

- **Estrato papilar:** compuesto por tejido conectivo laxo, fibras de colágeno tipo III, y asas capilares.
- **Estrato reticular:** compuesto por tejido conectivo denso, fibras de colágeno tipo I, fibras elásticas, en donde se encuentran microscópicamente mastocitos, reticulocitos y macrófagos. En su porción inferior se observa una capa de músculo liso que conforma al músculo piloerector. En la piel facial existe musculatura de tipo estriado en donde hay fijación de los músculos de la mímica en la dermis.

En la dermis se hallan los siguientes componentes[5]:

- Folículo piloso.
- Músculo piloerector.
- Terminaciones nerviosas aferentes (que llevan información).
- Glándulas sebáceas.
- Vasos sanguíneos y linfáticos.

La dermis es 20-30 veces más gruesa que la epidermis. En ella se encuentran los anexos cutáneos, que son de dos tipos: córneos (vellos y uñas) glandulares (glándulas sebáceas y sudoríparas).

### 2.2.3 Tejido subcutáneo

Es un estrato de la piel que está compuesto de tejido conjuntivo laxo y adiposo, lo cual le da funciones a la piel de regulación térmica y de movimiento a través del cuerpo como el que se ve cuando estiramos la piel de nuestro antebrazo hacia arriba, si no tuviera estos tipos de tejidos sería imposible moverla [3].

Los componentes propios que integran al tejido subcutáneo son:

- Ligamentos cutáneos.
- Nervios cutáneos.
- Grasa.
- Vasos sanguíneos y linfáticos.

En este trabajo se ocuparon piel de pollo y cerdo para las pruebas iniciales, antes de obtener espectros Raman en la piel humana. La piel de cerdo se encuentra todo el tiempo expuesta al sol, por lo cual se puede predecir que los espectros que se obtengan serán de forma complicada. En cambio para la piel de pollo serán menos complicados porque solo unas partes del cuerpo del pollo son expuestas al sol. La mayoría de su cuerpo está cubierto por las plumas y esto evita el contacto con la radiación solar.

### 2.3 Aminoácidos

Un **aminoácido**, como su nombre indica, es una molécula orgánica con un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ; ácido). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un enlace peptídico. Estos dos

"residuos" aminoacídicos forman un dipéptido. Si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente, para formar un polipéptido. Esta reacción ocurre de manera natural en los ribosomas, tanto los que están libres en el citosol como los asociados al retículo endoplasmático [6].

Los **aminoácidos esenciales** son aquellos que *el cuerpo humano no puede generar* por si solo. Esto implica que la única fuente de estos aminoácidos en esos organismos es la ingesta directa a través de la dieta. Las rutas para la obtención de estos aminoácidos esenciales suelen ser largas y energéticamente costosas. Cuando un alimento contiene proteínas con todos los aminoácidos esenciales, se dice que son de alta o de buena calidad. Algunos de estos alimentos son: la carne, los huevos, los lácteos y algunos vegetales como la espelta, la soya y la quinoa [6].

No todos los aminoácidos son esenciales para todos los organismos (de hecho sólo ocho lo son), por ejemplo, la alanina (no esencial) en humanos se puede sintetizar a partir del piruvato.

En humanos se han descrito estos aminoácidos esenciales:

- Fenilalanina
- Isoleucina
- Leucina
- Lisina
- Metionina
- Treonina

- Triptófano
- Valina
- Arginina
- Histidina

Los aminoácidos que contienen azufre, metionina y cisteína, se pueden convertir uno en el otro, por lo que por conveniencia se consideran una única fuente. Del mismo modo, la arginina, ornitina y citrulina son interconvertibles, y también se consideran una única fuente de aminoácidos nutricionalmente equivalentes.

El aminoácido **fenilalanina(Phe / F)** es un  $\alpha$ -amino ácido con la fórmula  $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$  existe en forma de dos enantiómeros, la forma D- y la L-, dependiendo de su organización espacial. Se escribe de forma abreviada utilizando un código de tres letras como Phe, y como F en el de una letra [7].

El **triptófano** (abreviado **Trp** o **W**) es un aminoácido esencial en la nutrición humana. Es uno de los 20 aminoácidos incluidos en el código genético (codón *UGG*). Pertenece a los aminoácidos con grupos *R NO POLARES* o también llamados **hidrofóbicos** [8].

La **tirosina** (abreviada **Tyr** o **Y**) es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. Su nombre sistemático es ácido 2-amino-3(4-hidroxifenil)-propanoico; también puede nombrarse 4-hidroxifenilalanina [9].

La **cisteína** (abreviada **Cys** o **C**) es uno de los veinte aminoácidos que utilizan las células para sintetizar proteínas. Está codificada en el ARN mensajero como UGU o UGC [9].

La **prolina (Pro, P)** es uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos. En el ARN mensajero está codificada como CCU, CCC, CCA o CCG [10].

**Alanina (Ala o A)** es uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos. En el ARN mensajero está codificada como GCU, GCC, GCA o GCG [11].

## 2.4 Proteínas

Las **proteínas** son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Las proteínas desempeñan un papel fundamental en los seres vivos y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre las que destacan:

- Estructural (colágeno y queratina),
- Reguladora (insulina y hormona del crecimiento),
- Transportadora (hemoglobina),
- Defensiva (anticuerpos),
- Enzimática,
- Contráctil (actina y miosina).

Las proteínas de todo ser vivo están determinadas mayoritariamente por su genética (con excepción de algunos péptidos antimicrobianos de síntesis no ribosomal), es decir, la información genética determina en gran medida qué proteínas tiene una célula, un tejido y un organismo [12].

## 2.5 Lípidos

Los **lípidos** son un conjunto de moléculas orgánicas, la mayoría biomoléculas, compuestas principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno, que tienen como característica principal el ser hidrofóbicas o insolubles en agua y sí en disolventes orgánicos como la bencina, el alcohol, el benceno y el cloroformo. En el uso coloquial, a los lípidos se les llama incorrectamente **grasas**, aunque las grasas son sólo un tipo de lípidos procedentes de animales. Los lípidos cumplen funciones diversas en los organismos vivientes, entre ellas la de reserva energética (triglicéridos), la estructural (fosfolípidos de las bicapas) y la reguladora (esteroides) [13].

## 2.6 Carbohidratos

Los **carbohidratos**, también llamados glúcidos, se pueden encontrar casi de manera exclusiva en alimentos de origen vegetal. Constituyen uno de los tres principales grupos químicos que forman la materia orgánica junto con las grasas y las proteínas [14].

## Conclusiones

En este capítulo se mostraron los conceptos de la estructura de la piel, los cuales ayudaran a entender la estructura de la piel. Además se dan las definiciones de los aminoácidos, lípidos y carbohidratos. Estos son de gran importancia porque se encuentran en las asignaciones de las líneas espectrales de los espectros Raman que se obtienen.

## Bibliografía

1. M. Anthea, J. Hopkins, C.W. McLaughlin, S. Johnson, M. Warner, D. LaHart, J.D. Wright, *Human Biology and Health*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA 1993:
2. A. Oikarinen, *Connective tissue and aging*, International Journal of Cosmetic Science, Volume 26, Number 2, April 2004 , pp. 107-107.
3. J. G. Marks; J. Miller, *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology* (4th ed.). Elsevier Inc (2006).
4. Wilma Smith and Catherine Burns, "Managing the hair and skin of African American pediatric patients." *Journal of Pediatric Health Care* 13(2):72-8 (1999).
5. Richard Weller; John Hunter, John Savin, Mark Dahl. *Clinical Dermatology* (4th ed.). Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing. pp. 268(2008).
6. K. Pisarewicz, D. Mora, F. Pflueger, G. Fields, F. Marí, "Polypeptide chains containing D-gamma-hydroxyvaline". *Journal of the American Chemical Society* 127 (17): 6207–15. doi:10.1021/ja050088m. PMID 15853325. (2005)
7. D.W. Christianson, S. Mangani, G. Shoham, W.N. Lipscomb. "Binding of D-phenylalanine and D-tyrosine to carboxypeptidase A." *Journal of Biological Chemistry* 1989 Aug 5;264(22):12849-53. PMID: 2568989.
8. J.D. Schaechter, R.J Wurtman "Serotonin release varies with brain tryptophan levels". *Brain Res.* 532 (1-2): 203–10. doi:10.1016/0006-8993(90)91761-5. PMID1704290. (1990).



9. D.D. Rasmussen, B. Ishizuka, M.E. Quigley, S.S. Yen. "Effects of tyrosine and tryptophan ingestion on plasma catecholamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 (4): 760–3. PMID 6885965. (1983)G. Bulaj, T. Kortemme, D. Goldenberg "Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides." *Biochemistry* 37 (25): 8965–72. doi:10.1021/bi973101r. PMID 9636038. (1998)J. Balbach, F. X. Schmid, *Proline isomerization and its catalysis in protein folding. In Mechanisms of Protein Folding* 2nd ed. Editor RH Pain. Oxford University Press. (2000).
12. D. L. Nelson & M. M. Cox , *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th Edition. New York: W. H. Freeman and Company, pp. 684-685. ISBN 0-7167-4339-6. (2005).
13. R.F. Doolittle "Redundancias en secuencias de proteínas" en *Predicción de Estructuras Protéicas y los Principios de la Conformación de Proteínas'*. (Fasman GD, ed.), pp 599-623, Plenum Press, New York. (1989).
14. Food and Nutrition Board *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids*. Washington, DC: The National Academies Press. Page 769. ISBN 0-309-08537-3. (2002/2005).

A decorative border resembling a scroll, with rounded corners and a vertical strip on the left side that looks like the edge of a rolled-up document. The scroll is outlined in black and has a light gray shadow effect.

**CAPÍTULO 3:**  
***ESPECTROSCOPIA***  
***RAMAN***

## 3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

### 3.1 Introducción

La espectroscopía Raman es ampliamente utilizada en estudios biológicos. Esta técnica posee ciertas características que son sustentables en el estudio de la piel *in vitro* e *in vivo*. Además de proveer información detallada acerca de la composición y estructura molecular en la piel. También, debido a las vibraciones moleculares son directamente influenciadas por el microambiente de los grupos funcionales, el espectro vibracional provee información de las interacciones moleculares. Por lo tanto, este tipo de información se puede obtener de manera completamente no invasiva tal que el espectro Raman puede ser tomado directamente de la piel [1]. En este capítulo se define la espectroscopía Raman y el efecto en el que se basa esta técnica. En la sección cuatro se describen los diferentes ruidos que se presentan al obtener el espectro Raman de interés.

### 3.2 Definición

La Espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico o inorgánico permitiendo así su identificación. La espectroscopía Raman está basada en el fenómeno de esparcimiento inelástico [2]. Esta es una de las técnicas más usadas en química en la identificación de moléculas. En esta técnica se usa una fuente monocromática de radiación para producir esparcimiento elástico e inelástico en una muestra.

La radiación incidente interactúa con la materia y polariza (cambios de energía) los orbitales de las moléculas o átomos de la muestra. Esta radiación crea un nuevo estado

llamado estado virtual. Como este nivel de energía no es un estado estable, se re-emite un fotón rápidamente. En este proceso se presentan dos tipos de esparcimiento, esparcimiento elástico conocida como esparcimiento Rayleigh y esparcimiento inelástico conocida como esparcimiento Raman. El proceso más probable es el esparcimiento Rayleigh y no cambia la energía de la radiación re-emitida. Una pequeña parte de la radiación re-emitida a diferente energía debido al esparcimiento inelástico, dicha radiación es conocida como esparcimiento Raman. En este caso, el proceso de esparcimiento induce movimiento molecular y, consecuentemente, se puede presentar un intercambio de energía de fotón a molécula o átomo y viceversa. El esparcimiento Raman es un proceso débil y solo 1 de  $10^6$  fotones incidentes son esparcidos de forma inelástica [2].

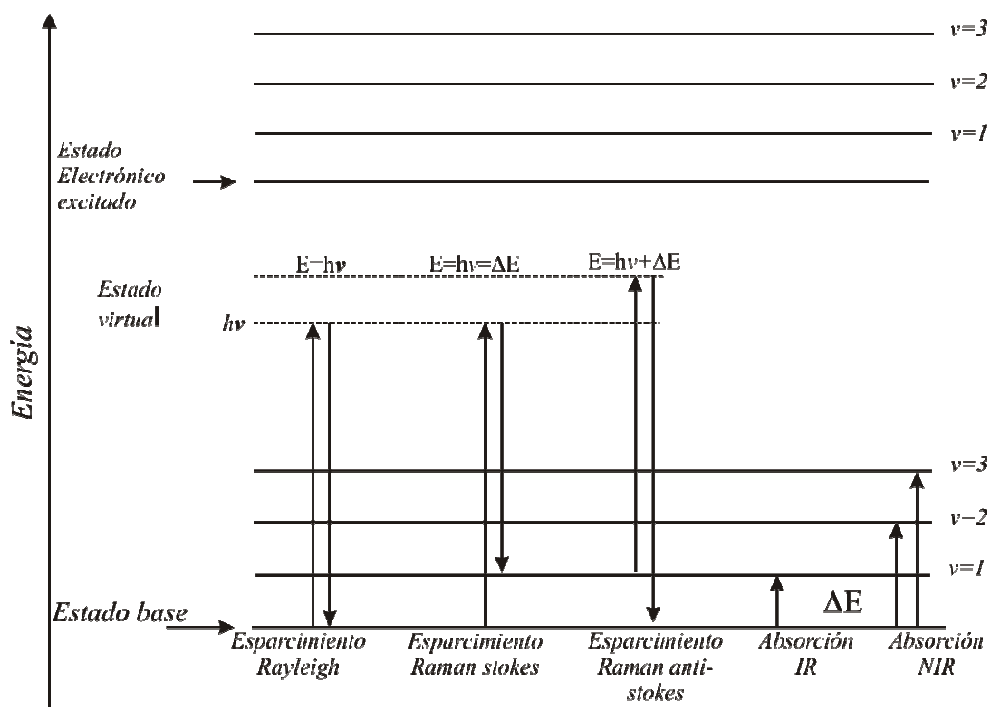
### **3.3 Descripción del efecto Raman**

El fenómeno conocido como efecto Raman fue descrito por el físico Hindu Chandrasekhara Venkata Raman en el año 1928, lo que lo llevo a la obtención del 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 el esparcimiento de la luz debido a su interacción con las moléculas del agua. 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].

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia  $\nu_0$  sobre una muestra cuyas características moleculares se desean determinar, y examinar la luz esparcida por dicha muestra. La mayor parte de la luz esparcida presenta la misma frecuencia que la luz incidente pero una fracción muy pequeña presenta un cambio en frecuencia, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia  $\nu_0$  que la luz incidente se conoce como esparcimiento Rayleigh y no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz esparcida que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como esparcimiento Raman. Las nuevas frecuencias,  $+\nu_r$  y  $-\nu_r$ , son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente [4]. Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de esparcimiento Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa

por una línea horizontal se muestra en la figura 3.1 y es conocido como el diagrama de Jablonski [5].



3.1 Diagrama de Jablonski

De la figura 3.1 pueden distinguirse los siguientes casos [6]:

- si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón esparcido a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón esparcido tiene la misma frecuencia  $\nu_0$  que el incidente, dando lugar al esparcimiento Rayleigh;
- si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón esparcido a una frecuencia distinta de la incidente, se dice que el choque es inelástico (existe

transferencia de energía entre la molécula y el fotón); en este caso pueden darse dos fenómenos:

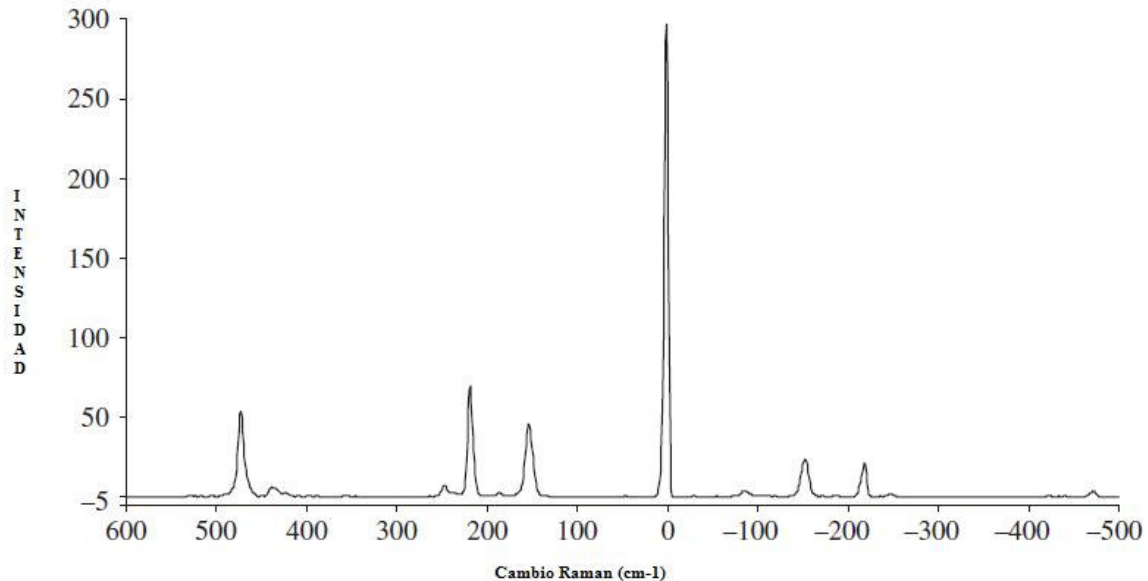
si el fotón esparcido tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es esparcido con frecuencia  $\nu_0 - \nu_r$  y se produce el esparcimiento Raman Stokes;

si el fotón esparcido tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a este estado; el fotón es esparcido con frecuencia  $\nu_0 + \nu_r$  y se produce el esparcimiento Raman anti-Stokes.

Cada material tendrá un conjunto de valores  $\nu_r$  característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman. El espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica esparcida en función del número de onda que se produce. El número de onda es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda, que se expresa en  $\text{cm}^{-1}$  en la ecuación 3.1 se puede ver cómo convertir a número de onda [7]:

$$\kappa = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} [\text{cm}^{-1}] \quad (3.1)$$

El espectro Raman está formado por una banda principal o Rayleigh y dos series de bandas secundarias correspondientes a las bandas Raman Stokes y anti-Stokes, situadas simétricamente a ambos lados de la banda Rayleigh esto se muestra en la figura 3.2.



### 3.2 Espectro Raman del sulfuro, mostrando los cambios Stokes y antistokes

Es importante resaltar que el desplazamiento de las frecuencias Raman respecto a la frecuencia incidente  $\nu_0$  es independiente de esta última y por ello suele tomarse como abscisa para representar los espectros Raman este desplazamiento, situando el centro de la banda Rayleigh como origen del eje. Así, en el eje de abscisas en realidad aparecerá la diferencia entre la frecuencia Raman y la de excitación del láser, normalizada respecto a la velocidad de la luz esto se representa en la ecuación 3.2:

$$\nu = \frac{(\nu - \nu_0)}{c} [cm^{-1}] \quad (3.2)$$

En ocasiones, debido a la naturaleza química del material que se analiza, unido al efecto Raman se produce un efecto de fluorescencia (fenómeno de absorción de luz) que puede llegar a enmascarar las bandas Raman; en estos casos, podría resultar de interés medir el



espectro anti-Stokes ya que a estas frecuencias, aunque el efecto Raman es más débil, también lo es el efecto de la fluorescencia y pueden observarse bandas Raman en la parte anti-Stokes del espectro, que se encuentran enmascaradas en la parte Stokes [8].

### **3.4 Ruidos en espectroscopía Raman**

El "ruido" es una interferencia a un proceso de comunicación. Consideraremos al ruido simplemente como una *señal indeseada* que no está conectada con la señal deseada de ningún modo. Así, *ruido* es tan solo un nombre que le adjudicamos a aquellas señales que no nos interesan.

Uno de los problemas inherentes a la adquisición de cualquier señal es el ruido presente en la medida. En el caso de la obtención de espectros Raman los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos diferentes: ruido de disparo, ruido generado por la muestra, ruido generado por la instrumentación, ruido computacional y ruido generado por fuentes externas [9].

#### **3.4.1 Ruido de disparo (Shot noise)**

Ruido de disparo es una fuente de ruido inevitable en la medida de espectros Raman. Es un tipo de ruido electrónico que tiene lugar cuando el número finito de partículas que transportan energía, tales como los electrones en un circuito electrónico o los fotones en un dispositivo óptico, es suficientemente pequeño para dar lugar a la aparición de fluctuaciones estadísticas apreciables en una medición [10].

El nivel de este ruido es tanto mayor cuanto mayor sea el valor promedio de la intensidad de corriente eléctrica o de la intensidad luminosa, según se trate de un

dispositivo electrónico u óptico. Sin embargo, en tanto que el nivel de señal crece más rápidamente cuanto mayor es su nivel promedio, a menudo el ruido de disparo sólo supone un problema cuando se trabaja con intensidades de corriente o intensidades luminosas bajas.

El **ruido de disparo** en los dispositivos electrónicos consiste en fluctuaciones aleatorias de la corriente eléctrica a través de un conductor, causadas por el hecho de que la corriente se transporta en cargas discretas (electrones). Esto no sólo ocurre en las uniones p-n, sino en cualquier conductor, incluso en las situaciones en que la carga no esté bien localizada [11].

Debe distinguirse el ruido de disparo de las fluctuaciones de corriente en equilibrio, las cuales se producen sin aplicar ningún voltaje y sin necesidad de que exista ningún flujo promedio de corriente. Estas fluctuaciones de la corriente de equilibrio se conocen como ruido de Johnson-Nyquist.

El ruido de disparo se puede modelar como un proceso de Poisson y los portadores de carga que forman la corriente siguen una distribución de Poisson. Las fluctuaciones de corriente tienen una desviación estándar dada por la ecuación 3.3:

$$\sigma_i = \sqrt{2qI\Delta f} \quad (3.3)$$

donde  $q$  es la carga elemental del electrón e  $I$  es la corriente promedio a través del dispositivo. Se asume que todas las cantidades están referidas en unidades del Sistema Internacional. Si se hace circular esta corriente de ruido a través de un resistor, la potencia de ruido resultante se representa en la ecuación 3.4

$$P = 2qI\Delta fR \quad (3.4)$$

Si la carga no está totalmente localizada en el tiempo pero tiene una distribución temporal dada por  $qF(t)$ , siendo la integral de  $F(t)$  sobre  $t$  igual a la unidad, entonces la densidad espectral de potencia asociada a la corriente de la señal de ruido será la ecuación 3.5:

$$S_i(f) = 2qI |\Psi(f)|^2, \quad (3.5)$$

donde  $\Psi(f)$  es la transformada de Fourier de  $F(t)$

### 3.4.2 Ruido generado por la muestra

El ruido generado por la muestra incluye emisiones ópticas no deseadas y generadas por la propia muestra como es el caso de la fluorescencia, fenómeno que se produce si, al incidir un fotón sobre una molécula, éste es absorbido y la molécula pasa a un estado electrónico excitado donde permanece unas decenas de nanosegundos, para saltar a otro estado excitado pero de menor energía, liberando un fotón de frecuencia más baja que el incidente [12]. En los espectros Raman la fluorescencia suele presentarse como una suave curvatura de la línea de base y puede alcanzar una intensidad que llegue a enmascarar por completo la intensidad de las bandas Raman. El ruido generado por la muestra incluye también los cambios de intensidad Raman debidos a cambios en la muestra no relacionados con la concentración; por ejemplo, tanto la intensidad de las bandas como la posición pueden variar en función de la temperatura de la muestra, aunque estos cambios tienden a ser pequeños. La heterogeneidad de la muestra también puede crear ruido ya que el análisis

realizado en un punto de la muestra no tiene que ser representativo de la muestra completa.

### **3.4.3 Ruido generado por la instrumentación**

Ruido generado por la instrumentación: depende del diseño específico de la instrumentación empleada en el análisis. Este tipo de ruido incluye los ruidos introducidos por el detector como el ruido térmico, el ruido de lectura que es la dependencia de la eficiencia cuántica del detector con la longitud de onda [13].

### **3.4.4 Ruido computacional**

Ruido computacional: este ruido se refiere al introducido en el proceso de digitalización de la señal de salida del detector.

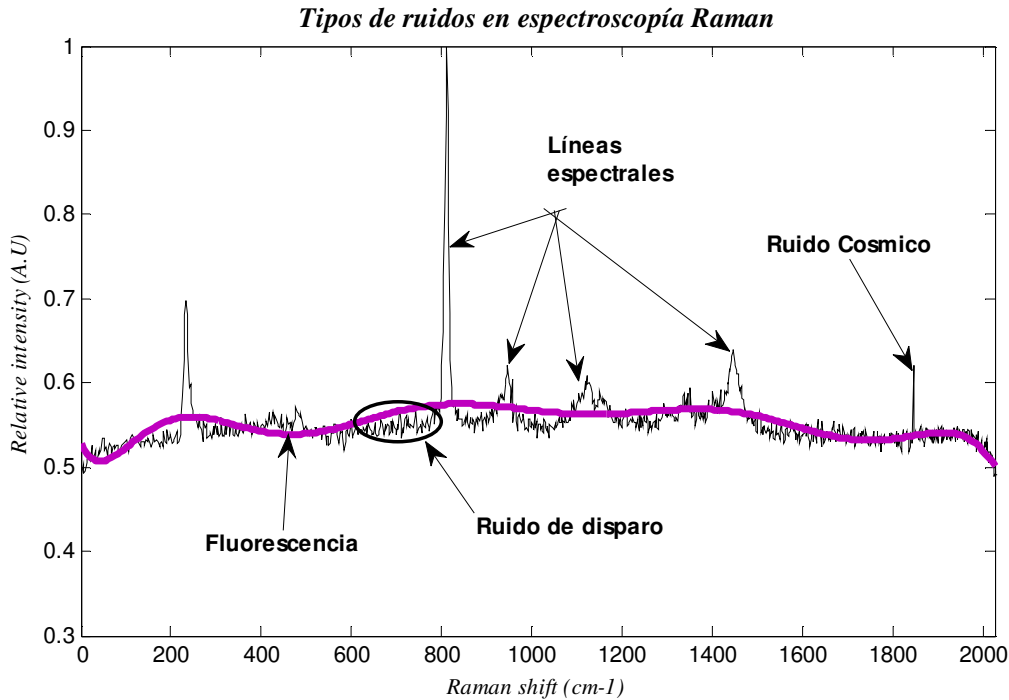
### **3.4.5 Ruido generado por fuentes externas**

Ruido generado por fuentes externas: este ruido es el generado externamente al equipo Raman o la muestra que se está analizando. Generalmente está causado por alguna fuente de luz externa que contamina la señal en algún punto del equipo de medida aunque, si el equipo y el contenedor de la muestra a medir están cuidadosamente diseñados, deberían de ser inmunes a las radiaciones externas. Pueden ser por ejemplo fuentes externas de ruido las luces fluorescentes y la luz solar. Una fuente de ruido externo de origen no-óptico es la generado por partículas de alta energía como los rayos cósmicos que llegan al detector del equipo de medida. Los rayos cósmicos liberan un gran número de electrones que son indistinguibles de los fotoelectrones. Los electrones generados por los rayos cósmicos se concentran en uno o máximo dos de los elementos del detector. El resultado es un pico muy

estrecho y de gran intensidad en el espectro de esparcimiento Raman. Estos picos ocurren infrecuentemente, en tiempo aleatorio y posiciones también aleatorias del espectro Raman. Estas partículas de alta densidad de energía son las que componen la radiación cósmica que llega a la órbita terrestre y que está formada en un 98% por nucleones (cada uno de los corpúsculos que intervienen en la constitución de un núcleo atómico) [14]. Hasta el momento no se tienen pruebas muy concluyentes de dónde y cómo se produce la conversión de la materia en radiación cósmica ni de los mecanismos que aceleran los núcleos de los rayos cósmicos y les proporcionan energía. Se cree que los núcleos se propagan desde los campos interestelares hacia los campos interplanetarios de origen solar, colisionando con las partículas que los constituyen y que algunas de estas colisiones contribuyen a la aceleración de estas partículas. Así, después de múltiples colisiones, algunas partículas muy aceleradas y con muy alta densidad de energía atraviesan la atmósfera terrestre. Estas partículas, calificadas como altamente penetrantes (se comprobó que atravesaban una placa de platino), provenientes de los rayos cósmicos, son principalmente muones, producto de las múltiples colisiones de los nucleones con otras partículas presentes en el espacio. Es usual la presencia de ruido cósmico en detección de luz y en particular cuando se utilizan detectores como las matrices CCD (Dispositivos de carga acoplada). El principio de funcionamiento de un CCD consiste en la absorción de fotones en el silicio con la consiguiente liberación de electrones; los electrones no recombinados son colectados y se genera una corriente resultante de este proceso; los fotones incidentes en el CCD, con sus respectivas energías, serán absorbidos con mayor o menor probabilidad en función del valor del coeficiente de absorción a su longitud de onda. Así pues, los muones, con energías comprendidas entre 10-1000 MeV, depositan una pequeña parte de su energía en el sustrato de silicio durante el impacto, creando electrones

mediante excitación e ionización de los átomos cuando atraviesan la materia. Es difícil confundir un pico cósmico con una banda Raman por la disparidad en sus características, a no ser que el azar haga caer varios rayos cósmicos en píxeles adyacentes del detector, lo cual es poco probable; en este caso, sería necesaria la eliminación de este ruido para poder aplicar otras técnicas de procesado sobre el espectro.

De todos estos posibles ruidos que nos podemos encontrar en un espectro, los más habituales son el ruido de disparo, el cósmico y la fluorescencia, como se pueden ver en la figura 3.3. La aplicación de la espectroscopía Raman a la identificación de pigmentos, está basada en la localización de la posición de las bandas Raman para discernir entre un pigmento u otro; estos ruidos presentes en el espectro Raman dificultan la identificación de las bandas y por tanto será beneficioso reducirlos mediante técnicas de procesado de señal que no conlleven pérdida de información. Además, esta reducción permitirá aplicar otras técnicas de procesado sobre el espectro, como por ejemplo la detección automática de las bandas Raman, de forma más eficiente.



### 3.3 Tipos de ruidos

Los procesos de esparcimiento Raman y los de fluorescencia no están relacionados. En la fluorescencia la molécula absorbe completamente al fotón incidente y pasa a un estado electrónico excitado, y transcurre un tiempo (tiempo de vida media) cuando la molécula sufre una nueva transición al estado electrónico inferior reemitiendo radiación normalmente de longitud de onda superior a la que se absorbió. En cambio en el efecto Raman, el fotón, como un todo, nunca resulta absorbido, si no que perturba a la molécula y le induce a que sufra una transición. La diferencia esencial radica en el hecho de que la fluorescencia puede disminuirse agregando especies que mediante colisiones, quitan la energía de la molécula excitada por absorción de radiación, antes de que aquella reemita, mientras que el efecto Raman, no es posible llevar a cabo este proceso porque la molécula excitada nunca alcanza un estado excitado como situación intermedia y por tanto no es posible que permanezca el tiempo ( tiempo de vida del estado excitado) necesario para que

pueda tener lugar la colisión que la inhiba. El estado intermedio que alcanza una molécula en un proceso de esparcimiento Raman es un estado virtual, que no necesariamente coincide con ningún estado propio de la molécula [15].

## **Conclusiones**

En este capítulo, se describe el efecto Raman que es la base esencial de la espectroscopía Raman, se mostraron los ruidos que se encuentran al obtener el espectro Raman. Estos conceptos ayudan a entender el trabajo que se está presentando.



## Bibliografía

1. **V Tuchin.** “*Handbook of optical biomedical diagnostics*” SPIE Press, 2002.
2. **E. Smith and G. Dent,** *Modern Raman Spectroscopy: Practical Approach*, USA, 2005.
3. **C.V. Raman and. K.S Krishnan,** *a new secondary radiation Nature*, 121, 501 (1928).
4. **D Long,** *the Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, 1977.
5. **J.R. Ferraro and. K Nakamoto,** *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego 1994.
6. **F.A Cotton,** *Chemical Applications of Group Theory*, Wiley Interscience, 1990.
7. **H Lefebvre-Brion, R. W Field,** *The Spectra and Dynamics of Diatomic Molecules*, Elsevier, 2004.
8. **N.B Colthrup, L.H Daly and. S.E Wiberley,** *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, 1990.
9. **I. R. Lewis and G. M. E Howell,** *Handbook of Raman Spectroscopy*, Taylor & Francis Group, 2001.
10. **A Fadini and. F.-M Schnepel,** *Vibrational Spectroscopy: Methods and Applications*, Ellis Horwood Ltd, Chichester, 1989.
11. **R. Sarpeshkar, T. Delbruck, and C. A. Mead,** "White noise in MOS transistors and resistors", *IEEE Circuits Devices Mag.*, pp. 23–29, Nov. 1993
12. **G Herzberg,** *Molecular Spectra and Molecular Structure: Infrared and Raman Spectra of polyatomic molecules*, D. Van Nostrand Company, 1958.

13. **K Nakamoto**, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 4<sup>th</sup> ed, John Wiley & Sons, 1986.
14. **G Gauglitz. and. T Vo-Dinh**, *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VCH, 2003.
15. **A Requena y J. Zúñiga**, *Espectroscopía*, Prentice Hall, España, 2004.



**CAPÍTULO 4:**  
***WAVELETS***

## 4. WAVELETS

En este capítulo se describen las Wavelets, como herramienta para el procesado de los datos que se obtuvieron en esta tesis. En la sección siguiente se define las wavelets, las wavelets discretas, las wavelets symlets que fueron utilizadas para eliminar el ruido a los espectros y las wavelets biortogonales con las cuales se sustrajo el ruido de fluorescencia.

### 4.1 Introducción

Una forma de pensar en las wavelets es plantearse cómo miran nuestros ojos el mundo. En el mundo real, se puede observar un bosque como el de una fotografía desde muchas posiciones que son, de hecho, distintas escalas de resolución. Desde la ventana de un avión a reacción, por ejemplo, el bosque parece una cubierta sólida de verde. Desde la ventana de un automóvil que se encuentre sobre el suelo, la cubierta se transforma en árboles individuales; y si salimos del coche y nos acercamos, comenzamos a ver ramas y hojas. Si tomamos entonces una lupa, se puede encontrar una gota de rocío en el extremo de una hoja. A medida que nos acercamos a escalas cada vez más pequeñas, podremos encontrar detalles que no habíamos observado antes. Sin embargo, si se intenta hacer lo mismo con una fotografía, nos sentiríamos decepcionados por no tener los mismos detalles. Si se amplía la fotografía para "acercarnos" a un árbol, sólo veremos un árbol más difuminado; no se encuentra la rama, la hoja, ni la gota de rocío. Aunque nuestros ojos pueden ver el bosque a muchas escalas de resolución, la cámara sólo puede mostrar una cada vez.

Aunque las wavelets, como objeto de investigación organizada, tienen menos de dos décadas, se derivan de muchos conceptos desarrollados durante un período de casi dos siglos, siendo repetidamente redescubiertas por científicos que querían resolver problemas

técnicos de diversas disciplinas. Los procesadores de señales estaban buscando una manera de transmitir mensajes claros a través de los hilos telefónicos. Los que realizaban prospecciones petrolíferas querían encontrar una forma mejor de interpretar las señales sísmicas. Pese a todo, el término "wavelets" no entró a formar parte de la terminología habitual entre los científicos hasta que la teoría se liberó de las distintas aplicaciones en las que surgió y se sintetizó en una teoría puramente matemática. Esta síntesis, en cambio, abrió los ojos de los científicos a nuevas aplicaciones. Hoy en día, por ejemplo, las wavelets no son sólo el caballo de batalla de la animación y las imágenes por computadora; también las utiliza el FBI para codificar su base de datos de 30 millones de huellas dactilares. En el futuro, los científicos podrán utilizar el análisis de wavelets para diagnosticar el cáncer de mama, detectar anomalías cardíacas o predecir el tiempo.

Usando la expansión de Fourier de una señal, representando la señal como una suma de señales sinusoidales, podemos determinar todas las frecuencias presentes en la señal, sin embargo no se puede saber en qué instante de tiempo están presentes en la señal, es decir, la señal está representada en el dominio de la frecuencia pero no al mismo tiempo en el dominio del tiempo. No hay información acerca de la frecuencia en la señal en el dominio del tiempo y tampoco hay información acerca del tiempo en el dominio de Fourier [1].

Para señales estacionarias no es necesario conocer el momento en el que se presenta una frecuencia pues sus componentes de frecuencia no cambian con el tiempo, es decir, todas las frecuencias se mantienen constantes en el tiempo, no varían. Sin embargo para señales no estacionarias, como es el caso de la mayoría de señales biológicas, este análisis es necesario pues es muy útil conocer como varía la frecuencia con respecto al tiempo para caracterizar la señal o el proceso que esta representa.

La transformada wavelet es una representación en el espacio tiempo-frecuencia obtenida usando técnicas de filtrado digital y está relacionada con el análisis de los armónicos de la señal. Al representar una señal en frecuencia y en tiempo se podría cortar la señal en partes y analizarlas por separado [2].

A diferencia de la transformada de Fourier, en el análisis con wavelets no se asume que la señal analizada sea periódica por lo tanto es posible estudiar señales que exhiben cambios bruscos e incluso discontinuidades utilizando muchas menos funciones wavelet base que las que se necesitarían si se utilizaran funciones seno y coseno para alcanzar una aproximación adecuada.

Las wavelets permiten que la información sea codificada por medio de los coeficientes de wavelet de acuerdo a niveles de detalle o medidas de la cantidad detallada de información, es decir permite que la información sea analizada dependiendo de las escalas o resoluciones. La resolución se varía con las operaciones de filtrado mientras que la escala es determinada por operaciones de descomposición o interpolación.

## **4.2 Wavelets**

La wavelets se usan como funciones base para representar otras funciones tal y como se hace con las funciones seno y coseno en la transformada de Fourier.

La transformada wavelet permite un análisis multiresolución, es decir, la observación de señales en frecuencias distintas a distintas escalas de resolución, lo que permite tener una noción del contenido en frecuencia de la señal [1].

Los componentes de alta frecuencia de una señal son localizados con menos error en el dominio del tiempo mientras que los componentes de baja frecuencia son localizados

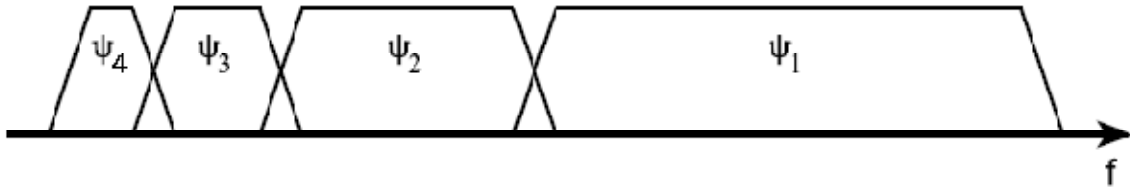
mejor en el dominio de la frecuencia. El análisis de multiresolución está diseñado para dar una resolución alta en el dominio del tiempo y baja en el de la frecuencia. Este tipo de análisis es principalmente útil para señales que tienen componentes de alta frecuencia de corta duración y componentes de baja frecuencia de duración prolongada [2].

La transformada wavelet es la representación de una señal en términos de una forma de onda de longitud finita o de oscilación rápidamente decreciente y con valor medio cero, llamada wavelet madre o función prototipo [3]. Esta forma de onda se escala y desplaza para generar ondas que si se superponen igualan a la señal original. Se puede decir que es una función en términos de oscilaciones tanto en el tiempo como en la frecuencia esto se puede ver en la ecuación 4.1.

$$\psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad (4.1)$$

En la ecuación 4.1  $s$  es el escalamiento,  $\tau$  es la traslación. Esta ecuación representa la wavelet madre.

Se puede cubrir el espectro finito de la señal con el espectro de wavelets dilatadas (cambiando la escala) en la misma forma en que cubrimos el dominio del tiempo de nuestra señal con wavelets trasladadas. Si una wavelet puede verse como un filtro pasabanda, una serie de wavelets dilatadas puede verse como un banco de filtros pasabanda. El factor de fidelidad  $Q$  (tasa entre la frecuencia central del espectro y su ancho) es constante para todas las wavelets [4]. En la figura 4.1 se puede ver la wavelet resultante de escalar la wavelet madre en el dominio del tiempo.



#### 4.1 Espectro wavelet resultante de escalar la wavelet madre en el dominio del tiempo

El análisis con wavelets permite definir una función prototipo o wavelet madre que no siempre es la misma, es decir las funciones base no siempre son iguales a diferencia de lo que ocurre en la transformada de Fourier donde las funciones base son siempre el seno y el coseno. Las wavelets madre se pueden diseñar dependiendo de las necesidades del diseñador siempre y cuando cumplan algunas normas para resolver el problema [5].

El análisis en el dominio del tiempo se realiza con una versión contraída o de alta frecuencia de la wavelet madre y el análisis en frecuencia se realiza con una versión dilatada o de baja frecuencia de la misma [6]. Teniendo en cuenta que la señal original puede ser expresada como una expansión o serie de wavelet (usando coeficientes en combinación lineal de funciones wavelet) las operaciones con los datos pueden ser realizadas usando únicamente los coeficientes wavelet correspondientes lo que hace las operaciones menos complejas que las que hay que hacer cuando se utiliza la transformada de Fourier.

El análisis con wavelets emplea regiones de tamaño variable, utiliza intervalos largos de tiempo donde se necesita mucha información que necesita baja frecuencia y pequeñas regiones donde la información necesita altas frecuencias [7].



### 4.2.1 Wavelets discretas

Cuando se usan wavelets discretas para transformar una señal continua el resultado es una serie de coeficientes que se conocen como la descomposición en series wavelet. Es posible reconstruir la señal original a partir de su transformada wavelet discreta. Además esta provee suficiente información para analizar y sintetizar una señal mientras reduce la cantidad de operaciones. Las wavelets discretas no se pueden escalar y trasladar de forma continua solo se puede hacer por pasos discretos en la ecuación 4.2 se puede ver la representación de una wavelets discreta.

$$\psi_{j,k}(t) = \frac{1}{\sqrt{s_0^j}} \psi\left(\frac{t - k\tau_0 s_0^j}{s_0^j}\right) \quad (4.2)$$

En la ecuación 4.2,  $j$  y  $k$  representan números enteros,  $s$  el escalamiento y  $\tau_0$  es el factor de traslamiento.

#### Transformada inversa a partir de los coeficientes

La transformada de wavelet discreta de una señal  $x$  se calcula pasando la señal por una serie de filtros. Primero se pasa por un filtro pasa bajas con respuesta al impulso  $g$  que remueve las frecuencias por encima de la mitad de la frecuencia máxima, lo que lleva a la convolución de ambas esto se representa en la ecuación 4.3:

$$y[n] = (x * g)[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k]g[n-k] \quad (4.3)$$

La señal se descompone simultáneamente con un filtro pasa altas  $h$ . Las salidas contienen los coeficientes detallados (del filtro pasa altas) y los coeficientes aproximados

(del pasa bajas). Ambos filtros están relacionados entre sí como filtro de espejo cuadrado [8].

Después de pasar la señal por un filtro pasa bajas de media banda como el que se utilizó anteriormente, como la frecuencia máxima se redujo a la mitad, la mitad de las muestras pueden ser descartadas, de acuerdo con la regla de Nyquist. Por lo tanto se submuestran las salidas de los filtros por 2. Con esto la escala de la señal se duplica: esto se representa en la ecuación 4.4 y 4.5.

$$y_{baja}[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k]g[2n-k] \quad (4.4)$$

$$y_{alta}[n] = \sum_{k=-\infty}^{\infty} x[k]h[2n-k] \quad (4.5)$$

Esta descomposición reduce la resolución en el tiempo a la mitad pues solo la mitad de las muestras a la salida de cada filtro caracterizan la señal entera. Sin embargo, cada salida tiene la mitad de la banda de frecuencia de la señal original por lo tanto la resolución en frecuencia se duplicó. Con esto se reduce la incertidumbre en la frecuencia a la mitad con lo que se cumple con el principio de incertidumbre de Hilbert, el cual establece que producto de las dispersiones obtenidas en el espacio directo y en el de las frecuencias no puede ser más pequeño que una cierta constante geométrica. [9].

Después de la descomposición, la resolución no se ve afectada porque remover la mitad de los componentes espectrales de la señal hace que la mitad de las muestras sean redundantes de todas maneras, es decir, la mitad de las muestras pueden ser descartadas sin que se pierda información. Esta es la razón por la cual la escala se duplica.

La transformada wavelet consiste en un componente aproximado final y todos los componentes de información detallada para cada nivel, que están definidos por la salida del filtro pasa altas que constituye los coeficientes de wavelet para el nivel correspondiente.

La transformada wavelet discreta utiliza dos funciones: la función de escalamiento asociada al filtro pasa bajas y la función wavelet asociada al filtro pasa altas.

En cada nivel de descomposición, es decir, cada vez que se repita el proceso, el filtrado y la descomposición resultarán en la mitad de las muestras y por lo tanto reducirán la resolución en el tiempo cada vez a la mitad, y reducirán a la mitad la banda de frecuencia con lo que se duplica cada vez la resolución en frecuencia.

La transformada wavelet discreta de la señal original es la concatenación de los coeficientes wavelet de cada nivel que se grafican empezando por los del último nivel de descomposición. La transformada tendrá el mismo número de coeficientes que tiene la señal original [10].

La localización en el tiempo de las frecuencias en la señal transformada tendrá una resolución que depende del nivel en el que se presentan. Si la información importante de la señal está en las frecuencias altas, como ocurre generalmente, la localización en el tiempo de estas frecuencias será más precisa, este es el principio de diseño del análisis multiresolución, y se da porque estas frecuencias están caracterizadas por un mayor número de muestras. Si la información importante está en las frecuencias bajas, la localización en el dominio del tiempo no será precisa pues la cantidad de muestras que se usan para expresar la señal en esas frecuencias es muy baja.

Las bandas de frecuencia que contengan información importante se verán como amplitudes altas en las regiones de la transformada que contengan estas frecuencias. Por el contrario las bandas de frecuencia que no contienen mucha información se verán como amplitudes pequeñas y esas regiones de la señal transformada pueden ser descartadas para reducir la cantidad de datos.

Las wavelets dentro de una familia se clasifican en subclases según el número de momentos desvanecedores (vanishing moments, MD) que está relacionado con el número de coeficientes y es el número que aparece al lado del nombre de la wavelet [11].

La señal original debido a la continua descomposición por 2 debe ser una potencia de 2 o al menos un múltiplo de una potencia de dos para que el proceso sea eficiente. La longitud de la señal determina la cantidad de niveles en los que la señal puede ser descompuesta.

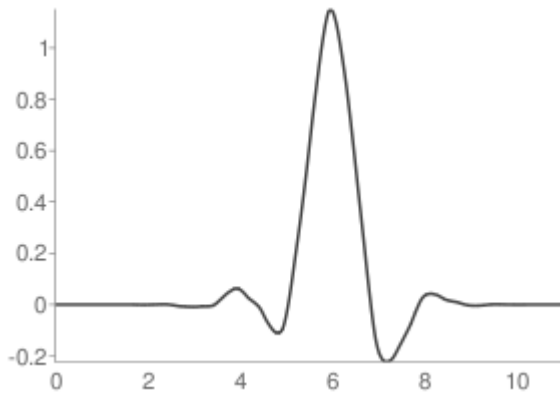
#### **4.2.2 Wavelets symlets**

Las wavelets Daubechies (db) son una familia de wavelets ortogonales definidas por la transformada discreta wavelet y caracterizadas por un número máximo de **MD** para darles algo de soporte. Cada una de este tipo de wavelets de esta clase, tienen una función escala (también llamada wavelet padre) la cual genera un análisis de multiresolución ortogonal [12].

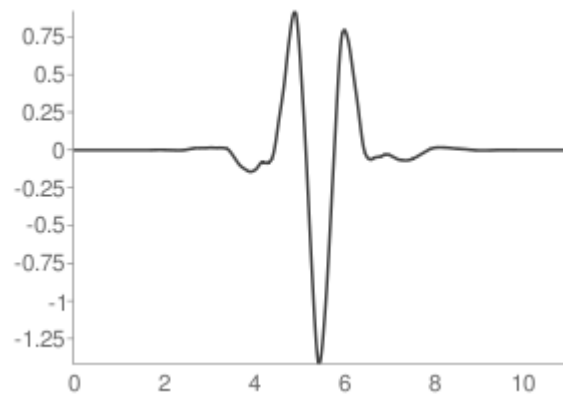
Las symlets son wavelets casi simétricas propuestas por Daubechies como modificación de la familia Daubechies. Las propiedades de las dos familias son similares. En la figura 4.2 se muestran la función de escala y la función wavelet de la symlet 6.

Las propiedades de las symlets son:

- Son casi simétricas
- Ortogonales
- Biortogonales



Función de escala



Función Wavelet

#### 4.2 Wavelet Symlet 6

### 4.2.3 Wavelets biortogonales

Una wavelet biortogonal es una wavelet donde la asociación con la transformada wavelet es invertible pero no necesariamente ortogonal. El diseño de la wavelets biortogonales permite más grados de libertad que las wavelets ortogonales. Un grado de libertad adicional es la posibilidad para construir una función wavelet simétrica [13].

En el caso biortogonal, hay dos funciones de escalamiento  $\phi, \tilde{\phi}$ , las cuales pueden generar diferentes análisis de multiresolución, y concordando dos diferentes funciones wavelet  $\psi, \tilde{\psi}$ . Los números  $m, n$  de los coeficientes en la secuencias de escalamiento  $a, \tilde{a}$

pueden diferir. La secuencia de escalamiento debe satisfacer la siguiente condición de biortogonalidad. Esta es la ecuación 4.6

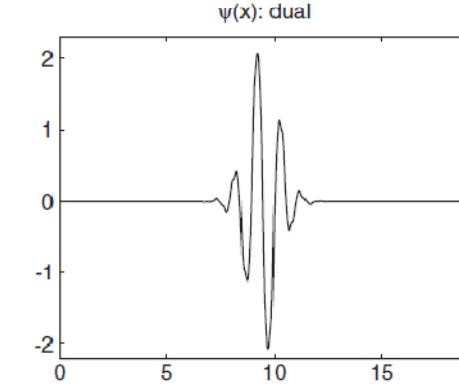
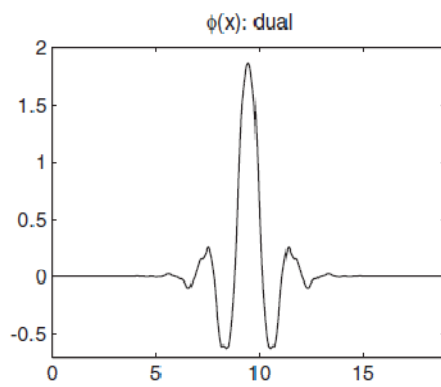
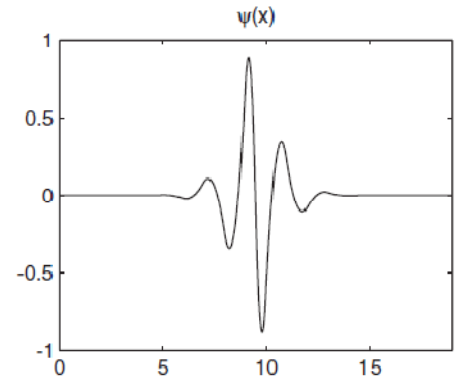
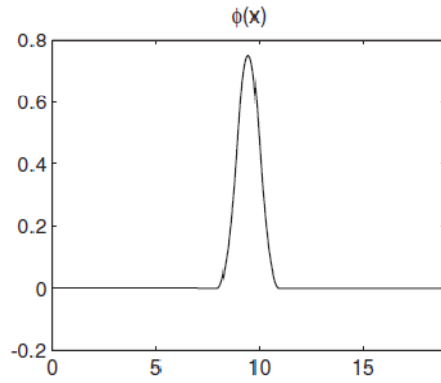
$$\sum_{n \in \mathbb{Z}} a_n \tilde{a}_{n+2m} = 2\delta_{m,0} \quad (4.6)$$

En la ecuación 4.6  $\delta$  es la delta de kronecker.

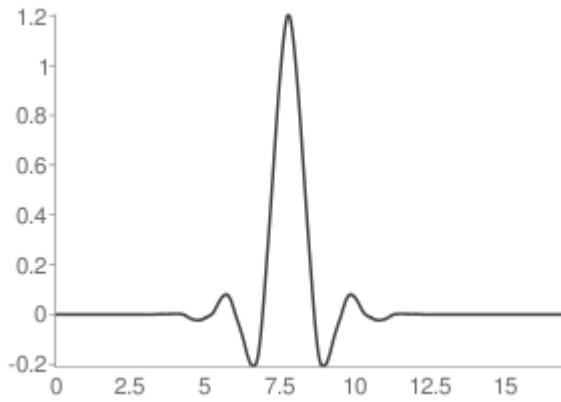
Las propiedades de las wavelets biortogonales son:

- Simétrica
- Biortogonal

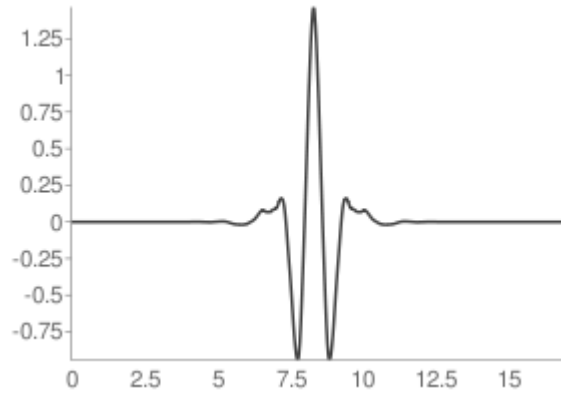
En la figura 4.3 se muestra una wavelet biortogonal descompuesta y reconstruida. En la figura 4.4 se muestra una wavelet biortogonal 6.8 que es la que se utiliza para hacer el procesamiento de datos en este trabajo.



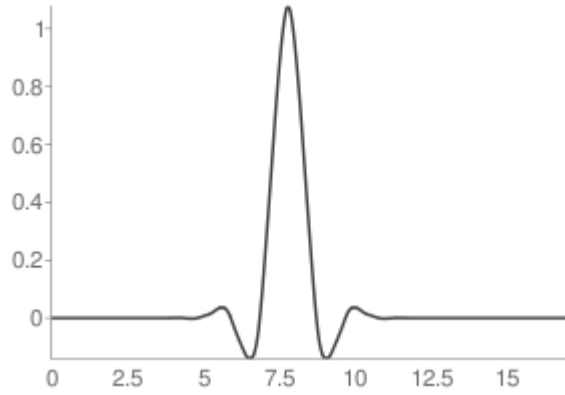
### 4.3 Wavelet biortogonal, descompuesta y reconstruida



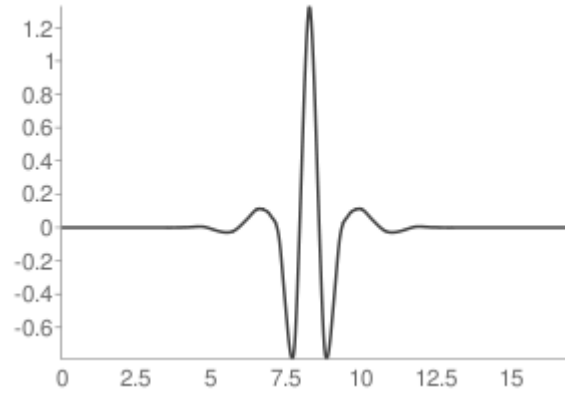
Descomposición de la función de escala



Descomposición de la función wavelet



Reconstrucción de la función de escala



Reconstrucción de la función wavelet

**4.4 Wavelet biortogonal 6.8, descompuesta y reconstruida**



## Bibliografía

1. **G Bachman, L Narici, E Beckenstein**, *Fourier and Wavelets Analysis*, Springer, 2000.
2. **D. B Percival, A. T Walden**, *Wavelets Methods for Times Series Analysis*, Cambridge university press, 2006.
3. **J. L Semmlow**, *Biosignal and Biomedical Image Processing MATLAB-Based Applications*, Marcel Dekker, Inc, 2004.
4. **H Yan**, *Signal Processing for Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy*, Marcel Dekker, Inc, 2002.
5. **S. T Karris**, *Signals and Systems with MATLAB<sup>®</sup> Applications*, Orchard Publications, 2003.
6. **W. G PAN**, *Wavelets in Electromagnetics and Device Modeling*, JOHN WILEY & SONS, 2003.
7. **F Chau, Y Liang, J Gao, X Shoa**, *Chemometrics From Basics to Wavelet Transform*, JOHN WILEY & SONS, 2004.
8. **W Dahmen, A. J Kurdila, P Oswald**, *Multiscale Wavelet Methods for Partial Differential Equations*, Academic Press, 1997.
9. **Q Tao, V Mang, X Yuesheng**, *Wavelet Analysis and Applications*, Springer, 2007.
10. **Y. Y Tang, P. C Yuen, C Li**, *Wavelet Analysis and Its Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
11. **J. S Walker**, *A Primer on WAVELETS and Their Scientific Applications*, Taylor & Francis Group, 2008.

12. **E.G.T Swee, , S Elangovan**, Applications of symlets for denoising and load forecasting” proceedings of the IEEE signal processing workshop on, 1999.
13. **A Cohen. I Daubechies, J Feauveau**, Biorthogonal bases of compactly supported wavelets. *Commun. Pure Appl. Math.* **1992**, 45 485-493.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners on the top and right. The text is centered within this border.

**CAPÍTULO 5:**  
***ARREGLO***  
***EXPERIMENTAL***

## **5. ARREGLO EXPERIMENTAL**

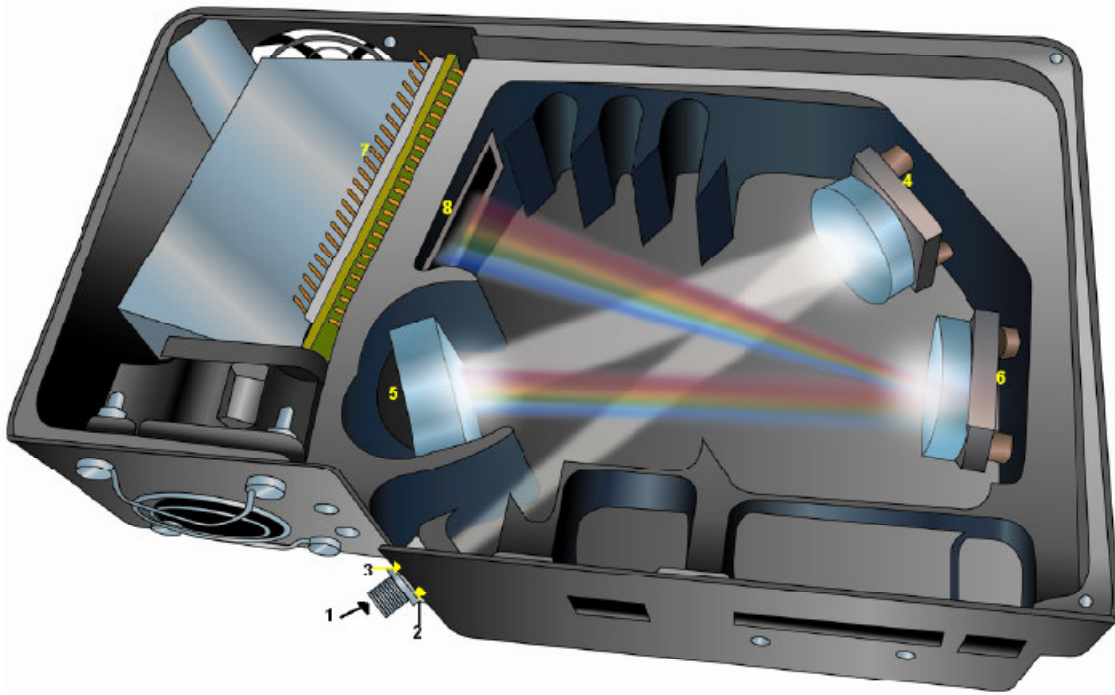
En este capítulo se describe el arreglo experimental utilizado para obtener los espectros de la piel. En la siguiente sección se describe el espectrómetro utilizado y las diferentes componentes que tiene. En la sección tres se describe la punta de prueba utilizada y se describen los diferentes componentes que tiene en su interior. En la sección cuatro se proporcionan algunas características del láser utilizado para ésta tesis. Finalmente se describe el arreglo experimental utilizado para tomar los espectros que se desean.

### **5.1 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 del espectrómetro. Dando como resultado un sistema compacto y flexible, con ninguna de sus partes móviles. El espectrómetro QE65000 es una combinación única de tecnologías a disposición de los usuarios con una inusualmente alta respuesta espectral óptica de alta resolución. La electrónica ha sido diseñada para una gran flexibilidad en la conexión de varios módulos, así como interfaces externas. Las interfaces del QE65000 para PC, PLC (controlador lógico programable) y otros incorporados a través de los controladores para comunicación USB 2.0 o RS-232. El detector usado en la espectrómetro QE65000, detector enfriado TE (TEC), 1044x64 elementos CCD de Hamamatsu. El QE65000 opera a través de USB (sin funcionamiento del TEC), o de una fuente de alimentación +5 VDC. El espectrómetro QE65000 es controlado por un microcontrolador, por lo tanto, todos los parámetros operativos se ejecutan a través del software de interfaz a la unidad [1].

## 5.2.1 Componentes del espectrómetro QE65000

En la figura 5. 1 se enumeran las diferentes componentes del espectrómetro QE6000.



5.1 Componentes del QE65000

1. **Conector 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 [1].
2. **Rendija (slit):** Una 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. También puede utilizar el QE65000 sin rendija. En esta configuración, el diámetro de la fibra conectada al QE65000 determina el tamaño de la entrada de apertura [1].
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 [1].

- 4. Espejo colimador:** La luz enfocada que entra hacia el banco óptico hacia la rejilla del espectrómetro. La luz entra en el espectrómetro, pasa a través del conector SMA, la rendija, y filtro, entonces se refleja en el espejo colimador dentro de la rejilla [1].
- 5. Rejilla:** La luz Difractada del espejo colimador y directamente difractada por el espejo de enfoque. 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 [1].
- 6. Espejo de enfocamiento** Recibe la luz reflejada desde la rejilla y se enfoca la luz en el detector CCD o la lente de colección L2 (dependiendo de la configuración del espectrómetro) [1].
- 7. Área del detector con enfriamiento:** Provee el 90% de eficiencia cuántica y la caja de píxeles en una columna vertical permite adquirir la luz en su totalidad a la altura de la abertura de la imagen del espectrómetro. Esto mejora la luz recogida y la señal-ruido significativamente [1].
- 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 [1].

## **Las características del espectrómetro QE6500:**

- El rango espectral es de 780 a 1000 nm
- La resolución óptica es de aproximadamente 0.14 a 7.7 nm FWHM ( $\sim 6 \text{ cm}^{-1}$ )
- Tiempo de integración es de 8 ms a 15 min

### **5.3 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 [2].

#### **5.3.1 Fondo de la fibra**

Las fibras ópticas de sílice están disponibles para su transmisión en las regiones IR cercano y visible del espectro. En el experimento de Raman, es una fuente láser brillante a través de un cable de fibra óptica.

En el extremo opuesto de la fibra, la línea láser se transmite con poca atenuación de la fibra, sin embargo la salida de luz también contiene bandas Raman derivadas del propio material de fibra de sílice. Después de la excitación de la muestra, la gran mayoría de la intensidad de la luz se esparce en la misma frecuencia que el haz incidente del láser (línea de Rayleigh). Después de su colección y posterior transmisión a través de una segunda fibra de sílice de las bandas Raman son significativamente más intensas que las bandas derivadas de una muestra típica.

Otros usan la sustracción espectral después de la medición, con lo anterior no hay manera de eliminar las bandas que interfieren o el fondo provocado por la fibra de los datos resultantes. Dependiendo de la intensidad esparcida de la muestra y la longitud de la fibra óptica, el fondo de sílice puede sobreponer totalmente el espectro resultante.

El filtrado es un proceso donde dos bandas deben ser filtradas de ambas fibras, lo que se logra mediante la incorporación de diversos filtros entre las fibras excitación y colección. Esta óptica permite a la línea láser a excitar a la muestra de manera eficiente y eliminar la línea de Rayleigh antes que la luz esparcida sea transmitida a través de la fibra de colección [2].

### **5.3.2 Diseño con filtraje eficiente**

El RamanProbe™ se basa en un diseño patentado (EE.UU. Patent 5, 112127) que optimiza el rendimiento óptico de fibra. Esta se trata de fibra de dos sondas, una fibra se utiliza para la excitación y otro para la colección. La superposición entre los dos extremos de fibra se ha optimizado mediante el uso de una lente de enfoque, por lo tanto se tiene la luz del láser y la colección de la radiación esparcida. La trayectoria del haz se muestra en la figura 5.2. En el extremo de la fibra de excitación, se utiliza una lente colimadora de la luz láser. Un filtro pasa banda de paso elimina las bandas Raman de sílice, sólo se transmite pura luz láser. El filtro dicróico transmite también a la línea láser se centra en otro objetivo en la muestra. La misma lente recoge la luz que es esparcida  $180^\circ$  desde la dirección de la luz láser (la geometría de retroesparcimiento) [2].

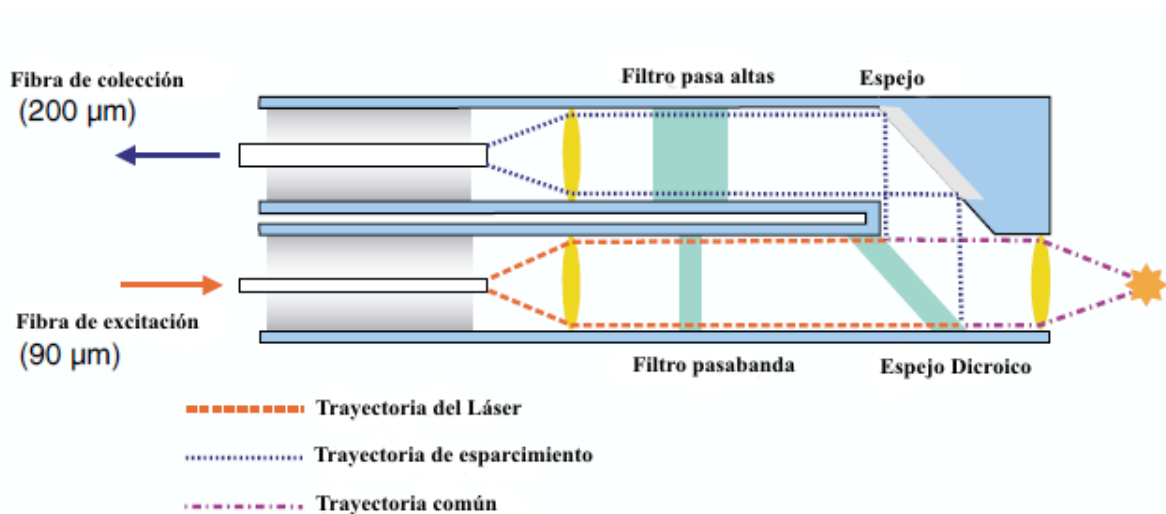
La señal de colección es entonces reflejada por el filtro dicróico a través del filtro pasa altas montaje que transmite sólo la luz difusa de Stokes.



Este último filtro atenúa la banda de Rayleigh en un factor de 108, lo que impide la observación de las bandas de Raman de sílice que se plantean en la recopilación de fibra.

Por último, otra lente se utiliza para enfocar la luz, ahora consiste de bandas solo de la muestra en la fibra de salida.

Todas esta ópticas están contenidas en 0.5 "(25,4 mm) de diámetro de acero inoxidable. El filtrado en la punta de prueba Raman es tan eficiente que el rango espectral completo, incluida la línea láser, se puede visualizar en un CCD sin filtrado adicional en el espectrómetro. Los componentes ópticos son capaces de soportar temperaturas elevadas (aproximadamente 200 °C) y, con la adición de una extensión de tubo, se pueden mover más lejos de la muestra en aplicaciones de mayor temperatura. En la figura 5.2 se muestra el diagrama de la punta de prueba.



### 5.2 Diagrama de la punta de prueba

La distancia focal es de 7.5 mm y está diseñada para un laser de 785 nm. Sus dimensiones son de 114 x 38 x 12.5 (mm).

## 5.4 Láser 785 nm

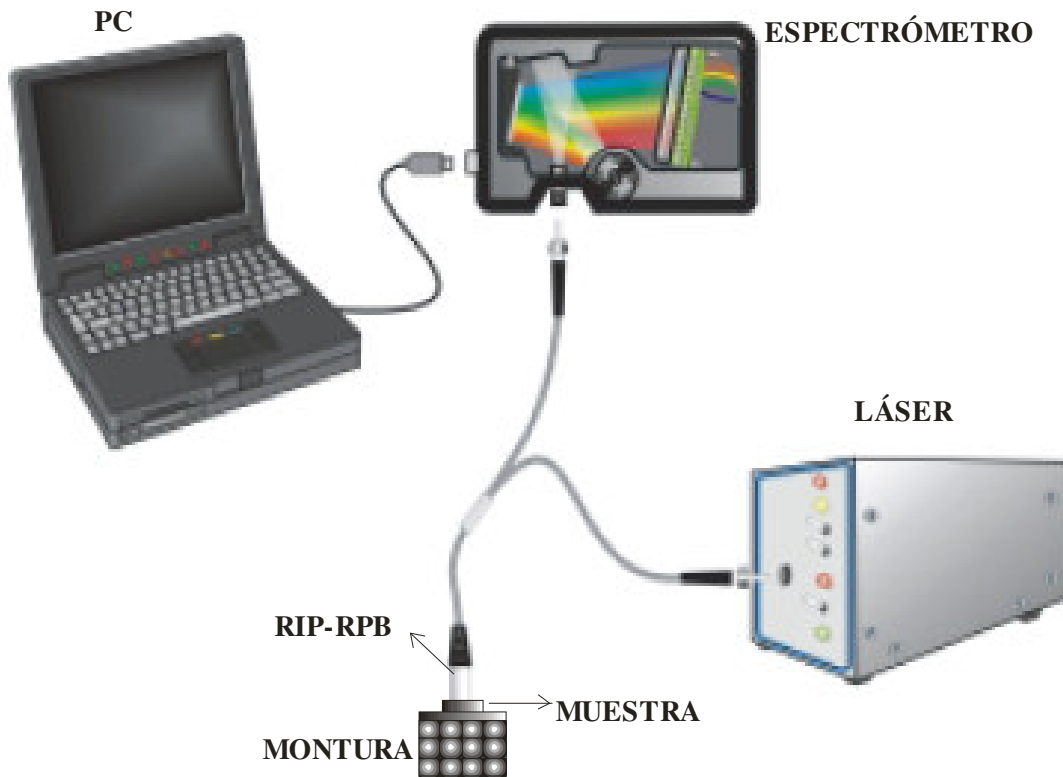
La Serie de láseres BRM tiene una estrecha anchura de línea espectral, alta potencia láser, desarrollado específicamente para la aplicación de la espectroscopía Raman.. Es compacta y robusta, apta para diversas aplicaciones industriales, con un láser integrado conductor, con enfriador termoeléctrico y de alto brillo controlador de fibra de acoplamiento [3].

Las características del láser son:

- Tiempo de calentamiento menor a 15 minutos
- El tiempo de vida del láser es de 10,000 horas
- Potencia de salida menor a 500 mW
- El ancho de la línea espectral es de 0.2 nm
- Conector SMA 905

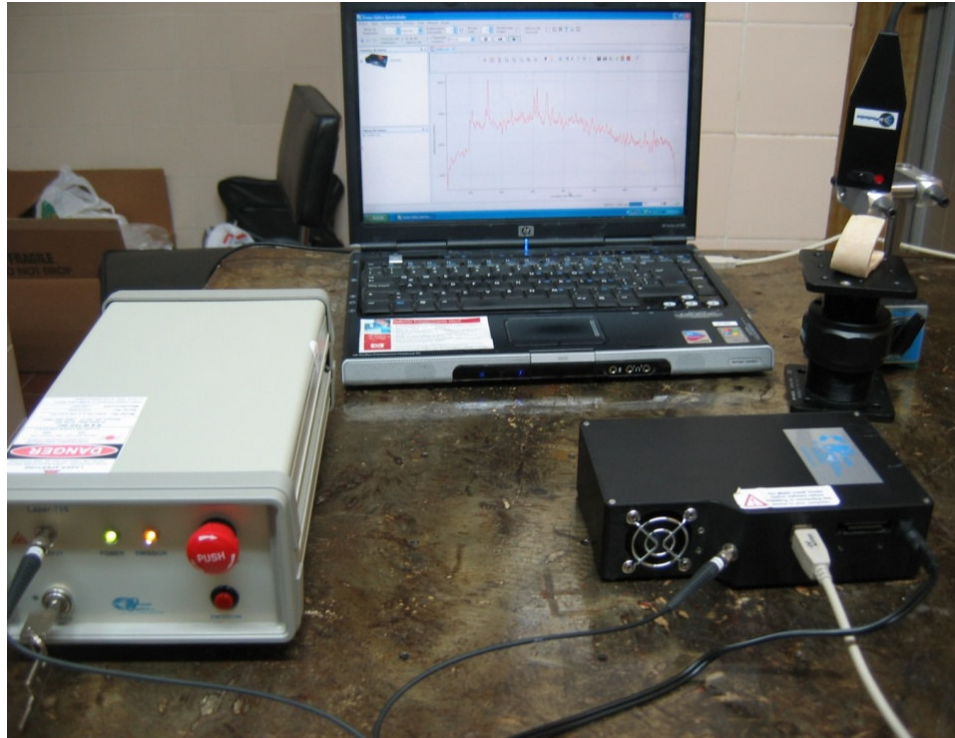
## 5.5 Arreglo experimental

En el arreglo experimental se ocupa un láser como fuente de excitación de 785 nm. Se tiene una punta de prueba de 2 fibras, una de colección que va conectada al espectrómetro y la otra para la fuente de excitación respectivamente. El arreglo está configurado de la forma que se muestra en la figura 5.3. En la distancia focal de la punta de prueba se obtiene la mejor señal. Además de una montura que tiene un desplazamiento de arriba- abajo para obtener la distancia del punto focal de la punta de prueba. La PC está conectada al espectrómetro mediante USB. El software que se ocupa es el spectra Suite<sup>®</sup> desarrollado por Ocean Optics.



### 5.3 Arreglo experimental

La figura 5.4 muestra el arreglo experimental hecho en el laboratorio. En ella se puede ver el espectrómetro, el laser a 785 nm, la punta de prueba, la montura para subir y bajar la muestra y el hueso de res del cual se muestra el espectro en la pantalla de la computadora



5.4 Arreglo experimental en el laboratorio

## Conclusiones

El arreglo experimental que tenemos es fácil de montar y además estable, para las pruebas que se han hecho es muy eficaz. En conjunto las partes mostradas en este arreglo experimental lo hacen movable para tomar muestras de las partes deseadas en este trabajo.

## Bibliografía

1. *QE65000 spectrometer ocean optics datasheet*, [www.oceanoptics.com](http://www.oceanoptics.com).
2. *Background filtering in fiber optic Raman sampling probes*, technical notes # 13. [www.inphotonics.com](http://www.inphotonics.com).
3. *Bwtek clean laze datasheet*, [www.bwtek.com](http://www.bwtek.com).

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the left and right sides, framing the chapter title.

# **CAPÍTULO 6: RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

En esta tesis se hicieron diferentes experimentos los cuales son descritos en este capítulo. Además se incluye el método de procesamiento que se empleó para procesar los espectros que se presentan en este capítulo. En la primera sección se describe el método de procesamiento usando wavelets. En la segunda sección se muestran resultados obtenidos al hacer pruebas en fármacos, las muestras fueron aspirina, albendazol, paracetamol, ranitidina y diiodo. En la tercera sección se describe las pruebas realizadas a muestras líquidas, a estas fueron el colágeno, acetona, alcohol 96, alcohol isopropílico, glucosa líquida y lipofundin. Además se obtuvieron espectros de combinaciones entre ellos. En la cuarta sección se muestran espectros obtenidos en muestras de cerdo y pollo. Aquí se presentan hueso, grasa y piel de cerdo. Todos los espectros anteriores como preámbulo de los espectros que se muestran en la sección de la piel humana. En la última sección se presentan los espectros obtenidos en piel, estos espectros son la mayoría de los dedos, la palma y el antebrazo. Las asignaciones que se dan de las líneas espectrales fueron conseguidas en la literatura [1,2].

### 6.1 Método de procesamiento

La espectroscopía Raman da una dependencia de intensidad de la luz esparcida inelásticamente con el cambio Raman  $\Delta (1/\lambda)$  de los fotones después de su interacción con el material. El espectro resultante puede ser tomado como la señal modulada  $f(x)$ , donde el eje  $x$  es el cambio Raman. El algoritmo de wavelets divide la señal  $f(x)$  en diferentes

componentes de frecuencias. La transformada de Fourier, tradicionalmente utilizada en procesamiento de señales, hace lo mismo, pero no puede conservar la información de la señal en forma espacial. En contraste la descomposición wavelets usa funciones espacialmente localizadas con valor promedio cero (llamadas wavelets, pequeñas ondas y hace posible tener ambas informaciones en frecuencia y espacio. Básicamente, la señal  $f(x)$  es representada en términos de la suma de wavelets elementales.

En este trabajo se tenía el problema de tener espectros con mucho ruido de disparo, por lo tanto, se tuvo la necesidad de evaluar wavelets de tipo Haar, Daubechies y symlets. Comprobando que se eliminaba mejor el ruido con las wavelets symlets, por tal motivo se emplearon las wavelets de este tipo. Al evaluar las symlets se probaron diferentes tipos de esta familia, la 2, 4 y 6. Las de tipo 6 mostraron mejores resultados para eliminar el ruido de disparo de los espectros Raman que se obtuvieron. Además se hizo la evaluación de distintos tipos de niveles en las symlets, consiguiendo mejores resultados en las symlets de nivel 5, cuando se evaluó mayores niveles se tenía pérdida de información, por lo cual no se empleo mayor nivel. En resumen se ocupó una symlet 6 y un nivel 5, debido a que esto brinda una buena eliminación del ruido de disparo y evita la pérdida de información del espectro.

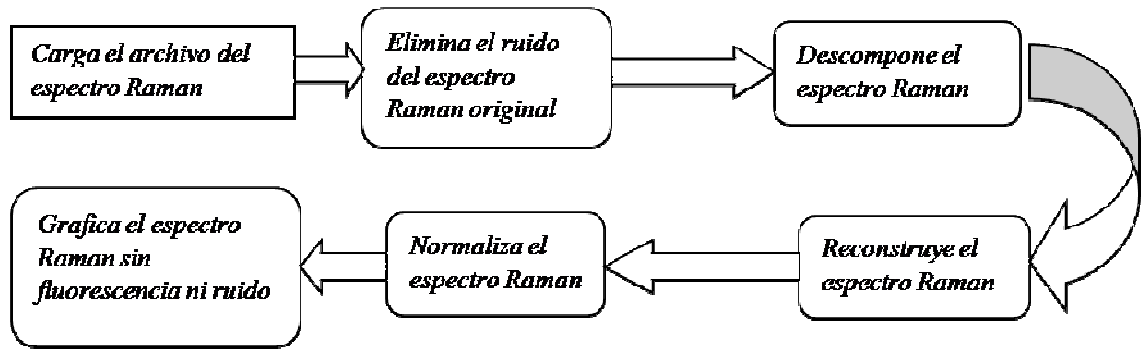
Al utilizar las symlets se eliminó el ruido ahora solo queda remover la fluorescencia de fondo, para resaltar las líneas espectrales que se tiene en el espectro. Para lograr este objetivo se obtiene la representación jerárquica de los datos permitiendo un análisis de multi resolución conocido como la transformada wavelets discreta (DWT *por sus siglas en ingles*), en la cual los detalles o fluctuaciones de diferentes niveles de resolución son representados por la superposición de wavelets con dilatación intercambiable.

En este caso, la señal generada por el espectrómetro está constituida por 1044 puntos igualmente espaciados. Las wavelets biortogonales basadas en las funciones B-spline fueron empleadas para asegurar la simetría y precisión en la reconstrucción de la señal [3]. Los datos fueron procesados en MATLAB 2006a<sup>®</sup>, usando la herramienta wavelet. La descomposición de la señal fue hecha a un nivel  $n=8$  usando wavelets biortogonales Bior 6.8.

La señal puede ser reconstruida invirtiendo el proceso, esto es conocido como transformada wavelet discreta inversa (*IDWT por sus siglas en ingles*). Si la última componente de aproximación no es incluida en el proceso de IDWT el suavizado de la señal es eliminado. En el caso del espectro Raman, esta señal de fondo es principalmente causado por la difusión de la luz y el proceso de fluorescencia [4]. Removiendo las componentes altas eliminamos el ruido residual que se tiene al hacer el análisis de multiresolución y al eliminar las componentes de bajas frecuencias se sustrae la fluorescencia de fondo. Con lo cual se logra obtener un espectro libre de ruido y fondo de fluorescencia. Con esto se llega a la conclusión que la información principal del espectro Raman se encuentra en los coeficientes centrales.

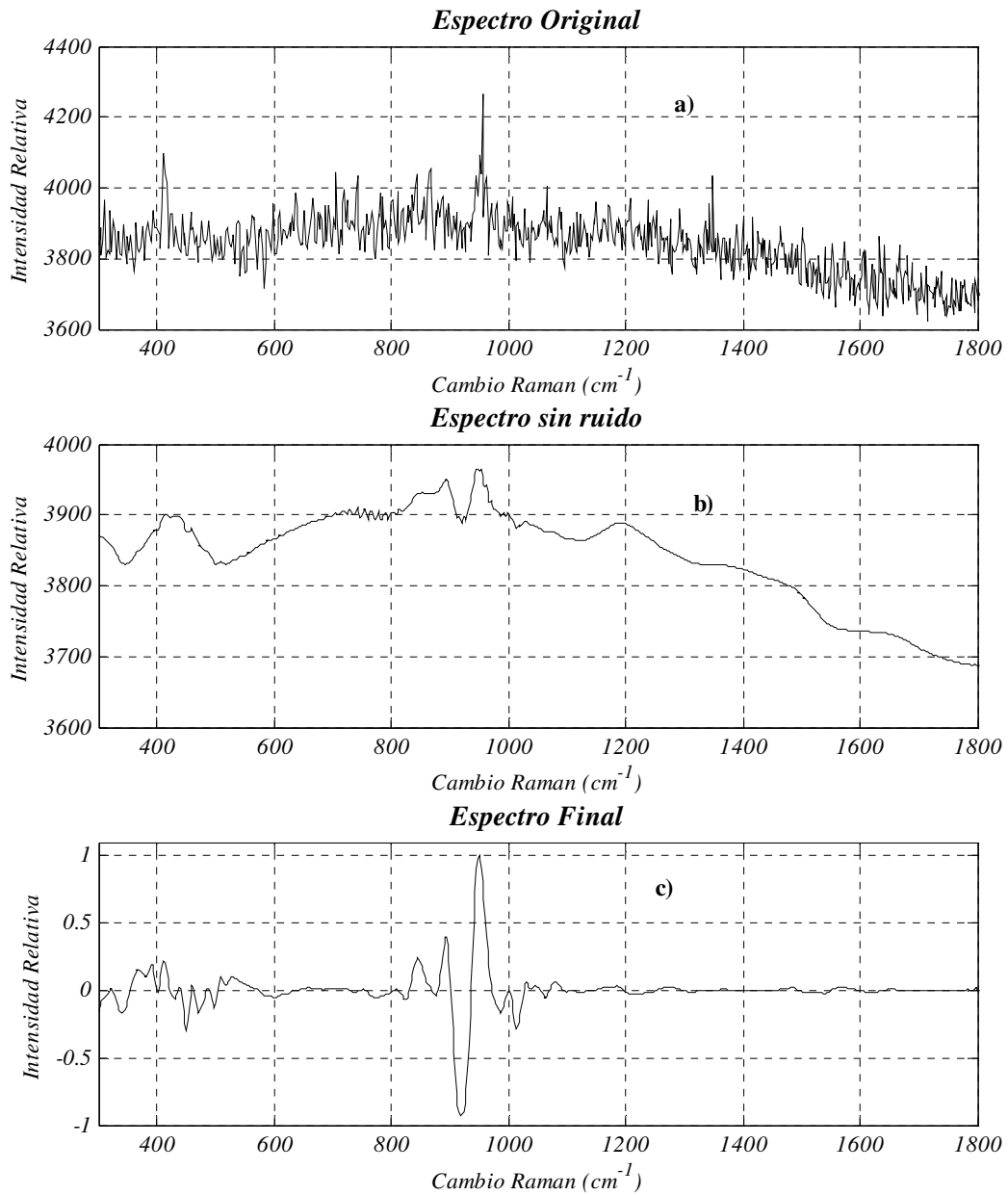
En la figura 6.1 se muestra un diagrama a bloques de las diferentes etapas que se requieren para realizar el proceso empleado. En la primera etapa carga los archivos con los datos. En la segunda etapa se elimina el ruido del espectro Raman obtenido del espectrómetro. La tercera etapa consiste en descomponer y reconstruir el espectro que se tiene sin ruido. Finalmente se normaliza el espectro y se grafica el espectro libre de fluorescencia y ruido.





6.1 Diagrama a bloques del programa de procesamiento

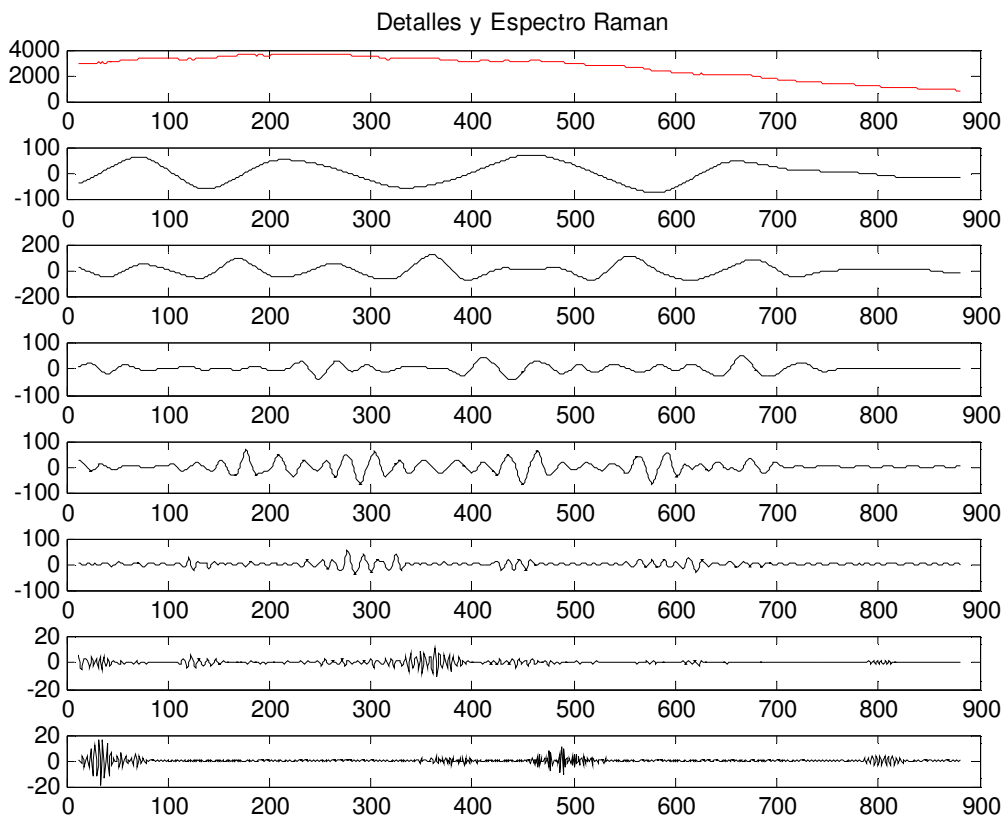
El proceso que se muestra en la figura 6.1 se representa mediante imágenes de los espectros raman en la figura 6.2, mostrando las diferentes etapas de procesamiento de los espectros Raman, a) representa el espectro sin ningún tipo de procesamiento, en el inciso b) se muestra el espectro después de aplicarle una symlet 6 y un nivel de 5, c) se muestra el espectro después de haberle aplicado una wavelet biortogonal 6.8 y un nivel 8. En esta figura se muestra el espectro obtenido de un huesos de res, en la figura 6.2 c) se resalta la eficacia del método de procesamiento combinando las wavelets symlets y las biortogonales. Las líneas espectrales se logran ver sin ninguna confusión, por tal motivo, el método que se ha desarrollado cumple con las expectativas planteadas. Las ventajas que proporciona este método es que se adapta a todos los espectros que se evalúen, no hay necesidad de recalcular nada como sucede en otros métodos, como es el caso de los de tipo polinómicos. Los resultados obtenidos con este método se ha reportado en un artículo [19].



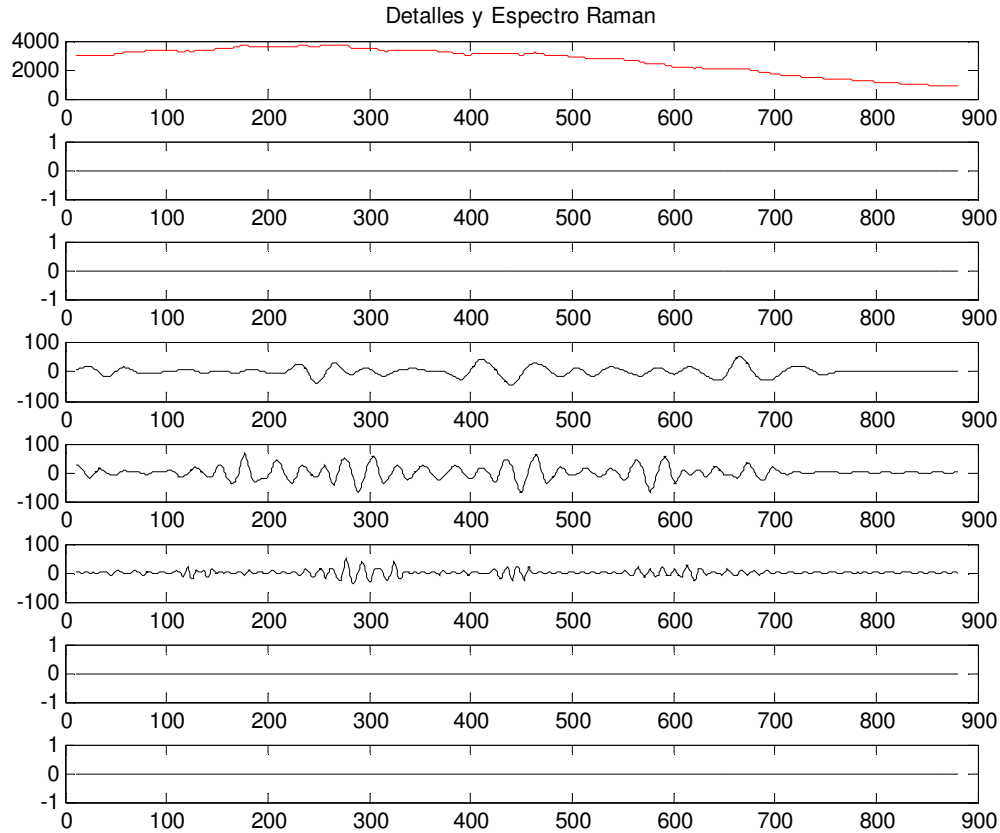
6.2 Diferentes etapas de procesamiento del espectro Raman. a) datos sin procesar, b) señal sin ruido, c) usando las wavelets biortogonales

En la figura 6.3 y 6.4 se muestran el espectro Raman y su descomposición en detalle. En esta figura se puede ver las diferentes frecuencias del espectro. Las frecuencias altas representan ruido de disparo y las de baja frecuencia el ruido ocasionado por la fluorescencia. En estas figuras se muestran donde está la información principal de un espectro Raman. Esta

información se encuentra localizada en los coeficientes centrales. Por lo tanto, eliminamos los coeficientes de altas frecuencias y los de baja frecuencia obteniendo un espectro libre de fondo de fluorescencia y ruido de disparo.



**6.3 Detalles y espectro Raman.**



**6.4 Detalles y espectro Raman. En esta figura se eliminan las componentes de alta y baja frecuencia solo dejando las componentes centrales**

## **6.1 Experimentos con Fármacos**

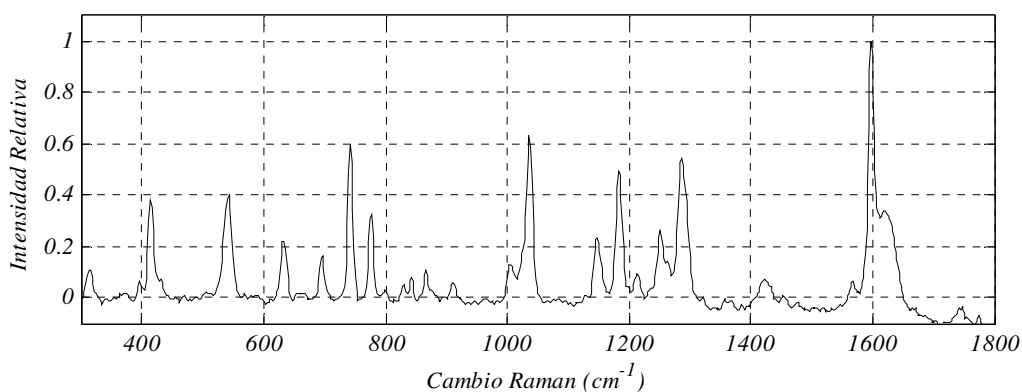
Los fármacos son compuestos que al hacerle incidir luz, este se esparce con mucha facilidad. Debido a esto, se pueden obtener espectros con muchas líneas espectrales poco tiempo de integración y baja potencia. Para estos experimentos ocupamos la máxima potencia del láser, la cual es de 500 mW a la salida, antes de conectarse con la punta de prueba. La potencia que tenemos al final de la punta de prueba es de tan solo 250 mW. Con esta potencia obtuvimos los espectros de los fármacos. Debido a que con alta potencia se tiene bien definidos y sin ruido. Se ocupó un tiempo de integración de 10 segundos para evitar la saturación del CCD. Esta potencia y tiempo de integración se ocupó para todos los

espectros de fármacos obtenidos y mostrados en esta sección. Los resultados que se obtuvieron en los fármacos se reportaron [20].

### 6.1.1 Aspirina

La aspirina fue uno de los fármacos utilizados para las pruebas iniciales en esta tesis, la definición es la siguiente:

El ácido acetilsalicílico o AAS ( $C_9H_8O_4$ ) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de la familia de los salicilatos. La reacción química de la síntesis de la aspirina se considera una esterificación. El ácido salicílico es tratado con anhídrido acético un compuesto derivado de un ácido, lo que causa que el grupo alcohol del salicilato se torne en un grupo acetilo ( $SALICILATO-OH \rightarrow SALICILATO-OCOCH_3$ ). Este proceso produce aspirina y ácido acético, el cual se considera un subproducto de la reacción [5]. En la figura 6.5 se muestra el espectro raman obtenido, este espectro coincide perfectamente con el reportado en la literatura [6].

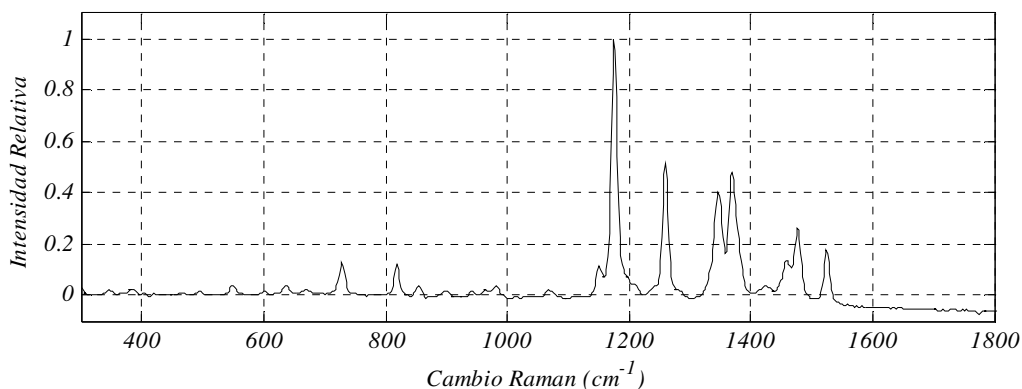


6.5 Espectro Raman de la aspirina

### 6.1.2 Albendazol

Albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro para administración oral. El nombre químico es metil-5-(propiltio)-2-bencimidazolcarbamato. Su fórmula molecular es  $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ . Su peso molecular es 265.34. Albendazol es un polvo blanco a blanquecino. Es soluble en dimetilsulfóxido, ácidos fuertes y bases fuertes. Ligeramente soluble en metanol, cloroformo, acetato de etilo y acetonitrilo [7].

En la figura 6.6 se muestra el espectro Raman del albendazol, el cual es muy fácil de obtener y se pueden identificar fácilmente las líneas espectrales que se muestra en la figura 6.6.



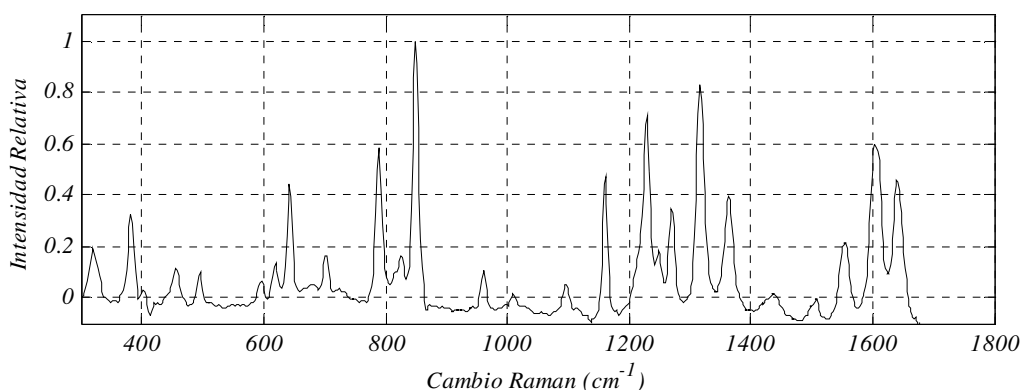
6.6 Espectro Raman del albendazol

### 6.1.3 Paracetamol

El **paracetamol** (DCI) o **acetaminofén** es un fármaco con propiedades analgésicas, sin propiedades antiinflamatorias clínicamente significativas [8].

Los nombres *paracetamol* y *acetaminofén* pertenecen a la historia de este compuesto y provienen de la nomenclatura tradicional de la química orgánica, N-**acetil**-para-**aminofenol** y **para-acetil-aminofenol**.

En la figura 6.7 se muestra el espectro Raman del paracetamol, en el cual se puede observar la variedad de líneas espectrales que este muestra, siendo sus líneas características entre 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$  [9].



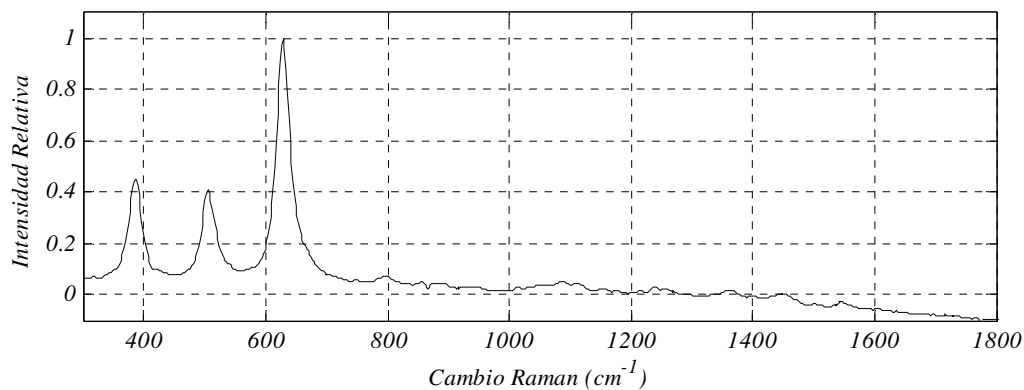
6.7 Espectro Raman del paracetamol

### 6.1.4 Ranitidina

La ranitidina fue otra de las píldoras de las cuales se obtuvo su espectro Raman, a continuación se muestra su definición.

La **ranitidina** es un antagonista H<sub>2</sub>, uno de los receptores de la histamina, que inhibe la producción de ácido estomacal, comúnmente usado en el tratamiento de la enfermedad de úlcera péptica (PUD) y en la enfermedad del reflujo gastroesofágico (GERD) [10].

En la figura 6.8 se muestra el espectro Raman de la ranitidina, en la cual se puede observar sus 3 líneas espectrales características.



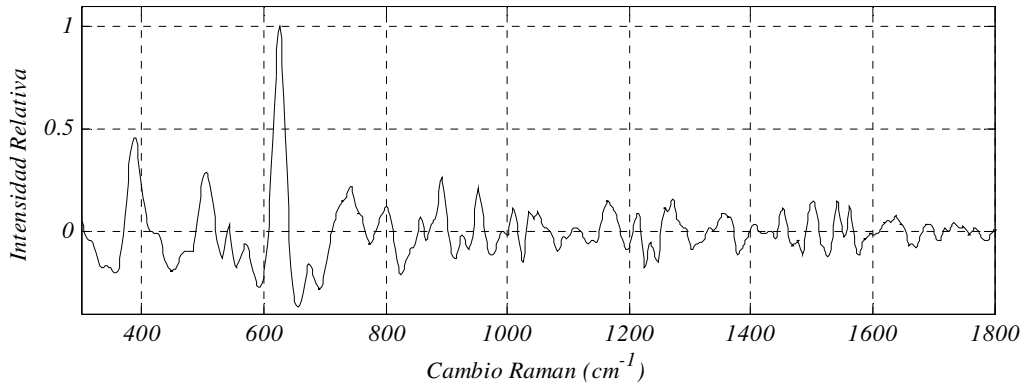
6.8 Espectro Raman de la ranitidina

### 6.1.5 Diyodo

El diyodo fue otra de las píldoras que caracterizamos su espectro. El **yodo molecular** o **diyodo** (generalmente llamado sólo **yodo** o **iodo**) es un compuesto químico diatómico, formado por dos átomos de yodo y de fórmula  $I_2$ . En condiciones normales es un sólido negro y lustroso con ligero brillo metálico, pero volatiliza fácilmente dando un gas de color violeta y olor irritante [11].

En este espectro aplicamos el método de procesamiento propuesto en esta tesis. En la figura 6.9 se muestra el espectro Raman del diyodo.





6.9 Espectro Raman del diyodo

## 6.2 Experimentos con Líquidos

Otro de los experimentos que se realizaron fueron con los líquidos, como es el colágeno, el alcohol 96, isopropílico, acetona y glucosa. Estos experimentos nos sirvieron para poder hacer mezclas e identificar las líneas espectrales características de cada uno de los líquidos que se obtuvo el espectro Raman. Para los líquidos disminuimos la potencia y los tiempos de integración, debido a la fácil saturación que se obtenía. Para los espectros presentados se obtuvieron con un tiempo de integración de 20 segundos y una potencia de 90 mW. Los resultados que se obtuvieron se reportaron [21]

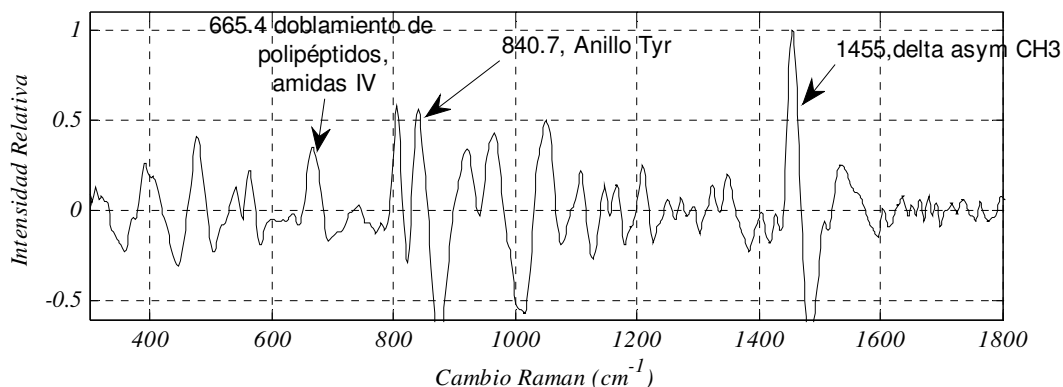
### 6.2.1 Colágeno

El colágeno se vende comercialmente, es una sustancia que sirve para humectar la piel, una definición se presenta seguidamente.

El **colágeno** es una molécula proteica que forma fibras, las fibras colágenas. Estas se encuentran en todos los organismos pluricelulares. Son secretadas por las células del tejido conjuntivo como los fibroblastos, así como por otros tipos celulares. Es el componente más

abundante de la piel y de los huesos, cubriendo un 25% de la masa total de proteínas en los mamíferos [12].

En la figura 6.10 se muestra el espectro Raman del colágeno. Este espectro fue procesado usando wavelets.



6.10 Espectro Raman del colágeno

En la tabla 1 se muestra las líneas espectrales principales del colágeno y alguna de las asignaciones para estas líneas.

Tabla 1 Líneas espectrales del colágeno

Línea espectral (cm-1)	Asignación
665.4	<i>Doblamiento Polipéptidos amida IV</i>
840.7	<i>Anillo Tyr</i>
1455	<i>δ asym CH<sub>3</sub></i>

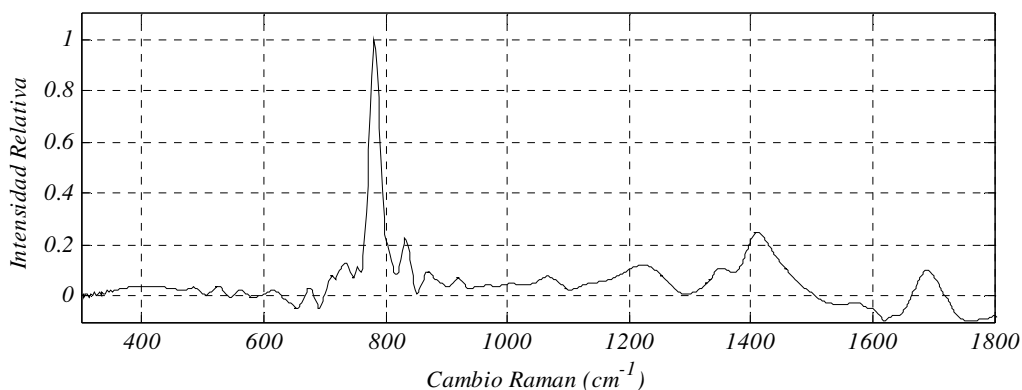
## 6.2.2 Acetona

La acetona es muy utilizada comercialmente para remover el esmalte de uñas en este caso se compro una de tipo comercial. Se presenta una definición de la acetona.

La **acetona** o **propanona** es un compuesto químico de fórmula química CH<sub>3</sub> (CO)CH<sub>3</sub> del grupo de las cetonas que se encuentra naturalmente en el medio ambiente. Es un líquido

incolore de olor característico. Se evapora fácilmente, es inflamable y es soluble en agua. La acetona sintetizada se usa en la fabricación de plásticos, fibras, medicamentos y otros productos químicos, así como disolvente de otras sustancias químicas [13].

Para el espectro Raman de la acetona solo fue necesario sustraerle el promedio al espectro. La figura 6.11 se muestra el espectro Raman de la acetona [14].



6.11 Espectro Raman de la acetona

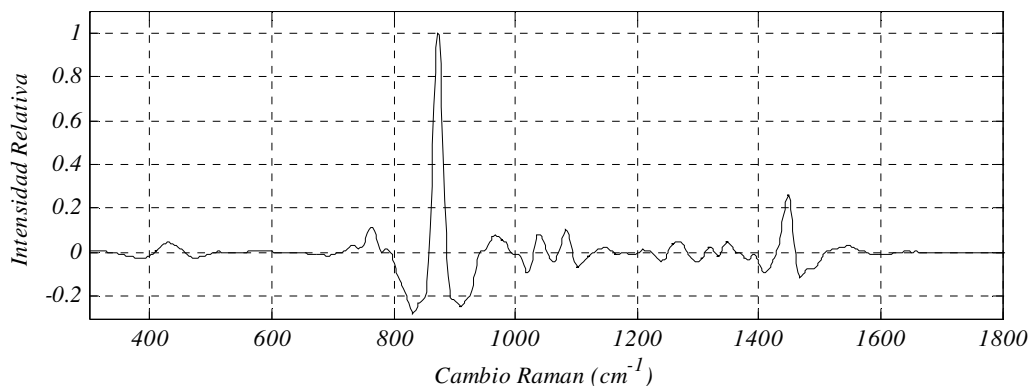
La tabla 2 muestra las líneas espectrales principales de la acetona y alguna de sus asignaciones.

Tabla 2 Líneas espectrales de la acetona

Línea espectral (cm-1)	Asignación
781.8	<i>Trp ring breathing</i>
1228	
1410	<i>Ceramidas 3</i>
1688	

### 6.2.3 Alcohol 96

En la figura 6.12 se muestra el espectro Raman del alcohol. Este espectro se muestra después de ser procesado con wavelets.



6.12 Espectro Raman del Alcohol 96

En la tabla 3 se muestra las líneas espectrales y algunas de sus asignaciones

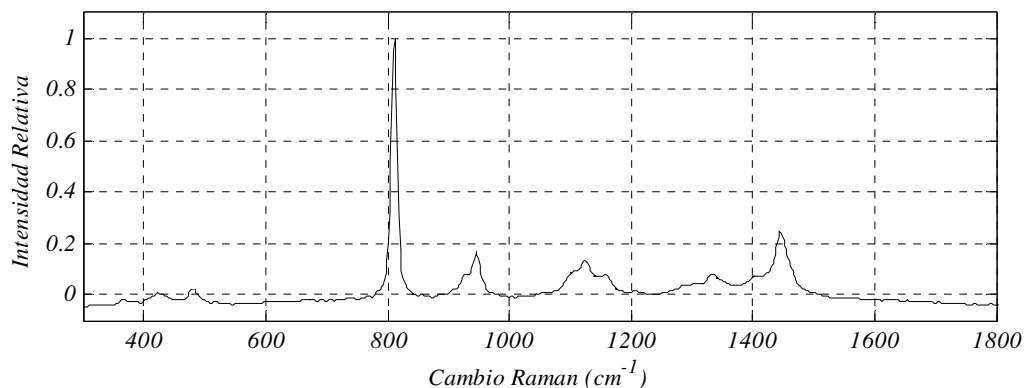
Tabla 3 Líneas espectrales del alcohol 96

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
873	$\rho CH_2$
1039	$\nu C-C$ $\nu C-O$ $\nu S-O$
1083	<i>Gauche conformation</i> <i>Ceramides</i>
1448	$\delta CH$ <i>Doblamiento CH<sub>2</sub>, <math>\delta asym CH_3 sc CH</math></i>

### 6.2.4 Alcohol Isopropílico

Alcohol isopropílico, también llamado isopropanol, 2-propanol, propan-2-ol, es un alcohol incoloro, inflamable, con un olor intenso y muy miscible con el agua. Su fórmula química semidesarrollada es H<sub>3</sub>C-HCOH-CH<sub>3</sub> y es el ejemplo más sencillo de alcohol secundario, donde el carbono del grupo alcohol está unido a otros dos carbonos. Es un isómero del propanol [15].

En la figura 6.13 se muestra el espectro Raman del alcohol. En este espectro solo se le sustrajo el promedio [16].



### 6.13 Espectro Raman del alcohol isopropílico

En la tabla 4 se muestra las líneas espectrales principales y sus asignaciones.

Tabla 4 Líneas espectrales del alcohol isopropílico

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
812.5	$\nu$ C-C
945.3	$\delta$ OH
1125	conformación trans Cerámides
1446	$\delta$ CH Doblamiento $\text{CH}_2$ , $\delta$ asym $\text{CH}_3$ sc CH

## 6.2.5 Glucosa

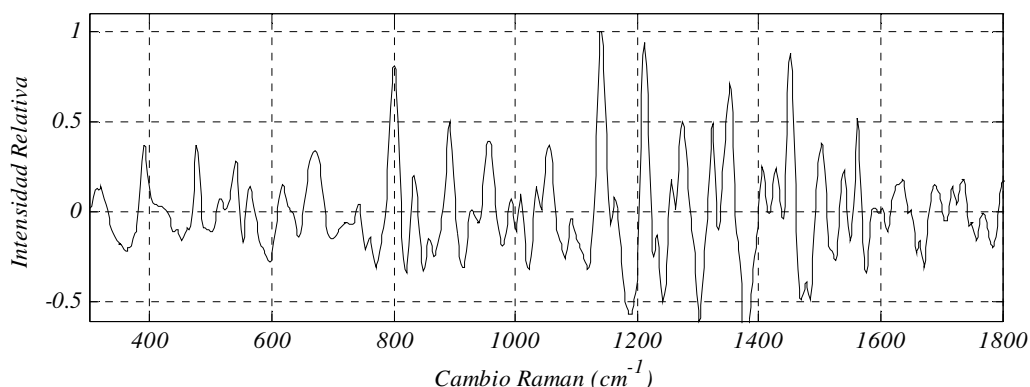
La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.

En su forma D-Glucosa, sufre una ciclación hacia su forma hemiacetalica para dar sus formas furano y pirano (D-glucofuranosa y D-glucopiranososa) que a su vez presentan anómeros alfa y beta. Estos anómeros no presentan diferencias de composición estructural,

pero si diferentes características físicas y químicas. La D-(+)-glucosa es uno de los compuestos más importantes para los seres vivos, incluyendo a seres humanos.

En su forma β-D-glucopiranosica, una molécula de glucosa se une a otra gracias a los -OH de sus carbonos 1-4 para formar celobiosa a través de un enlace β, y al unirse varias de estas moléculas, forman celulosa, su fórmula química C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> [17].

En la figura 6.14 se muestra el espectro Raman de la glucosa. Este espectro es después de procesarlo con wavelets.



6.14 Espectro Raman de la glucosa

En la tabla 5 se muestran las líneas espectrales principales y sus asignaciones

Tabla 5 Líneas espectrales de la glucosa

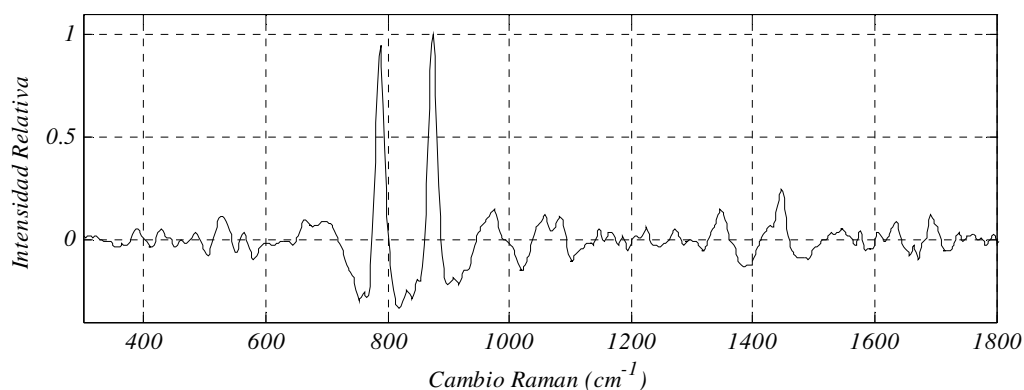
Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
672.2	<i>trans νC-S de cisteina</i>
801.5	<i>ADN</i>
834.2	<i>Metronidazole ring breathing</i>
892.3	<i>ADN</i>
957.9	<i>ν P-O ADN ν C-C(α helix and random coil (estructura secundaria)) Carotenoides Colesterol δ CCH olefinic</i>
1057	<i>Lípidos ν C-O ADN</i>

1141	$\nu$ C-C
1212	$\nu$ C-C <sub>6</sub> -H <sub>5</sub> de Phe, Trp Tyr Hydroxyprolina
1275	Doblamiento en el plano de CH Amida III, globular $\alpha$ helix $\delta$ NH, $\nu$ CN
1325	C=C Guanina $\delta$ CH proteínas
1451	$\delta$ CH proteínas y Lípidos Doblamiento CH <sub>2</sub> , $\delta$ asym CH <sub>3</sub> sc CH Alanina
1540	C=C $\delta$ N-H

### 6.2.6 Alcohol y Acetona

Se hizo mezclas de diferentes líquidos para probar que también se puede ocupar la espectroscopía Raman como sensor.

Al mezclar alcohol y acetona se puede identificar las líneas características de los líquidos mencionados. En la figura 6.15 se muestra el espectro obtenido. La línea espectral que se encuentra a  $788\text{ cm}^{-1}$  pertenece a la acetona y la localizada a  $875\text{ cm}^{-1}$  pertenece al alcohol.



6.15 Espectro Raman de alcohol y acetona

En la tabla 6 se muestran sus líneas espectrales y algunas de sus asignaciones

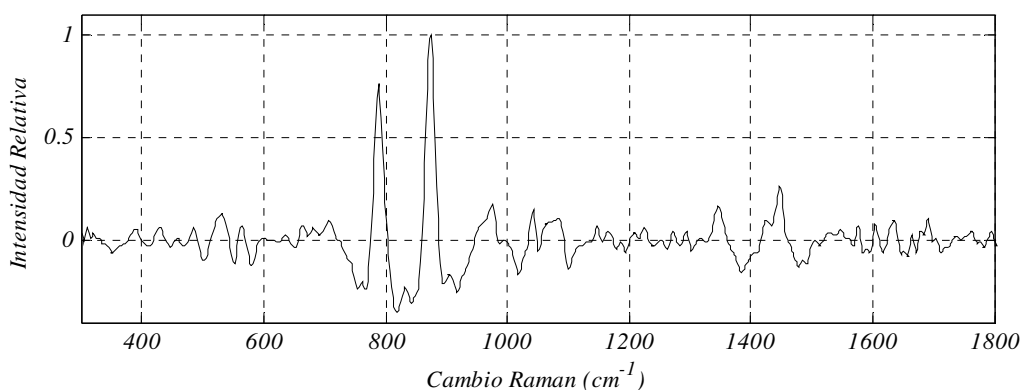
Tabla 6 Líneas espectrales del alcohol y acetona

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
788.4	<i>Trp ring breathing</i>
875.2	$\rho\text{CH}_2$
1059	<i>Lípidos: ceramidas v C-O ADN</i>
1343	<i>v CC, doblamiento CH Phe, Trp Adenina, Guanina</i>
1448	<i><math>\delta</math> CH proteínas y Lípidos Doblamiento <math>\text{CH}_2</math>, <math>\delta</math> asym <math>\text{CH}_3</math> sc CH Alanina</i>

### 6.2.7 Alcohol, glucosa, acetona

Para este espectro se mezcló alcohol 96, glucosa y acetona.

En la figura 6.16 se muestra el espectro Raman. Este espectro fue procesado usando wavelets. Este espectro se logra identificar claramente las líneas principales del alcohol y acetona. Siendo la glucosa su línea espectral la que menos se logra ver en este espectro, debido a que es más débil que las líneas principales de los otros dos compuestos.



6.16 Espectro Raman del alcohol, glucosa y acetona

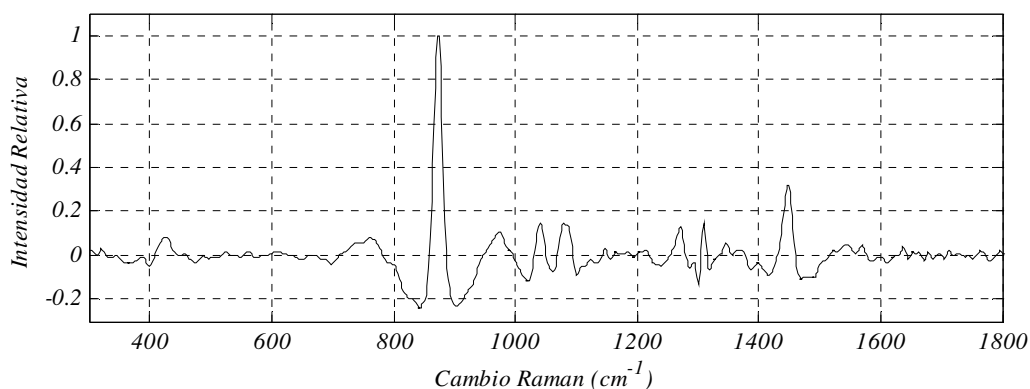


Tabla 7 Líneas espectrales del alcohol, glucosa y acetona

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
788.4	<i>Trp ring breathing</i>
873	<i>ρCH<sub>2</sub></i>
1448	<i>δ CH proteína y Lípidos Doblamiento CH<sub>2</sub>, δ asym CH<sub>3</sub> sc CH Alanina</i>

### 6.2.8 Alcohol y colágeno

Al mezclar alcohol y colágeno se logra apreciar en el espectro la línea espectral del alcohol y la del colágeno traslapada y poco intensa. En la figura 6.17 se muestra el espectro obtenido al hacer esta mezcla.



6.17 Espectro Raman del alcohol y colágeno

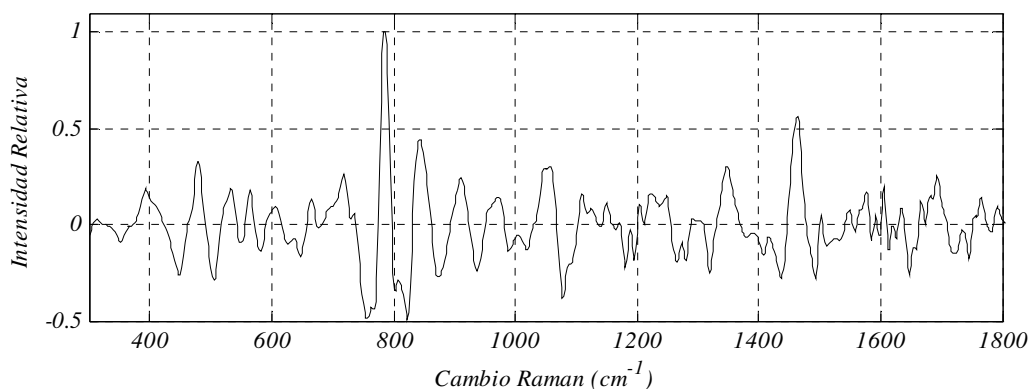
Tabla 8 Líneas espectrales del alcohol y colágeno

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
873	<i>ρCH<sub>2</sub></i>
1041	<i>ν C-C ν C-O ν S-O</i>
1081	<i>Lípidos: cadena de hidrocarbonos, conformación gauche, Ceramidas</i>
1272	<i>Doblamiento en el plano CH Amida III, globular α helix δ NH, ν CN</i>

1310	$\delta (CH)$
1448	$\delta CH$ proteínas y Lípidos Doblamiento $CH_2$ , $\delta asym CH_3$ sc $CH$ Alanina

### 6.2.9 Acetona y Colágeno

Al mezclar acetona y colágeno se obtiene la línea espectral de la acetona bien definida y la del colágeno poco intensas debido a las mezclas. En la figura 6.18 se muestra el espectro obtenido.



6.18 Espectro Raman de la acetona y colágeno

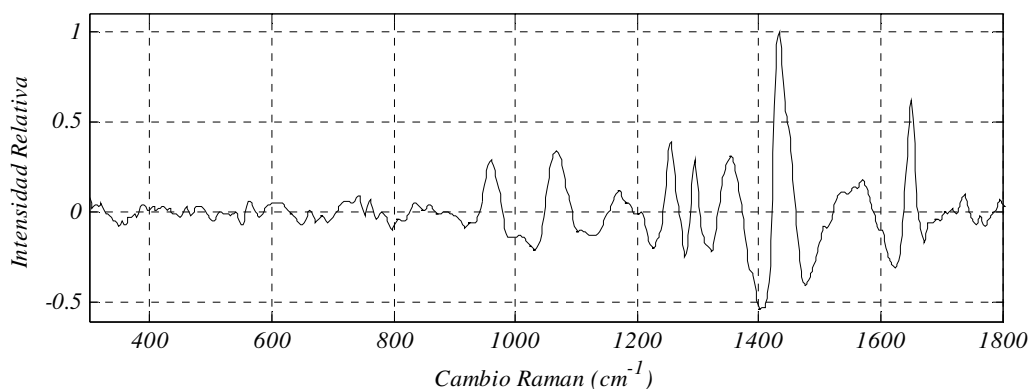
Tabla 9 Líneas espectrales de la acetona y colágeno

Línea espectral ( $cm^{-1}$ )	Asignación
786.3	<i>Trp ring breathing</i>
842.9	<i>Anillo de Tyr</i>
1464	$\delta asym CH_3$ CD0036

### 6.2.10 Lipofundin

El lipofundin es una emulsión de grasa purificada a partir de aceite de soya, emulsificada con isotónicas (2, 5%) de solución de glicerina, que contiene partículas de mantequilla tamaño de 0,1 a 1, 0 micras, que es el tamaño hilomikronov en la sangre humana. El mismo

medicamento se le llama también Intralípido [18]. Con este líquido muy parecido a la leche por su color y textura. Obtuvimos el espectro que se muestra en la figura 6.19. En la tabla 11 se muestran sus principales líneas espectrales obtenidas.



6.19 Espectro Raman del lipofundin

Tabla 10 Líneas espectrales del lipofundin

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
834.2	<i>Metronidazole ring breathing</i>
960	<i>ν C-C (α helix and random coil)</i>
1067	<i>Lípidos, ceramidas ν C-O DNA</i>
1256	<i>Amidas III C-H bend</i>
1294	<i>Amidas III CH<sub>2</sub>, Fosfolípidos</i>
1432	<i>ν COO<sup>-1</sup> sci C-H (CH<sub>2</sub> adjacent to C=O) δ CH<sub>3</sub></i>
1650	<i>Amidas I</i>

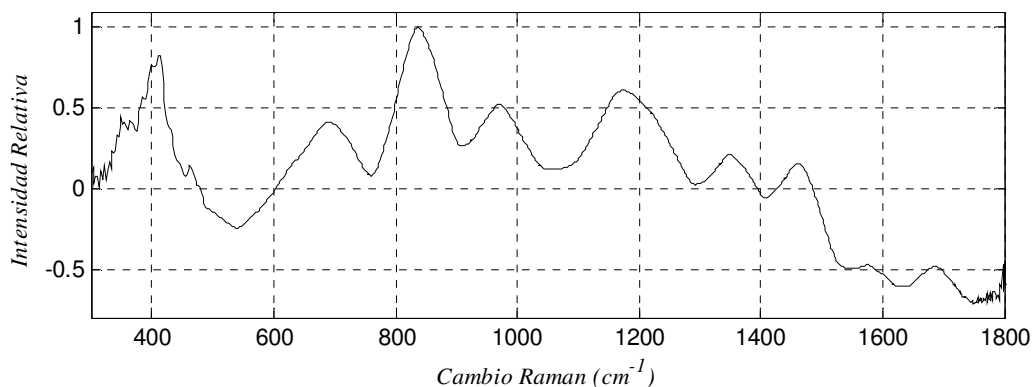
### 6.3 Experimento con carne de cerdo y pollo

En el caso de los experimentos que se hicieron con carne de cerdo y pollo. Se obtuvieron espectros con alta fluorescencia y difíciles de sustraer. Por tal motivo se utilizó para algunos espectros solo se le sustrajo el promedio y otros caso se utilizo el método de

procesamiento descrito al principio del capítulo. Los tiempos de integración y la potencia fue reducida debido a que si se expone mucho tiempo se quema el tejido al que se le iba a obtener el espectro Raman. Los tiempos de integración para obtener lo espectros fue de 30 segundos y una potencia de 50 mW. Las diferencias encontradas con el hueso de pollo, de res y las variaciones en los espectros de grasa fueron reportados [20]

### 6.3.1 Piel de pollo

Para este espectro se utilizo la piel de pollo. En la figura 6.20 se muestra el espectro Raman obtenido. Para este espectro se le quito el ruido mediante wavelets y se le restó el promedio del espectro. En la tabla 12 se muestra las líneas espectrales principales de la piel de pollo.



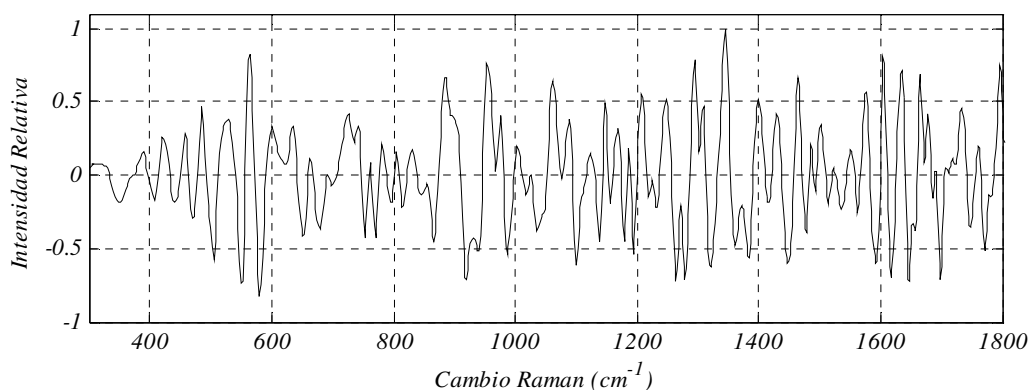
6.20 Espectro Raman de la piel de pollo

Tabla 11 Líneas espectrales de la piel de pollo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
692.6	<i>vC-S Cisteína</i> <i>Doblamiento N-H, amidas V</i>
836.4	<i>Metronidazole ring breathing</i>
970.4	<i>Doblamiento CH=CH</i> <i>v C-O</i>
1175	<i>CH Tyr, Phe</i> <i>sym v C-O-C Lípidos</i>
1462	<i>δ asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>

### 6.3.2 Piel de cerdo

En el caso de la piel de cerdo se obtuvo un espectro con alta cantidad de ruido y con mucha fluorescencia. Por esta razón el método de procesamiento descrito en el capítulo 4 fue utilizado dando como resultado el espectro que se muestra en la figura 6.21. En la tabla 13 se pueden ver las líneas espectrales y algunas de sus asignaciones.



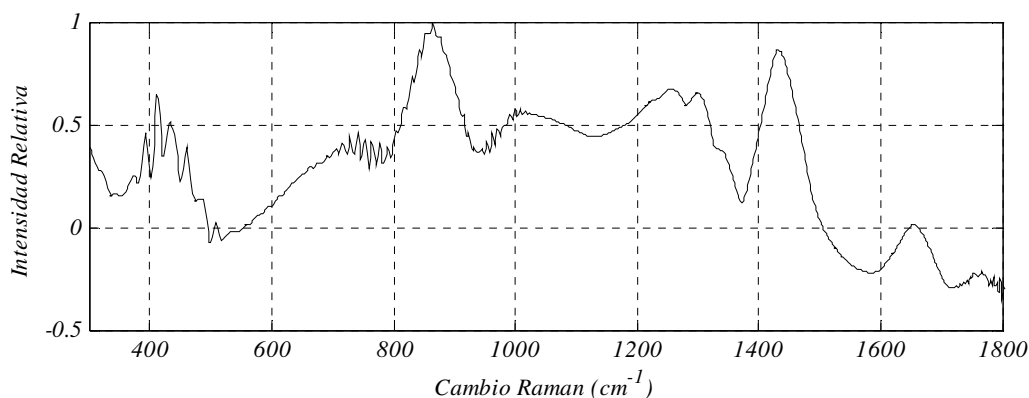
6.21 Espectro Raman de la piel de cerdo

Tabla 12 Líneas espectrales de la piel de cerdo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
883.8	<i>Tryptofan, Colesterol</i>
953.7	<i>ρCH<sub>2</sub> δ OH ρCH<sub>3</sub></i>
1061	<i>Lípidos, ceramidas ν C-O DNA</i>
1294	<i>Amidas III CH<sub>2</sub> fosfolípidos</i>
1347	<i>ν CC, doblamiento CH Phe, Trp Adenina, Guanina</i>
1464	<i>δ asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>
1604	<i>C=C Tyr y Phe</i>
1665	<i>Amidas I</i>

### 6.3.3 Grasa de corazón de pollo

Para este experimento ocupamos un corazón de pollo con recubrimiento de grasa del mismo. En la figura 6.22 se muestra el espectro de la grasa de corazón de pollo. Este espectro Raman solo se le substrajo el promedio. En la tabla 13 se indican las líneas espectrales y sus asignaciones.



6.22 Espectro Raman de la grasa de corazón de pollo

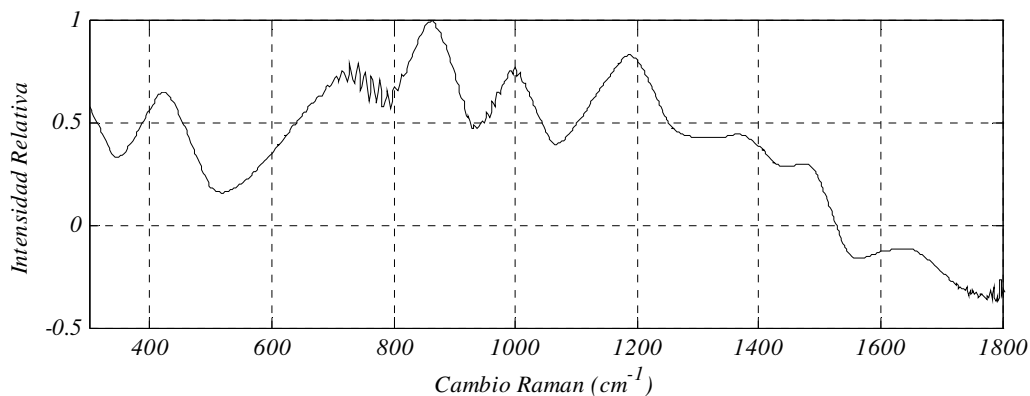
Tabla 13 Líneas espectrales de la grasa de corazón de pollo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
864.5	<i>Prolina, ARN</i>
1254	<i>Amidas III</i> <i>Doblamiento C-H</i>
1300	$\gamma_t CH_2$ <i>Amidas III (fibrillar <math>\alpha</math> helix)</i>
1433	$\nu COO^-$ <i>sci C-H (CH<sub>2</sub> adjacent to C=O)</i> $\delta CH_3$
1655	$\nu(C=C)$

### 6.3.4 Corazón de pollo

Para este espectro se utilizó el corazón de pollo sin grasa. En este espectro se pueden observar algunas diferencias debido a que no tiene grasa que lo recubre. En la figura 6.23 se

muestra el espectro Raman del corazón de pollo y en la tabla 14 se muestran las líneas espectrales y sus asignaciones.



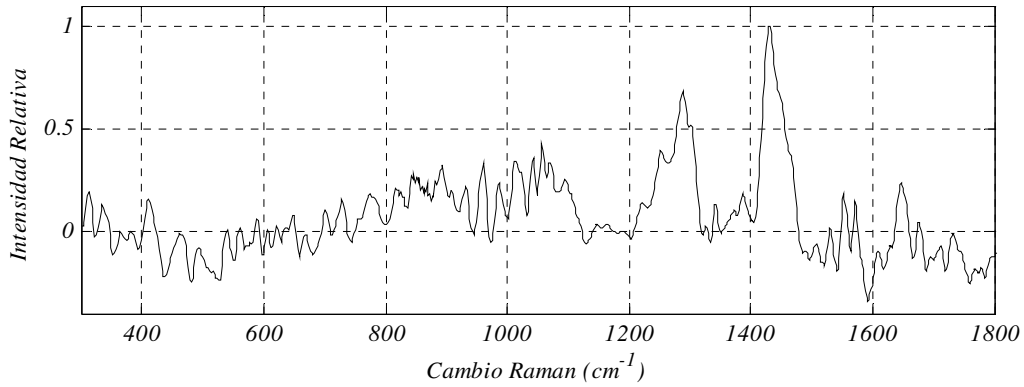
6.23 Espectro Raman del corazón de pollo

Tabla 14 Líneas espectrales del corazón de pollo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
864.5	<i>Prolina, ARN</i>
999.5	<i>Sym. Ring breathing Phe Trp</i>
1189	<i>v C-N metronidazole</i>

### 6.3.5 Grasa de cerdo

La grasa de cerdo fue otro de los experimentos que se llevo a cabo. En la figura 6.24 se muestra el espectro obtenido de la grasa de cerdo. En la tabla 15 se muestran las líneas espectrales principales de este espectro y su asignación.



6.24 Espectro Raman de la grasa de cerdo

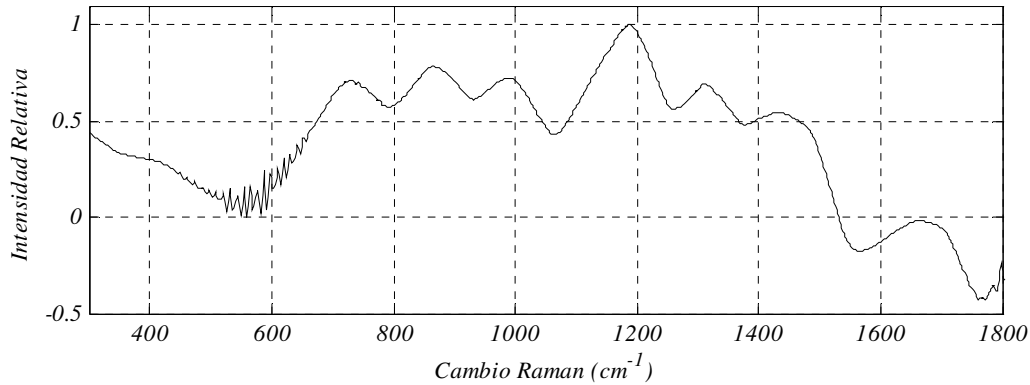
Tabla 15 Líneas espectrales de la grasa de cerdo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
1289	<i>Amidas III fibrillar CH<sub>2</sub>, fosfolípidos</i>
1432	<i>v COO<sup>-1</sup> sci C-H (CH<sub>2</sub> adjacent to C=O) δ CH<sub>3</sub></i>
1552	<i>Trp</i>
1647	<i>Amidas I</i>

### 6.3.6 Grasa de pollo

También se hicieron experimentos con la grasa de pollo, con ella se obtuvo el espectro que se muestra en la figura 6.25. En la tabla 16 se muestran las líneas espectrales principales y sus asignaciones.





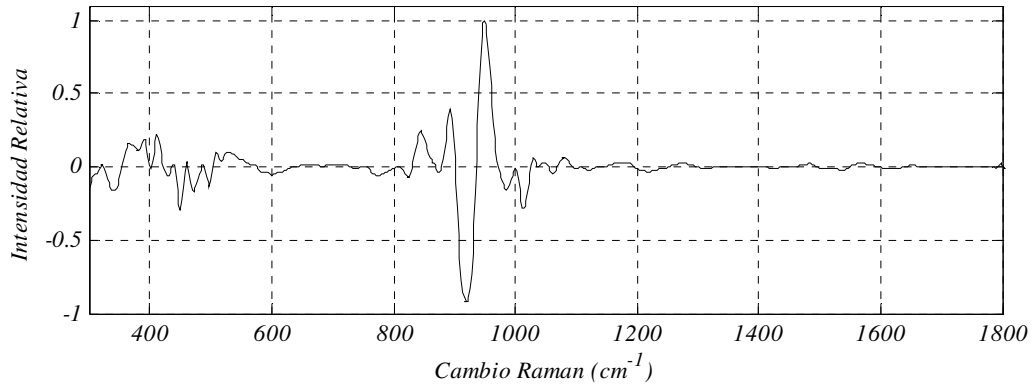
### 6.25 Espectro Raman de la grasa de pollo

Tabla 16 Líneas espectrales de la grasa de pollo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
730.8	$\rho\text{CH}_2$
864.5	<i>Prolina, ARN</i>
991.3	<i>v cycle</i>
1189	<i>v C-N metronidazole</i>
1311	$\delta (\text{CH})$
1437	$\delta \text{CH}$ proteínas y lípidos

### 6.3.7 Hueso res

El hueso de res fue otro de los espectros que se obtuvieron, en este espectro que se muestra en la figura 6.26 se puede ver que se tiene una línea principal característica. Esta es debida a una vibración de calcio que se tiene presente en esa zona. En la tabla 17 se muestran las líneas espectrales principales y sus asignaciones.



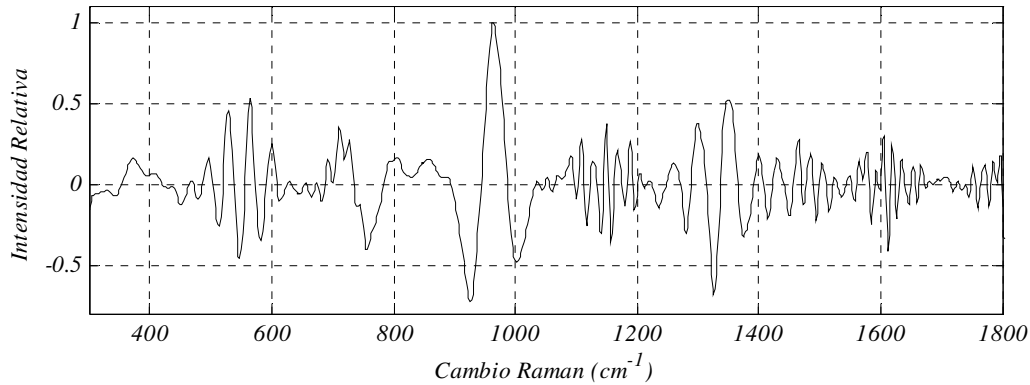
6.26 Espectro Raman del hueso de res

Tabla 17 Líneas espectrales del hueso de res

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
892.3	<i>ADN</i>
953.7	<i>ρCH<sub>2</sub></i> <i>δ OH</i> <i>ρCH<sub>3</sub></i>

### 6.3.8 Hueso pollo

El hueso de pollo se utilizó para hacer una comparación con el de res. El espectro del hueso de pollo se muestra en la figura 6.27 en la cual se puede ver una línea espectral en la zona que aparece en el caso del espectro Raman del hueso de cerdo. Siendo las diferencias principales el ancho de la línea y el pequeño desplazamiento entre uno y otro. En la tabla 18 se muestra las líneas espectrales principales y algunas asignaciones de ellas.



6.27 Espectro Raman del hueso de pollo

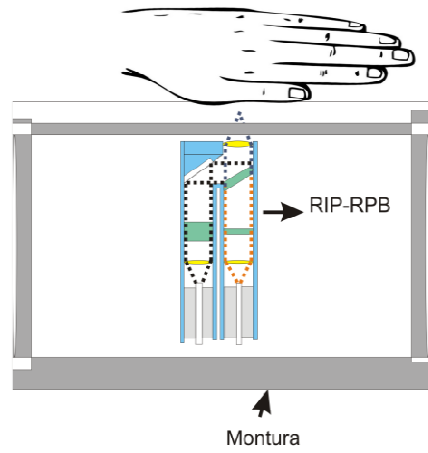
Tabla 18 Líneas espectrales del hueso de pollo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
964.1	$\nu$ C-C ( $\alpha$ helix and random coil)
1298	Amidas III

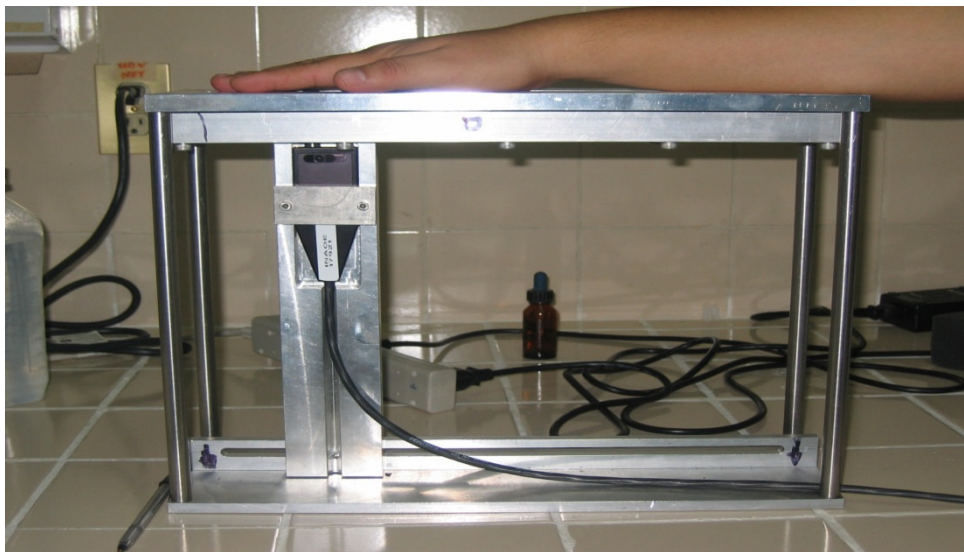
## 6.4 Experimentos con Piel

En esta sección se presentan espectros obtenidos en los dedos, la palma de la mano, dorso de la mano, antebrazo y la muñeca. Para estos espectros se disminuyó la potencia y se aumentaron los tiempos de integración. Para estos espectros se ocupó el método de procesamiento propuesto en el capítulo 4 para eliminar la fluorescencia y el ruido de disparo. Por ser muestras biológicas se obtuvieron espectros altamente fluorescentes y ruidosos. Los tiempos de integración fueron de 30 segundos ocupando una potencia de 30 mW. Los espectros presentados son resultado del promedio de 3 espectros, es decir el espectro fue grabado después de minuto y medio de exposición. En la figura 6.28 se muestra el arreglo experimental utilizado para tomar los espectros en piel. En este arreglo se empleó una montura de aluminio en la cual se pone la mano y se ubica la parte que se quiere medir. La característica principal de esta montura es que tiene exactamente la

distancia focal de la punta de prueba. Los resultados de los espectros que se obtuvieron en la piel fueron reportados [22].



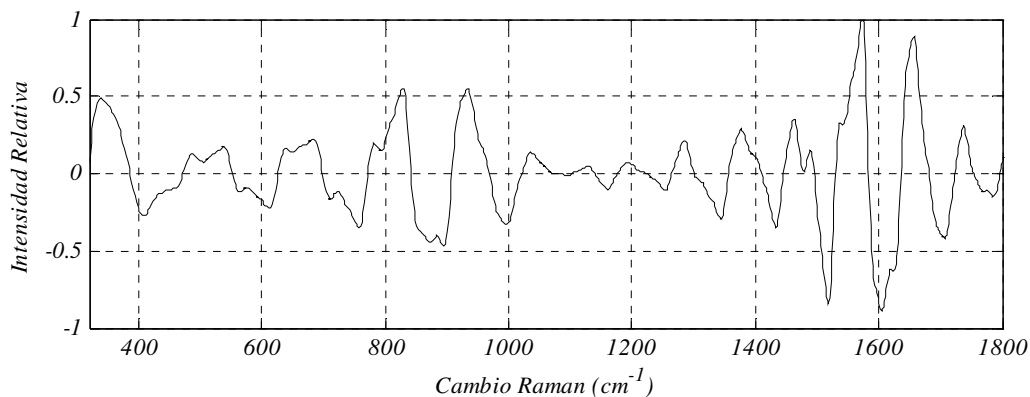
**6.28 Arreglo experimental utilizado para los experimentos con piel**



**6.29 Arreglo experimental de la piel hecho en el laboratorio**

### 6.4.1 Dedo pulgar

En la figura 6.30 se muestra el espectro Raman del dedo pulgar. En la tabla 19 se muestran las líneas espectrales y sus asignaciones. En la tabla se puede ver que algunas líneas se deben a aminoácidos, ADN, amidas y proteínas.



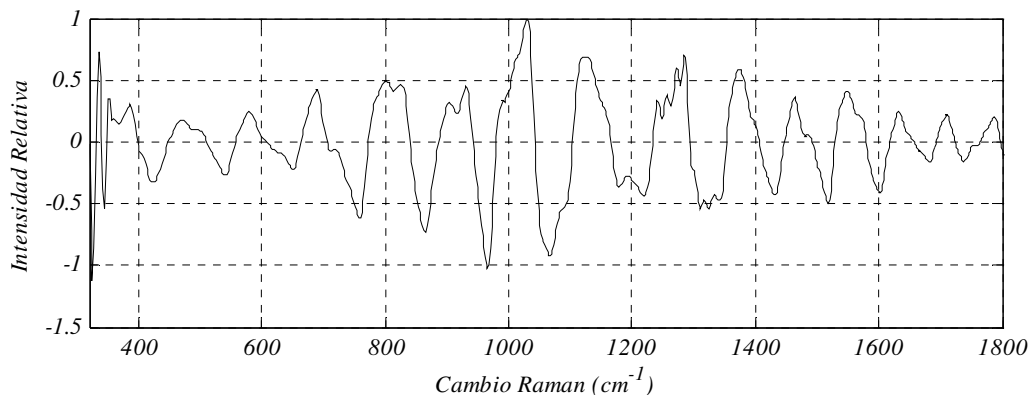
6.30 Espectro Raman del dedo pulgar

Tabla 19 Líneas espectrales del dedo pulgar

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
827.7	<i>ADN</i> <i>Anillo Tyr</i>
932.6	<i>v CC α helix</i> <i>ρCH<sub>3</sub></i>
1285	<i>Amidas III α helix (estructura secundaria)</i>
1377	<i>v asym CH<sub>3</sub></i>
1462	<i>δ asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>
1657	<i>C=C(Lípidos)</i> <i>Amidas I (proteínas)</i>

### 6.4.2 Dedo medio

El espectro del dedo medio es mostrado en la figura 6.31. En la tabla 20 se muestran las líneas espectrales principales y sus asignaciones. En estas asignaciones se pueden ver proteínas, lípidos y aminoácidos.



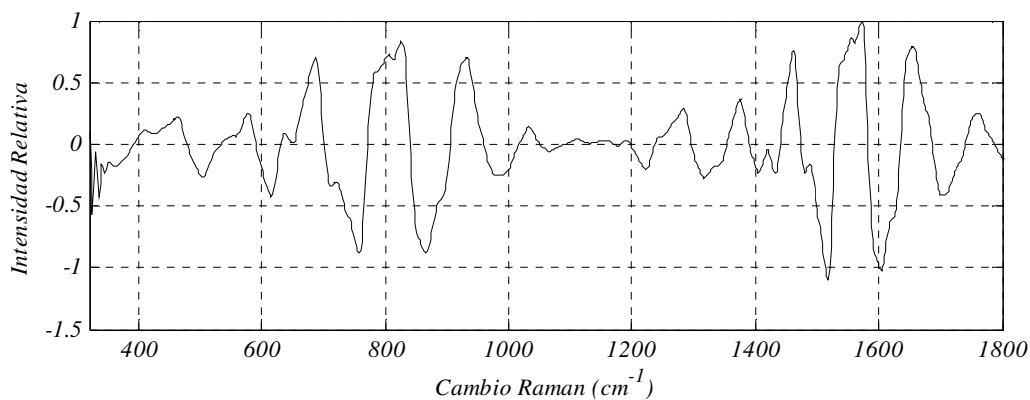
6.31 Espectro Raman del dedo medio

Tabla 20 Líneas espectrales del dedo medio

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
1030	<i>C-H Phe</i>
1127	<i>Lípidos: Cadena de hidrocarbonos, conformación trans. Ceramidas</i>
1285	<i>Amidas III <math>\alpha</math> helix (estructura secundaria)</i>
1375	<i><math>\nu</math> asym <math>\text{CH}_3</math></i>

### 6.4.3 Dedo anular

En la figura 6.32 se muestra el espectro Raman del dedo anular. En la tabla 21 se dan las líneas espectrales y sus asignaciones. En esta se puede ver que se tienen líneas que corresponden a proteínas, lípidos y aminoácidos.



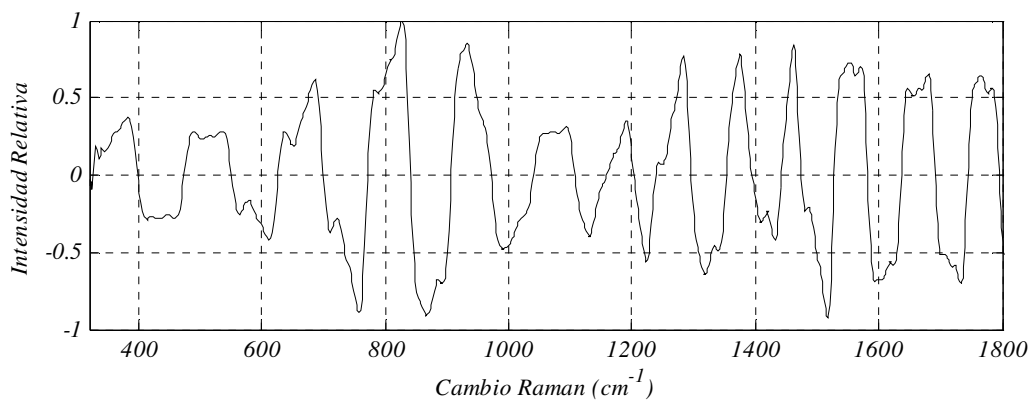
### 6.32 Espectro Raman del dedo anular

Tabla 21 Líneas espectrales del dedo anular

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
825.5	<i>v sym O-P-O ADN</i> <i>Anillo de Tyr</i>
932.6	<i>v CC α helix</i> <i>ρCH<sub>3</sub></i>
1375	<i>v asym CH<sub>3</sub></i>
1462	<i>δ asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>
1657	<i>C=C(Lípidos)</i> <i>Amidas I (proteínas)</i>

### 6.4.4 Dedo índice

En la figura 6.33 se muestra el espectro Raman del dedo índice. En la tabla 22 se dan las líneas principales de este espectro. También en este espectro se describen lípidos, proteínas y aminoácidos.



6.33 Espectro Raman del dedo índice

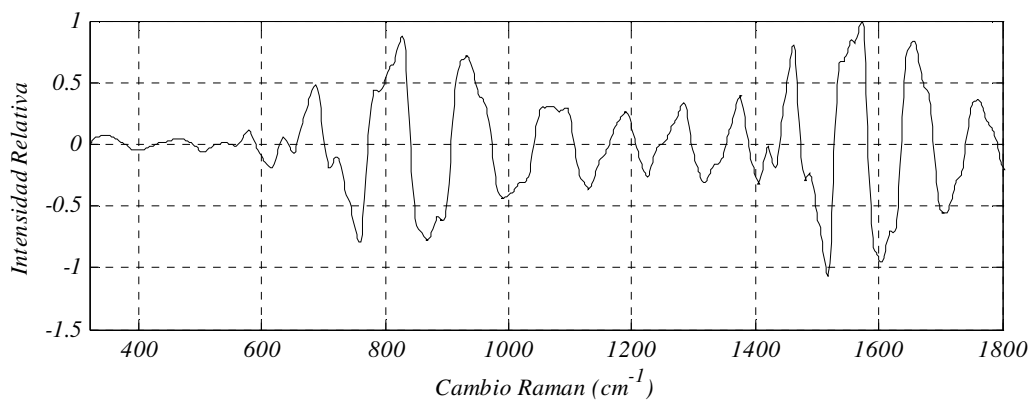
Tabla 22 Líneas espectrales del dedo índice

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
827.7	<i>ADN</i> <i>Anillo Tyr</i>
932.6	<i><math>\nu</math> CC <math>\alpha</math> helix</i> <i><math>\rho</math>CH<sub>3</sub></i>
1283	<i>Amidas III <math>\alpha</math> helix (estructura secundaria)</i>
1375	<i><math>\nu</math> asym CH<sub>3</sub></i>
1462	<i><math>\delta</math> asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>
1554	<i>Trp</i>

### 6.4.5 Dedo meñique

En la figura 6.34 se muestra el espectro Raman del dedo meñique. En la tabla 23 se dan las líneas espectrales principales de este espectro. En la cual se describen DNA, lípidos, proteínas y aminoácidos.





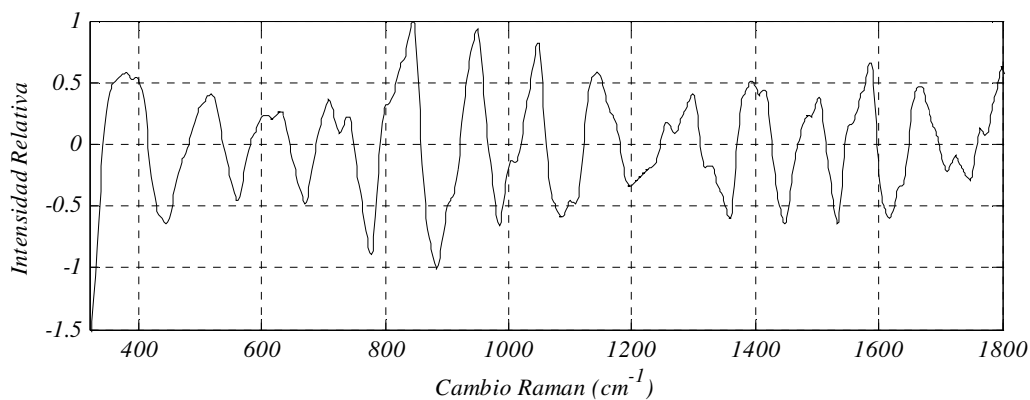
6.34 Espectro Raman del dedo meñique

Tabla 23 Líneas espectrales del dedo meñique

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
827.7	<i>ADN</i> <i>Anillo Tyr</i>
932.6	<i><math>\nu</math> CC <math>\alpha</math> helix</i> <i><math>\rho\text{CH}_3</math></i>
1462	<i><math>\delta</math> asym <math>\text{CH}_3</math> CD0036</i>
1657	<i>C=C(Lípidos)</i> <i>Amidas I (proteínas)</i>

#### 6.4.6 Palma de la mano

En la figura 6.35 se muestra el espectro de la palma de la mano. La tabla 24 muestra las líneas espectrales principales. Como se puede ver en la tabla existen líneas que corresponden a lípidos, proteínas, aminoácidos y ADN



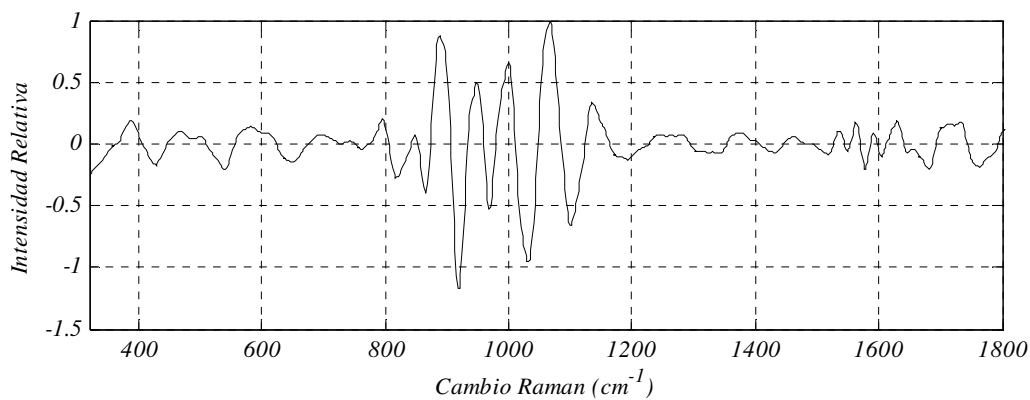
6.35 Espectro Raman de la palma de la mano

Tabla 24 Líneas espectrales de la palma de la mano

Línea espectral ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
845	<i>Anillo Tyr</i>
949.5	$\delta OH$
1049	$\nu C-C$ $\nu C-O$ $\nu S-O$
1145	$\nu C-C$

### 6.4.7 Dorso de la mano

En la figura 6.36 se muestra el espectro Raman del dorso de la mano. En la tabla 25 se muestra las líneas espectrales principales y sus asignaciones. En estas asignaciones se puede ver que se tienen líneas de ADN, aminoácidos y lípidos.



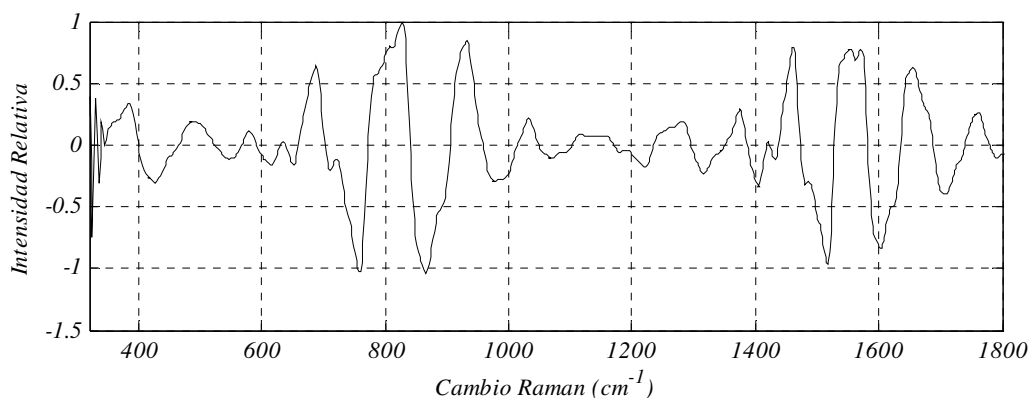
6.36 Espectro Raman del dorso de la mano

Tabla 25 Líneas espectrales del dorso de la mano

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
888	<i>ADN</i>
949.5	<i>δ OH</i>
999.5	<i>Sym. Ring breathing Phe, Trp</i>
1065	<i>Lípidos, ceramidas ν C-O, ADN</i>

### 6.4.8 Antebrazo

En la figura 6.37 se muestra en el antebrazo. En la tabla 26 se muestra las líneas espectrales principales y sus asignaciones. En esta hay asignaciones hay lípidos, proteínas y aminoácidos.



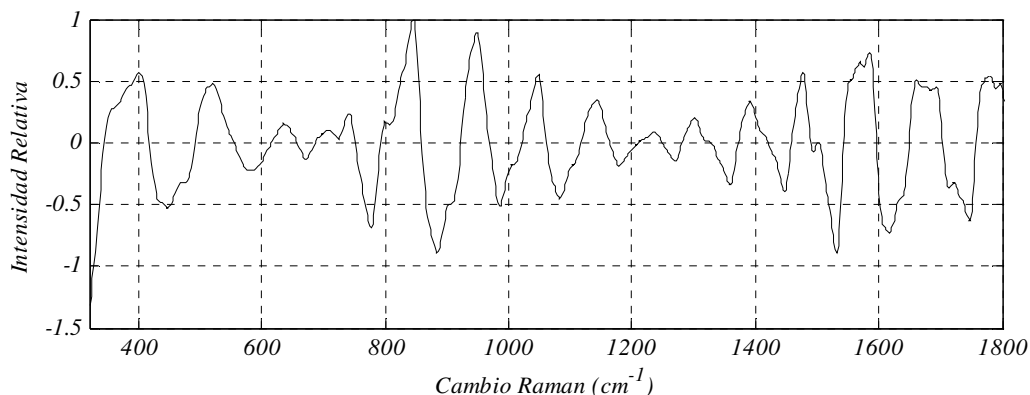
6.37 Espectro Raman del antebrazo

Tabla 26 Líneas espectrales del antebrazo

Línea espectral (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
825.5	<i>ν sym O-P-O, ADN Anillo Tyr</i>
932.6	<i>ν CC α helix ρCH<sub>3</sub></i>
1462	<i>δ asym CH<sub>3</sub> CD0036</i>
1554	<i>Trp</i>
1657	<i>C=C(Lípidos) Amidas I (proteínas)</i>

## 6.4.9 Muñeca de la mano

En la figura 6.38 se pueden ver el espectro Raman de la muñeca de la mano. La tabla 27 muestra las asignaciones de las líneas principales. En las cuales se pueden identificar aminoácidos.



6.38 Espectro Raman de la muñeca de la mano

Tabla 27 Líneas espectrales de la muñeca de la mano

Línea espectral (cm-1)	Asignación
845	<i>Anillo Tyr</i>
949.5	<i>δ OH</i>
1049	<i>ν C-C</i> <i>ν C-O</i> <i>ν S-O</i>

## Conclusiones

En conclusión los resultados en piel anteriores, son solamente en piel sana. De estos espectros se puede discernir, la gran precisión que se tiene para identificar compuestos en la piel y la gran versatilidad que nos puede dar para las futuras aplicaciones médicas que se puedan llevar a cabo en el laboratorio. El método de procesamiento utilizado ayuda a resaltar las líneas espectrales de mayor intensidad y mayor ancho.

## Bibliografia

1. Rasamy Manoharan, Yang Wang, Michael S. Feld, *Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy*, *spectrochimica Acta* 52 1996.
2. Ali Tfayli, Oliver Piot, Florence Draux, Franck Pitre, Michel Manfait, *Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: comparison with excised human skin*, *Biopolymers* 87 num. 4, 2007.
3. I Daubechies, *Ten Lectures on Wavelets*, (CBMS-NSF Series in Applied Mathematics vol 61) (Philadelphia, PA: SIAM), 1992.
4. C Camerlingo, F Zenone, G.M Gaeta.; R Riccio.; M Lepore , *Wavelet data processing of micro-Raman spectra of biological samples*, *Meas. Sci. Technol.* 2006, 17, 298-303.
5. J.T Carstensen, F Attarchi and XP Hou «*Decomposition of aspirin in the solid state in the presence of limited amounts of moisture*». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (4): 318–21. DOI:10.1002/jps.2600770407. PMID 4032246. (1985).
6. E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy: Practical Approach*, USA, 2005. Cap 6, pag. 164.
7. <http://en.wikipedia.org/wiki/Albendazole>
8. O Boutaud, DM Aronoff, JH Richardson, LJ Marnett, JA Oates "Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (10): 7130-5. PMID (2002).
9. [https://las.perkinelmer.com/content/Manuals/MAN\\_Raman20Questions.pdf](https://las.perkinelmer.com/content/Manuals/MAN_Raman20Questions.pdf)
10. <http://es.wikipedia.org/wiki/Ranitidina>

11. Neil G Connelly, «Nomenclature of inorganic chemistry - IUPAC recommendations». *Nomenclature of Inorganic Chemistry*. p. 49, ISBN 0-85404-438-8. (2005).
12. Gloria A. Di LulloDagger , Shawn M. Sweeney, Jarmo Körkkö, Leena Ala-Kokko, and James D. San Antonio; *Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen*; *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 6, 4223-4231, February 8, 2002.
13. A. Lozano, B. Yip and R. K. Hanson, "Acetone: a tracer for concentration measurements in gaseous flows by planar laser-induced fluorescence". *Exp. Fluids* 13: 369-376. doi:10.1007/BF00223244. (1992).
14. <http://www.optra.com/tbspectroscopylaser.html>
15. John E. Logsdon and Richard A. Loke "Isopropyl Alcohol ". *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc. Article Online Posting Date: December 4, 2000.
16. <http://www.oceanoptics.com/Products/r3000spectra.asp>
17. <http://es.wikipedia.org/wiki/C6H12O6>
18. [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm\\_2k8/src/prods/37796.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/37796.htm)
19. A. E. Villanueva-Luna, J. Castro-Ramos, S. Vázquez-Montiel, A. Flores-Gil, J.A Delgado-Atencio, E.E Orozco-Guillen, "Fluorescence and noise filtering of Raman spectra using wavelets". Artículo en arbitraje en la revista *Journal of Raman Spectroscopy*.
20. A.E. Villanueva, J. Castro Ramos, S. Vázquez-Montiel, J. Delgado Atencio, "Aplicaciones de la espectroscopía Raman", Memoria técnica en el 9 encuentro de investigación INAOE, noviembre 2008.

21. A. E. Villanueva-Luna, J. Castro-Ramos, S. Vázquez-Montiel, A. Flores-Gil, E.E Orozco-Guillen, *Sensor de líquidos empleando espectroscopía Raman*, trabajo en extenso para el VII simposio de la óptica en la industria, Guadalajara, septiembre 2009.
22. Adrian Eugenio Villanueva Luna, Jorge Castro Ramos, José Alberto Delgado Atencio, Margarita Cunill Rodríguez, Eber Orozco Guillen, Sergio Vázquez y Montiel, *“Obtención de espectros de la piel mediante espectroscopía Raman”*, Congreso Nacional de Física, Zacatecas, octubre 2008.

A decorative graphic of a scroll with a black outline and grey shading on the rolled-up ends, framing the chapter title.

# ***CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES***



## CONCLUSIONES

La espectroscopía Raman demuestra que tiene un gran potencial en su aplicación en los tejidos biológicos. Esto se debe a su capacidad de mostrar los resultados en tiempo real y con poco tiempo de espera. En esta tesis se muestra que se puede obtener espectros de la piel con tiempos de integración bajos.

Se tienen tiempos de integración y potencia bien definidas. De tal forma que no se ocasiona daño al tejido al cual se le vaya a obtener el espectro. Siendo una alternativa bien fundamentada para ser diagnóstico.

Se lograron obtener espectros en los fármacos, estos espectros son de fácil reproducción y se comparo la aspirina y el paracetamol con la literatura. Demostrándose que los espectros obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados.

Los espectros obtenidos en los líquidos son de gran importancia para hacer sensores con espectroscopía Raman. En este trabajo se muestra combinaciones de líquidos y la gran facilidad para diferenciar los distintos líquidos que están involucrados en la mezclar a la cual se le obtuvo el espectro.

El espectro de la acetona y el alcohol isopropílico fue comparado con el reportado en la literatura, dando como resultado un espectro muy similar al que se obtiene en esta tesis.

Los espectros de piel de pollo y cerdo fueron tomados en diferentes condiciones a las reportadas en la literatura por lo tanto, se obtienen espectros diferentes. Los espectros de los huesos de res y pollo revelan una importante línea espectral que es característica del calcio.

El método de procesamiento de datos que ayuda a obtener el espectro más claro. Esto se debe a que se combina la sustracción del ruido y la fluorescencia facilitando el análisis de los resultados. Las wavelets tienen mucho potencial en el procesamiento de señales Raman, por su fácil adaptabilidad con los espectros que se obtienen.

El arreglo experimental utilizado en este trabajo permite tener flexibilidad y estabilidad al tomar los espectros. También permite obtener espectros de diferentes sustancias y evitar la saturación del CCD desenfocando la muestra de la punta de prueba. De tal forma que los espectros son obtenidos sin dañar el equipo y obtener resultados razonables de las muestras que se están tomando.

## **TRABAJOS A FUTURO**

En este trabajo solo se presenta el trabajo preliminar con un gran potencial para las aplicaciones de diagnóstico médico. En el trabajo a futuro se pueden cuantificar las líneas espectrales que se obtienen del espectro Raman y con esto determinar la concentración del compuesto al cual corresponde la línea. Además se pueden determinar mediante el espectro el estado de la piel, si está muy dañado o el grado de daño que tiene.

Con la espectroscopía Raman se pueden diagnosticar glucosa, colesterol, triglicéridos, ácido úrico y diferentes tipos de cáncer. Lo mejor de todo es que se pueden obtener *in vivo*. Haciendo este tipo de diagnóstico de gran relevancia e importancia para la sociedad.

El arreglo experimental se puede mejorar, haciéndolo flexible para poder medir en cualquier parte del cuerpo.

El programa de procesamiento de datos se podría hacer en interface gráfica para uso de personas no familiarizadas con los espectros Raman.

Falta probar las variaciones del espectro en diferentes zonas de la mano de la persona. Con esto se podría mostrar la tolerancia en la zona de la medición y su repetitividad.

Una forma de ver la composición de la piel es con el uso de tejidos sintéticos, tales como los llamados fantoms. Con este tipo de tejido se puede simular el espectro con diferentes concentraciones por ejemplo la glucosa líquida que se vende comercialmente.



***APÉNDICE***

## APÉNDICE A: CODIGO DEL PROCESAMIENTO DE DATOS

```
% Procesamiento por medio de wavelets

clc,close all,clear all

A=load ('espectro0.txt');

wav=A(:,1);

intensi=(A(:,2));

% Realiza una descomposición wavelet de la señal en el nivel 5 utilizando sym6.

wname = 'sym6'; lev = 5;

tree = wpdec(intensi,lev,wname);

% Estima el ruido de la desviación estándar de los coeficientes de detalle en el nivel 1,
correspondiente al nodo índice 2.

det1 = wpccoef(tree,2);

sigma = median(abs(det1))/0.6745;

alpha = 2;

thr = wpbmpen(tree,sigma,alpha);

keepapp = 1;

xd = wpdencmp(tree,'s','nobest',thr,keepapp);

% descompone el espectro

[C,L]=wavedec(xd,7,'bior6.8');

for n=1:78;

    C(n)=0;

end

for i=341:1178;
```

```

    C(i)=0;

end

% Reconstruye los detalles usando la estructura de descomposición

w= 'bior6.8';

for i = 1:7

    D(i,:) = wrcoef('d',C,L,w,i);

end

y=waverec(C,L,'bior6.8');

Y = msnorm(wav,y,'QUANTILE',1,'LIMITS',[0 inf],'MAX',1);

Figure (1)

plot(wav,Y,'k')

xlim([300 1800])

title(' ', 'Fontangle','italic','fontweigh','bold','FontName','Times new roman','fontsize',12)

grid on

xlabel('Cambio Raman (cm-1)','Fontangle','italic','FontName','Times new
roman','fontsize',10)

ylabel('Intensidad Relativa(U.A)','Fontangle','italic','FontName','Times new
roman','fontsize',10)

%% Método de procesando substrayendo el promedio del espectro

A=load ('phospholipidsmax.txt');

wav=A(:,1);

inten=(A(:,2));

inten1=inten-mean(inten);

```

```
Y0=msnorm(wav,inten1,'QUANTILE',1,'LIMITS',[0 inf],'MAX',1);  
figure(2)  
plot(wav,Y0,'k')  
xlim([300 1800])  
title(' ', 'Fontangle','italic','fontweigh','bold','FontName','Times new roman','fontsize',12)  
grid on  
xlabel('Cambio Raman (cm-1)','Fontangle','italic','FontName','Times new  
roman','fontsize',10)  
ylabel('Intensidad Relativa(U.A)','Fontangle','italic','FontName','Times new  
roman','fontsize',10)
```

## Publicaciones obtenidas de este trabajo

A. E. Villanueva-Luna, J. Castro-Ramos, S. Vázquez-Montiel, A. Flores-Gil, J.A Delgado-Atencio, E.E Orozco-Guillen, "Fluorescence and noise filtering of Raman spectra using wavelets". Artículo en arbitraje en la revista Journal of Raman Spectroscopy.

A. E. Villanueva-Luna, J. Castro-Ramos, S. Vázquez-Montiel, A. Flores-Gil, E.E Orozco-Guillen, Sensor de líquidos empleando espectroscopía Raman, trabajo en extenso para el VII simposio de la óptica en la industria, Guadalajara, septiembre 2009.

A.E. Villanueva, J. Castro Ramos, S. Vázquez-Montiel, J. Delgado Atencio, "Aplicaciones de la espectroscopía Raman", Memoria técnica en el 9 encuentro de investigación INAOE, noviembre 2008.

Adrian Eugenio Villanueva Luna, Jorge Castro Ramos, José Alberto Delgado Atencio, Margarita Cunill Rodríguez, Eber Orozco Guillen, Sergio Vázquez y Montiel, "Obtención de espectros de la piel mediante espectroscopía Raman", Congreso Nacional de Física, Zacatecas, octubre 2008.