

Centro de Investigaciones en Óptica, A.C.



Universidad de Guanajuato

Caracterización de Muestras Biomédicas por Espectroscopia Raman

Tesis

presentada

por

Cirilo Medina Gutiérrez

como requisito para obtener

el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS (ÓPTICA)

Aguascalientes-México

Diciembre del 2003

© Copyright 2003 por Cirilo Medina Gutiérrez

Todos los derechos reservados

A mis padres

A mi esposa e hijos

A mis hermanos y sobrinos.

"La Física está muy cerca del arte en el sentido que cuando usted examina la naturaleza en una pequeña escala, usted ve una diversidad en la naturaleza, usted ve las simetrías en la naturaleza, usted ve los fenómenos en la naturaleza que simplemente son inmensamente deleitables"

- Robert Wilson (1936) -

Resumen

Se ensambló un sistema Raman dispersivo que trabaja con distintas fuentes láser (632.8, 514.5 y 488 nm) en la región visible del espectro electromagnético. A este sistema se acopló un microscopio para obtener un sistema micro-Raman. Se usó un filtro de interferencia para eliminar las frecuencias plasma del láser, y un filtro holográfico que es transparente a longitudes de onda diferentes a la del láser.

Para el estudio del cristalino de cerdo normal de la raza yorkshire, se usó un sistema Raman Renishaw (modelo 1000 B) en el cercano infrarrojo (NIR), que usa una longitud de onda de 830 nm. Se estudió la influencia de las proteínas y de los aminoácidos aromáticos sobre el índice de refracción del cristalino. Para esto, se realizaron mediciones de los espectros Raman a lo largo de los ejes visual y ecuatorial de una rodaja de 500 μm del cristalino, en intervalos de 105 μm . Alrededor de cada punto se midió al menos 5 espectros, los cuales fueron promediados. El número total de espectros promedio en el eje visual fueron 48 ($n=242$) y en el eje ecuatorial 58 ($n=291$). Las intensidades se midieron trazando una línea base entre dos puntos mínimos de un pico Raman y una vertical desde el punto máximo hasta cruzar con esta línea base. Las intensidades de los picos de las proteínas y de los aminoácidos se graficaron con respecto a los ejes visual y ecuatorial. Se encontró que, a lo largo del eje ecuatorial, los aminoácidos están más concentrados en el núcleo del cristalino, mientras que a lo largo del eje visual se incrementan considerablemente. Por otro lado, las proteínas tienen un comportamiento similar a los aminoácidos. En este tra-

bajo no se estudiaron proteínas específicas sino que se analizaron vibraciones de enlaces atómicos, relacionados con ciertos grupos de proteínas. En el caso de los aminoácidos se analizaron la tirosina, triptófano y fenilalanina.

Reconocimientos

A mi primer asesor, *Dra. SOFÍA E. ACOSTA ORTIZ*, por invitarme a trabajar en el área de la espectroscopia Raman, por su apoyo académico en la ejecución de la tesis y por contribuir con su gestión a la compra del sistema Raman Renishaw NIR, para las aplicaciones biomédicas.

A mi segundo asesor, *Dr. CLAUDIO FRAUSTO REYES*, por su gran apoyo en la parte experimental, como en el ensamblaje de los sistemas Raman, y en la interpretación y procesamiento de los datos experimentales.

Un gran reconocimiento a la *SECRETARÍA DE RELACIONES EXTERIORES DE MÉXICO* por su apoyo con la Beca Económica durante tres años (1999-2002). Un especial reconocimiento a la Lic. Maura Carrillo Calderón, en ese entonces Jefe del Departamento para América del Sur, por su amabilidad y buen trato a los becarios.

Al *CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ÓPTICA, A.C.* por su apoyo con una Beca Institucional para culminar con mi tesis.

Un especial reconocimiento a los M. C. Martín Ortiz M. y a Gil Arturo Pérez H. (CIO), por su gran apoyo técnico.

Quiero reconocer también al Dr. Traian Dascalu por habernos permitido usar los equipos del laboratorio de láseres.

Finalmente el reconocimiento a mis amigos de generación que con su gran dedicación me motivaron para concluir el trabajo de la mejor manera.

Producción Científica

Artículos Publicados

- ❖ C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, J. L. Quintanar-Stephano, R. Sato-Berrú, O. Barbosa-García, “*Study of the protein distribution in the pig lens cross section by Raman spectroscopy*”, *Spectrochimca Acta Part A*, Aceptado, 2003.
- ❖ C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, J. L. Quintanar-Stephano, R. Sato-Berrú, “*Amino acid contents along the visual and equatorial axes of a pig lens by Raman spectroscopy*”, *Spectrochimica Acta Part A*, Aceptado, 2003.
- ❖ R. Sato-Berrú, Jorge Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, “*Quantitative NIR-Raman analysis of methyl parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates*”, *Spectrochimica Acta Part A*, Aceptado, 2003.
- ❖ R. Sato-Berrú, Jorge Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, “*Quantitative NIR Raman analysis in liquid mixtures*”, *Spectrochimica Acta Part A*, Aceptado, 2003.
- ❖ Roberto Y. Sto Berrú, Cirilo Medina Gutiérrez, Jorge Medina Valtierra y Claudio Frausto Reyes, “*Aplicación de la espectroscopia Raman para la caracterización de pesticidas orgánicos*”, *Revista Internacional de contaminación Ambiental*, Aceptado, 2003

Artículo en Proceso de Aprobación

- ❖ C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, J. Medina-Valtierra y R. Sato-Berrú, “*Estudio del Efecto de Temperatura en el β -caroteno de Zanahoria por Espectroscopia Raman*”, Revista Mexicana de Física, en arbitraje, 2003.

Artículo en Revisión

- ❖ C. Medina, C. Frausto, J. L. Quintanar, R. Sato, J. Medina-Valtierra and A. Saucedo-Carvajal, “FT filtered Raman spectra minimizing fluorescence background and edge effects”.

Artículo en Preparación

- ❖ C. Medina-Gutiérrez, J. L. Quintanar-Stephano, C. Frausto-Reyes, R. Sato-Berrú, “*Study of influence of TRH on hypothyroid rat by Raman Spectroscopy*”.

Congresos Nacionales

- ❖ “*Diseño y Construcción de un Sistema Raman para El Análisis de Muestras Orgánicas e Inorgánicas*”, Octavo Simposio de Investigación y desarrollo Tecnológico, Aguascalientes, México.
- ❖ “*Reducción de la Fluorescencia en los Espectros Raman al emplear la transformada de Fourier*”, Noveno Simposio de Investigación y desarrollo Tecnológico, Aguascalientes, México.
- ❖ “*Detección de Pesticidas por Espectroscopia NIR-Raman*”, XLV Congreso Nacional de Física, León, Guanajuato, México.

- ❖ “Arreglo Periódico para Definir Picos Raman y Reducir Fondos de Fluorescencia”, XLV Congreso Nacional de Física, León, Guanajuato, México.
- ❖ “Montaje de un Sistema Raman Dispersivo y Caracterización de Muestras Sólidas y Líquidas”, XLV Congreso Nacional de Física, León, Guanajuato, México.
- ❖ “*Análisis por espectroscopia Raman en el cercano infrarrojo de suero de ratas hipotiroideas tratadas con TRH*”, XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- ❖ “Análisis cuantitativo en líquidos por espectroscopia NIR-Raman”, XLVI Congreso Nacional de Física, Mérida, Yucatán, México
- ❖ “Determinación de la distribución de proteínas en el cristalino de cerdo mediante espectroscopia Raman”, XLVI Congreso Nacional de Física, Mérida, Yucatán, México.
- ❖ “*Estudio de la distribución de aminoácidos en la sección transversal del cristalino de cerdo por espectroscopia Raman*”, XLVI Congreso Nacional de Física, Mérida, Yucatán, México.
- ❖ “Análisis por espectroscopia Raman en el cercano infrarrojo de suero de ratas hipotiroideas tratadas con TRH”, Décimo Simposio de Investigación y desarrollo Tecnológico, Aguascalientes, México.
- ❖ “*Determinación de la distribución de proteínas en el cristalino de cerdo mediante espectroscopia Raman*”, Décimo Simposio de Investigación y desarrollo Tecnológico, Aguascalientes, México.
- ❖ “Detección de pesticidas por espectroscopia NIR-Raman”, Décimo Simposio de Investigación y desarrollo Tecnológico, Aguascalientes, México.

- ❖ “Determinación de la distribución de proteínas en el cristalino de cerdo mediante espectroscopia Raman”, La Óptica en la Industria, Tercer Simposio Nacional, Tonantzintla, Puebla, México.

- ❖ “Análisis cuantitativo en líquidos por espectroscopia Raman”, La Óptica en la Industria, Tercer Simposio Nacional, Tonantzintla, Puebla, México.

Prefacio

El ojo es el órgano de la visión más estudiado, como un elemento óptico complejo y como un elemento de muchos constituyentes. En especial, el cristalino es un elemento óptico muy importante para la visión, cuyo funcionamiento es muy similar al de una lente de vidrio. En el cristalino el índice de refracción es variable, en la corteza es 1.38 y en el núcleo de 1.40 [49]. Esta variación está relacionada con los constituyentes del cristalino, como son las proteínas [51]. Las proteínas están constituidas por cadenas peptídicas de aminoácidos, por lo que éstos también deben estar relacionados con las variaciones del índice de refracción del cristalino. La tirosina, triptófano y fenilalanina son los mayores constituyentes de aminoácidos que se encuentran en el cristalino [59, 60]. La espectroscopia Raman, comparada con otras técnicas analíticas [1], tiene la ventaja de ser una técnica no invasiva poderosa para el estudio de muestras biológicas, porque proporciona información detallada de la estructura y conformación de moléculas orgánicas [2]. Particularmente, la espectroscopia Raman se aplica para el estudio de las proteínas en el cristalino de humano y de porcino, se ha demostrado que ambos tienen el mismo perfil de proteínas [61]. En esto radica la importancia del estudio de las proteínas y de los aminoácidos en el cristalino de cerdo. No obstante la gran información acumulada al respecto, sin embargo, no se tiene una información detallada de la distribución de las proteínas y aminoácidos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo.

Los *cuatro primeros capítulos* están dedicados a una breve descripción teórica de los

temas más importantes que están relacionados con el trabajo: el fenómeno Raman, la microscopía Raman, aminoácidos y proteínas y el análisis estadístico usado para procesar los datos espectrales.

En el *Capítulo 5* se muestra el montaje de los sistemas Raman normal y micro-Raman, que tiene fuentes láser con longitudes de onda en el rango visible del espectro electromagnético. Este trabajo fue un adiestramiento muy importante porque permitió conocer los detalles del funcionamiento de un equipo Raman, cualquiera fuera el modelo del sistema.

El en *Capítulo 6* se presenta el estudio espectral de las proteínas y de los aminoácidos distribuidos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo. Este estudio se realizó con un sistema micro-Raman, cuya fuente de excitación es un diodo láser que emite en el cercano infrarrojo (830 nm). Este sistema es adecuado para estudio de muestras biomédicas.

En el *Capítulo 7* se presentan las conclusiones del trabajo y las investigaciones futuras, de las cuales ya se tienen algunos resultados preliminares.

Finalmente, en los *Apéndices A, B y C* se muestran algunos espectros Raman obtenidos con el sistema Raman normal, así como el uso de un filtro holográfico (514.5 nm) para otra longitud de onda (488 nm) cercana a la permitida. En el *Apéndice D* se muestran las gráficas de las intensidades de los picos Raman de la tirosina, triptófano y fenilalanina respecto a la distancia a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo. En este caso se usaron las intensidades, obtenidas de las derivadas de los espectros Raman.

Índice general

Resumen	V
Reconocimientos	VII
Producción Científica	VIII
Prefacio	XII
Índice general	1
I FUNDAMENTO TEÓRICO	5
1. Conceptos Generales	7
1.1. Breve Historia de la Espectroscopia Raman	8
1.2. Vibraciones Moleculares	9
1.3. Reglas de Selección	12
1.4. El Espectro Raman	16
2. Microscopía Raman	24
2.1. Enfoque de la Excitación	25
2.2. Óptica de Colección de Luz	27
2.3. Muestras Absorbentes	29
2.4. Rodaja Delgada de una Muestra	31

3. Aminoácidos y Proteínas	34
3.1. Aminoácidos	34
3.1.1. Estereoisomerismo de los Aminoácidos	35
3.1.2. Propiedades Iónicas de los Aminoácidos	36
3.2. Proteínas	38
4. Análisis Estadístico	41
4.1. Datos Multivariantes	41
4.2. Proyección del Espacio Característico	43
4.3. Análisis en Componentes Principales	44
4.3.1. Definición de los Componentes Principales	45
4.3.2. Correlaciones de Variables y Componentes	48
4.3.3. Cálculo de las Cuentas del Componente Principal	48
4.4. Análisis Discriminante Lineal (LDA)	49
4.4.1. Clasificación en dos Clases	51
4.4.2. Clasificación en Clases Normales	52
4.4.3. Clasificación Cuando los Parámetros son Estimados	52
II EXPERIMENTAL	55
5. Sistemas Raman	57
5.1. Sistemas Raman ensamblados	58
5.1.1. Equipo Utilizado	58
5.1.2. Geometría de 90° con Fibra Óptica	59
5.1.3. Geometría de 90° sin Fibra Óptica	60
5.1.4. Geometría de 180°	60
5.1.5. Calibración del Sistema Raman	62

ÍNDICE GENERAL	3
5.2. Montaje del Sistema Micro-Raman	66
5.3. Sistema Micro-Raman Comercial	68
5.4. Enfoque de la Radiación Láser Sobre la Muestra	69
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
6. Cristalino: Proteínas y Aminoácidos	73
6.1. Aspectos Generales	74
6.1.1. Muestras de Cristalino	74
6.1.2. Trayectoria del Haz Láser en el Cristalino	74
6.1.3. Medición de las Intensidades de los Picos Raman	75
6.1.4. Análisis Estadístico	75
6.2. Proteínas Cristalinas	76
6.2.1. Introducción	76
6.2.2. Espectros Raman	77
6.2.3. Análisis de Datos	80
6.3. Aminoácidos	81
6.3.1. Introducción	81
6.3.2. Espectros Raman	82
6.3.3. Cambios en el Triptófano y la Tirosina	83
6.3.4. Cambios en la Fenilalanina	85
6.3.5. Análisis de Datos	86
IV CONCLUSIONES	89
7. Conclusiones e Investigaciones Futuras	91
7.1. Conclusiones Particulares	91

7.1.1. Capítulo 1	92
7.1.2. Capítulo 2	92
7.1.3. Capítulo 3	92
7.1.4. Capítulo 4	93
7.1.5. Capítulo 5	93
7.1.6. Capítulo 6	94
7.2. Conclusiones Generales	94
7.2.1. Proteínas	94
7.2.2. Aminoácidos	95
7.3. Investigaciones Futuras	95
7.3.1. Cáncer de Mama	96
7.3.2. Detección de la TRH y TSH	96
Apéndices	98
A. Aminoácidos: L-glutamina y L-glutámico	98
B. Alcoholes Etílico y Metílico	102
C. Uso del Filtro Holográfico de 514.5 nm	105
D. Derivadas de los Espectros Raman	107
Referencias	110
Índice de figuras	113
Índice de cuadros	116

Parte I

FUNDAMENTO TEÓRICO

“La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general, pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos”.

Albert Einstein.

1

Conceptos Generales

El fenómeno Raman es un esparcimiento inelástico de la luz en un material, donde la luz esparcida puede tener una longitud de onda menor o mayor que la luz incidente. La técnica basada en este fenómeno se conoce con el nombre de **Espectroscopia Raman** y sus aplicaciones son inmensas porque nos permite obtener información sobre la estructura, la composición y los estados vibratorios o electrónicos del material esparcidor [3]. Esta técnica es una herramienta importante para el estudio de movimientos vibratorios altamente simétricos, ya que éstos son totalmente IR inactivos [4]. La espectroscopia Raman y la infrarroja (IR) se complementan entre sí porque proporcionan información complementaria sobre las vibraciones moleculares.

En la teoría clásica se estudian las vibraciones moleculares, usando el modelo de las vibraciones de balones masivos unidos entre sí a través de resortes elásticos. Cuando un fotón del campo externo interactúa con la muestra, ésta se polariza y aparecen momentos dipolares que oscilan con frecuencias diferentes a la del fotón excitador, cuya energía es

$h\nu_0$. Durante un impacto inelástico del fotón de luz con la molécula, la energía vibracional $h\nu_s$ puede cambiar. De esta manera, los fotones de luz se esparcen con energías bajas (Stokes) o altas (anti-Stokes), de acuerdo a la ecuación

$$h\nu_R = h\nu_0 \mp h\nu_s,$$

donde la energía del fotón $h\nu_R$ da lugar al espectro Raman.

1.1. Breve Historia de la Espectroscopia Raman

En 1922 *Brillouin* [5] predijo el esparcimiento de la luz en ondas sonoras elásticas de longitud de onda larga. El físico cuántico austriaco *A. Smekal* [6] desarrolló en 1923 la teoría del esparcimiento de la luz utilizando un sistema con dos niveles cuánticos de energía, esta teoría contiene las características esenciales del fenómeno descubierto por *Chandrasekhra Venkata Raman* [7]. C. V. Raman y K. S. Krishnan publicaron el 31 de marzo de 1928 un artículo en la revista *Nature* [8] en el cual se reportaba el fenómeno del esparcimiento inelástico de la luz en líquidos (como el benceno). En 1930, Raman recibió el Premio Nobel en Física por el descubrimiento del efecto que lleva su nombre. Casi simultáneamente en 1928, los científicos rusos *Landsberg* y *Mandelstam* [9] reportaron el descubrimiento de un fenómeno similar en cuarzo, pero el reconocimiento se lo llevó el grupo indio por la evidencia sistemática y altamente detallada que presentaron.

Después de una intensa actividad en los años 1920 y en los siguientes 1930, el estudio del esparcimiento de la luz avanzó a un paso más lento, debido al pequeño grado de monocromaticidad de la luz de excitación con intensidad relativamente pequeña y a la pequeñísima intensidad de la luz esparcida muy difícil de detectar. La invención del láser de *helio-neón* en 1961, el desarrollo de mejores espectrómetros ópticos y de nuevas técnicas

de detección de luz, originaron un interés muy grande en el estudio del esparcimiento de la luz [10].

En la actualidad las aplicaciones de la espectroscopia Raman son muy variadas, por ejemplo, se hacen mediciones del ozono atmosférico a través de la técnica RVR Raman DIAL [11], en laboratorios analíticos industriales para obtener información espacial de grandes áreas a través de imágenes Raman [12], en la Ciencia de Materiales se hacen estudios de la estructura de películas sólidas [13], en la medicina se realizan caracterizaciones espectroscópicas de muestras biomédicas, como tejidos de la arteria coronaria humana con arteroesclerosis [14], piel [15, 16], dientes [17], etc.

1.2. Vibraciones Moleculares

Si N átomos constituyen una molécula, hay $3N$ grados de libertad de movimiento, tres son traslacionales y tres rotacionales. Los restantes $3N(\text{total}) - 3(\text{traslacional}) - 3(\text{rotacional})$ grados de libertad son movimientos donde las distancias entre los átomos cambian: la longitud entre los enlaces químicos y los ángulos entre ellos. Todas las vibraciones de una molécula idealizada resultan de la superposición de $3N-6$ vibraciones normales que no interaccionan entre sí [18].

El estudio de las vibraciones moleculares se realiza con el modelo de un oscilador armónico clásico, como se muestra en la Fig. 1.1.

Cada coordenada cartesiana de cada átomo, expresada como una función del tiempo, es una onda **seno** o **coseno** cuando la molécula muestra un modo normal de vibración.

Seguidamente encontraremos la frecuencia de vibración clásica para una molécula diatómica. Consideremos que las masas de los átomos son m_1 y m_2 y que están unidas entre sí a través de un resorte de masa despreciable Fig. 1.2.

Para simplificar consideremos el desplazamiento de cada masa desde su posición de

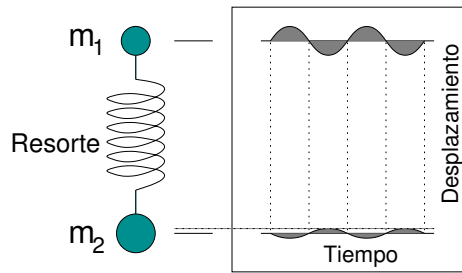


Fig. 1.1: Modo normal de vibración del modelo de un balón y un resorte de una molécula diatómica como el HCl. El desplazamiento con respecto al tiempo para cada masa es una onda **seno** y el centro de gravedad es inmóvil.

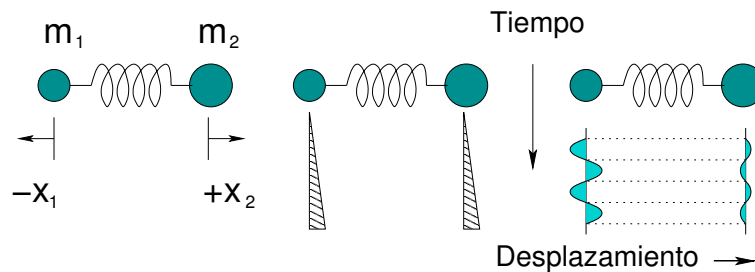


Fig. 1.2: Modelo de una molécula diatómica. En la derecha están dos soluciones de la ecuación para el movimiento axial, donde el desplazamiento de las masas como función del tiempo está trazado para la traslación y vibración.

equilibrio a lo largo de los ejes x_1 y x_2 . En este caso $(x_2 - x_1)$ es la diferencia de la longitud del enlace respecto a la longitud en la posición de equilibrio. Cada masa recibe la influencia de la constante de fuerza K , bajo la cual la longitud del enlace en cierto momento sufre una distorsión $(x_2 - x_1)$. De las ecuaciones de movimiento para las masas m_1 y m_2

$$K(x_2 - x_1) = m_1 \frac{d^2 x_1}{dt^2} \quad y \quad -K(x_2 - x_1) = m_2 \frac{d^2 x_2}{dt^2}, \quad (1.1)$$

encontramos una ecuación que describe la frecuencia de las vibraciones ν de una molécula diatómica

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{K \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)}, \quad (1.2)$$

donde se puede observar que la frecuencia de vibración es independiente de la amplitud. Por otro lado, se demuestra que la relación para las amplitudes A_1/A_2 es de la forma

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{-m_2}{m_1}, \quad (1.3)$$

o para cualquier tiempo t se encuentra la relación

$$\frac{x_1}{x_2} = \frac{-m_2}{m_1}, \quad (1.4)$$

lo que indica que el centro de gravedad es inmóvil [19].

En la espectroscopia vibratoria, es común medir las “frecuencias” en unidades de número de onda $\tilde{\nu}$ (ondas por unidad de longitud), que es recíproco a la longitud de onda λ

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda},$$

donde c es la velocidad de la luz en el vacío.

Utilizando las unidades de masas atómicas y las constantes de fuerzas en N/cm (= *mdyne/Å*), la frecuencia de vibración de la molécula diatómica toma la forma

$$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 1303 \sqrt{K \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)}, \quad (1.5)$$

donde 1303 resulta de la expresión $(N_A \cdot 10^5)^{1/2} / 2\pi c$. N_A es el número de Avogadro. La constante de fuerza para el enlace carbón–carbón de enlaces simple, doble o triple tiene aproximadamente los valores de 4.5, 9.4 y 15.7 N/cm, respectivamente.

En una molécula simétrica, el movimiento de átomos es simétrico o antisimétrico con respecto a las operaciones de simetría. Ya que para las vibraciones normales, el centro de gravedad y la orientación de los ejes moleculares permanecen invariables, los átomos

equivalentes se mueven con una misma amplitud [20].

1.3. Reglas de Selección

Las moléculas son irradiadas con luz monocromática en las regiones UV, visible, o cercana infrarroja del espectro con fotones de energía $h\nu_0$. Durante el impacto inelástico del fotón de luz con la molécula, la energía vibratoria $h\nu_s$ de la molécula puede restarse o sumarse a la energía del fotón incidente, de acuerdo a la relación

$$h\nu_R = h\nu_0 \mp h\nu_s. \quad (1.6)$$

El fotón de luz perturbador es también esparcido elásticamente con la misma energía $h\nu_0$ que el fotón incidente, este fenómeno es conocido como *esparcimiento de Rayleigh*.

La espectroscopia IR y Raman aportan datos complementarios de las vibraciones moleculares, pero en estas técnicas los mecanismos de interacción del fotón de luz con las moléculas son completamente diferentes.

La vibración es IR activa solamente si el momento dipolar molecular es modulado por la vibración normal,

$$\left(\frac{\partial p}{\partial q}\right)_0 \neq 0, \quad (1.7)$$

donde p es el momento dipolar molecular y q son las coordenadas normales.

Cuando una molécula es expuesta a un campo eléctrico, los electrones y los núcleos son forzados a moverse en direcciones opuestas, de esta manera se crea un momento dipolar proporcional a la intensidad del campo eléctrico y a la polarizabilidad molecular α . La vibración molecular solamente puede ser observada en el espectro Raman si hay una

modulación de la polarizabilidad molecular por la vibración, es decir

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0. \quad (1.8)$$

Si las condiciones, expresiones (1.7) y (1.8), cumplen con la simetría, entonces las vibraciones serán permitidas o activas en el espectro IR y Raman, respectivamente; si ellas no cumplen con la simetría, serán prohibidas o inactivas.

Reglas de selección para el espectro IR y Raman

Las reglas de selección que gobiernan al esparcimiento Raman constituyen una de las principales características que lo distinguen de la absorción IR [21]. Los orígenes del espectro IR y Raman son marcadamente diferentes y, por lo tanto, sus reglas de selección son también diferentes. De acuerdo a la mecánica cuántica, una vibración es IR activa o Raman activa si su momento dipolar varía durante la vibración.

El momento dipolar inducido en la molécula, proporcional al campo eléctrico del haz láser incidente, tiene la forma

$$\begin{pmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (1.9)$$

donde la primera matriz de la derecha es el tensor de polarizabilidad.

En el esparcimiento Raman normal, el tensor de polarizabilidad es simétrico: $\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$, $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$ y $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$.

En el caso de moléculas pequeñas, como CO_2 y H_2O , es fácil de comprobar si cambia o no la polarizabilidad durante la vibración. Convencionalmente introducimos $1/\sqrt{\alpha_i}$ en lugar de α_i y llamamos al cuerpo tridimensional resultante *polarizabilidad elipsoidal*. En la

Fig. 1.3 se muestran los cambios de polarizabilidad durante la vibración de la molécula de CO_2 .

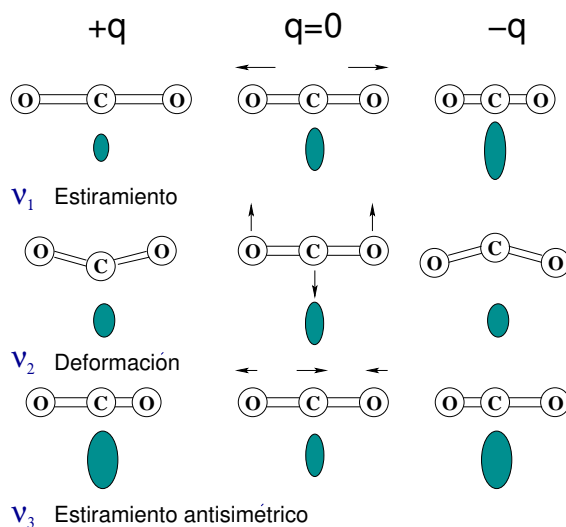


Fig. 1.3: Cambios de la polarizabilidad elipsoidal durante la vibración de la molécula de CO_2 .

En tal sentido, la vibración es Raman activa si su *dimensión, forma y orientación* varían durante la vibración normal. Durante la vibración ν_1 , la dimensión de la elipsoide varía ya que varían simultáneamente los elementos diagonales $(\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{zz})$, entonces la vibración es Raman activa. No obstante, aunque las dimensiones de la elipsoide varían durante la vibración ν_3 , las elipsoides en los extremos de los desplazamientos $(+q$ y $-q)$ son exactamente las mismas. Entonces, esta vibración no es Raman activa para un desplazamiento pequeño. La diferencia entre ν_1 y ν_3 se muestra en la Fig. 1.4. Notemos que la actividad Raman se determina de $(\frac{\partial \alpha}{\partial q})_0$ (inclinación alrededor de la posición de equilibrio). Durante la vibración ν_2 , la forma de la elipsoide es esférica en los dos extremos de las configuraciones. Sin embargo, las dimensiones de la elipsoide son exactamente las mismas en $+q$ y $-q$. Por lo tanto, esta no es Raman activa por la misma razón que para ν_3 .

En la Fig. 1.5 se ilustran los cambios de la polarización elipsoidal de las vibraciones normales de la molécula de agua, H_2O . Su vibración ν_1 es Raman activa, como la vibración ν_1 de CO_2 . La vibración ν_2 es también Raman activa porque la forma de la elipsoide es

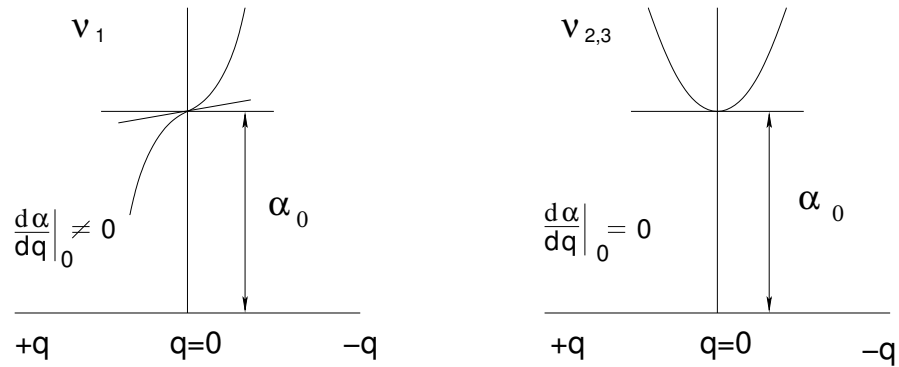


Fig. 1.4: Cambios en la polarizabilidad con respecto al desplazamiento de la coordenada durante las vibraciones ν_1 y $\nu_{2,3}$ en la molécula de CO_2 .

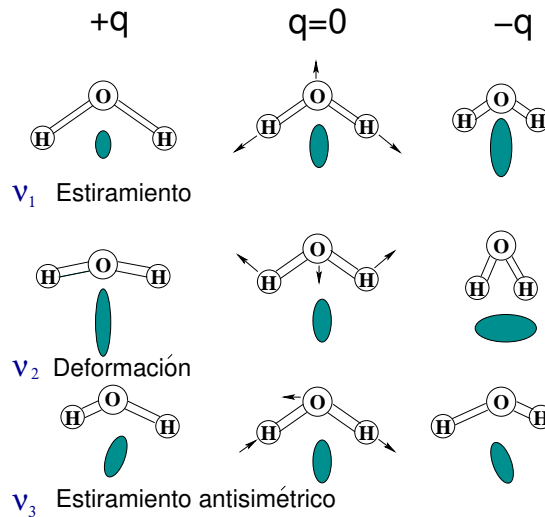


Fig. 1.5: Cambios de la polarizabilidad elipsoidal durante las vibraciones normales de la molécula de H_2O .

diferente en $+q$ y $-q$. En términos del tensor de polarizabilidad, todos los elementos α_{xx} , α_{yy} y α_{zz} varían con diferentes velocidades. Finalmente, la vibración ν_3 , es Raman activa porque la orientación de la elipsoide varía durante la vibración. Esta actividad ocurre porque un elemento no diagonal (α_{yz} en este caso), varía.

En la molécula de CO_2 , la vibración, simétrica con respecto a su centro de simetría (ν_1), es Raman activa y no IR activa, mientras que aquellas que son simétricas con respecto a su centro de simetría (ν_2 y ν_3) son IR activas y no Raman activas (*Principio de mutua*

exclusión) [22].

1.4. El Espectro Raman

Las transiciones vibratorias se pueden observar como espectros IR o Raman. Sin embargo, los orígenes físicos de estos dos espectros son marcadamente diferentes. En la espectroscopia Raman, la muestra es irradiada por un haz láser intenso en la región ultravioleta (UV)–cercana infrarroja (NIR), y la luz esparcida es usualmente observada en la dirección perpendicular al haz incidente (Fig. 1.6). Por otro lado, el espectro Raman se origina por la polarización electrónica causada por luz UV, visible, o NIR. Cuando la molécula es irradiada por una luz monocromática de frecuencia ν_0 , ésta se dispersa con la misma frecuencia ν_0 (**esparcimiento de Rayleigh**) y con las frecuencias $\nu_0 \pm \nu_s$ (**esparcimiento Raman**), donde ν_s representa la frecuencia vibratoria de la molécula. En la Fig. 1.6 se ilustra la diferencia entre las técnicas IR y Raman.

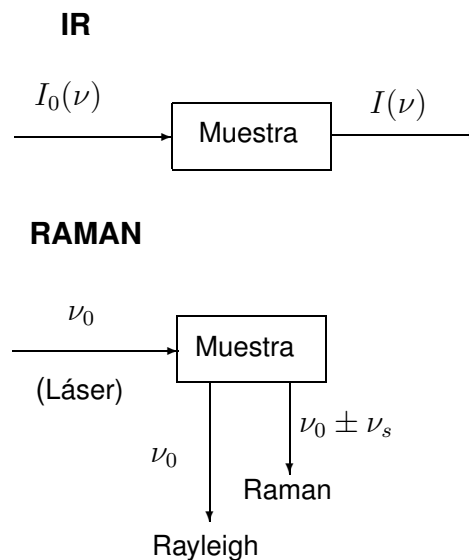


Fig. 1.6: Mecanismos de esparcimiento IR y Raman.

Aunque el esparcimiento Raman es mucho más pequeño que el esparcimiento Rayleigh

(en un factor de 10^{-3} hasta 10^{-5}), es aún posible observar el espectro Raman usando una fuente de excitación muy intensa. En el pasado, para observar el esparcimiento Raman, se utilizaron las líneas de mercurio de 435.8 nm (22938 cm^{-1}) y 404.7 nm (24705 cm^{-1}) de una lámpara de arco de mercurio a baja presión. Sin embargo, con el advenimiento de los láseres se revolucionó la espectroscopia Raman. Los láseres proporcionan una luz monocromática intensa en un rango ancho de longitudes de onda, como se muestra en la tabla 1.1 [23].

Láser	Modo	λ (nm)	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})
Láseres de gas			
ion-Ar	CW	488,0 (azul)	20491,8
		514,5 (verde)	19436,3
ion-Kr	CW	413,1 (violeta)	24207,2
		530,9 (verde/am.)	18835,9
		647,1 (rojo)	15453,6
He-Ne	CW	632,8 (rojo)	15802,8
He-Cd	CW	441,6 (azul/viol.)	22644,9
Nitrógeno	Pulsado	337,1 (UV)	29664,7
Excímero		308 (UV)	32467,5
Láseres de estado sólido			
Nd:YAG	CW o pulsado	1064 (NIR)	9398,4

Cuadro 1.1: Líneas láser más representativas en la Espectroscopia Raman.

Placzek [24] desarrolló una descripción clásica del efecto Raman vibratorio. Cuando el campo eléctrico de la luz interactúa con la muestra, las moléculas se polarizan y aparecen momentos dipolares proporcionales al campo eléctrico. Matemáticamente esta situación se representa en la forma

$$\mathbf{P}_i = \mathbf{p}_i + \alpha_{ij} \mathbf{E}_j + \beta_{ijk} \mathbf{E}_j \mathbf{E}_k + \gamma_{ijkl} \mathbf{E}_j \mathbf{E}_k \mathbf{E}_l + \dots \quad (1.10)$$

donde \mathbf{P}_i representa el momento dipolar de la molécula en la dirección i ; \mathbf{p}_i , el momento dipolar permanente; \mathbf{E}_i , el vector del campo eléctrico de la luz; α_{ij} , el tensor de polarizabi-

lidad; β_{ijk} y γ_{ijkl} son el primer y segundo tensor de hiper-polarizabilidad, respectivamente. Los subíndices i, j, k, l corren sobre las tres direcciones espaciales x, y, z . En el caso de la espectroscopia convencional con láseres CW ($E, 10^4$ V/cm), las contribuciones de los términos β_{ijk} y γ_{ijkl} en \mathbf{P}_i son insignificantes ya que $\alpha_{ij} \gg \beta_{ijk} \gg \gamma_{ijkl}$. No obstante, estas contribuciones se vuelven significantes, cuando la muestra es irradiada con pulsos láser extremadamente intensos ($\sim 10^9$ V/cm) generados por láseres de interruptor Q de rubí o de Nd:YAG¹ (10 – 100 μ W de potencia pico). Estos pulsos gigantes conducen a fenómenos espectroscópicos no lineales, como son *efecto hiper-raman*, *efecto Raman estimulado*, *efecto Raman inverso*, *esparcimiento Raman anti-Stokes coherente* (CARS), y la *espectroscopia Raman fotoacústica* (PARS) [25].

En este capítulo se analizará la espectroscopia convencional, donde se desprecian los términos de potencias mayores del campo eléctrico incidente. El dipolo permanente de la molécula y la polarizabilidad pueden cambiar si la molécula está vibrando. Expandiendo p_i y α_{ij} en una serie de Taylor en términos de las coordenadas generalizadas q_s (s determina el número de modos normales), se tiene

$$p_i = p_{0i} + \sum_{s=1}^r \left(\frac{\partial p_i}{\partial q_s} \right)_{q=0} q_s, \quad (1.11)$$

$$\alpha_{ij} = \alpha_{0ij} + \sum_{s=1}^r \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_s} \right)_{q=0} q_s \quad (1.12)$$

donde r es el número de modos vibratorios normales para N núcleos, y $p_i(0) = p_{0i}$ y $\alpha_{ij}(0) = \alpha_{0ij}$ son el momento dipolar y la polarizabilidad en la configuración de equilibrio $q_s = 0$.

Suponiendo que los desplazamientos atómicos son pequeños y de frecuencia ν_s , podemos expresar estos desplazamientos y el campo eléctrico de la luz en función del tiempo,

¹ Acrónimo de “Neodimium-doped Yttrium Aluminum Garnet”.

en la forma

$$q_s(t) = q_{0s} \cos(2\pi\nu_s t); \quad E_i(t) = E_{0i} \cos(2\pi\nu_0 t). \quad (1.13)$$

Despreciando los términos no lineales (β, γ , etc.) y sustituyendo las expresiones para p_i y α_{ij} en la ecuación (1.10), se obtiene

$$\begin{aligned} P_i = & p_{0i} + \sum_{s=1}^r \left(\frac{\partial p_i}{\partial q_s} \right)_{q=0} q_{0s} \cos(2\pi\nu_s t) + \alpha_{0ij} E_{0j} \cos(2\pi\nu_0 t) \\ & + q_{0s} E_{0j} \sum_{s=1}^r \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_s} \right)_{q=0} \{ \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_s) t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_s) t \} + \dots \end{aligned} \quad (1.14)$$

Seguidamente discutiremos el sentido físico de cada uno de los términos. El primer término de la ecuación (1.14)

$$\sum_{s=1}^k \left(\frac{\partial p_i}{\partial q_s} \right)_{q=0} q_{0s} \cos(2\pi\nu_s t), \quad (1.15)$$

representa la suma de los cambios periódicos en el momento dipolar de la molécula que pueden ser inducidos por cualquiera de las s vibraciones moleculares; la frecuencia de modulación del momento dipolar en el modo vibratorio dado es, por supuesto, la frecuencia vibratoria ν_s y, siempre y cuando $\left(\frac{\partial p_i}{\partial q_s} \right)_{q=0}$ sea diferente de cero, la molécula puede intercambiar energía con la luz de frecuencia igual a la frecuencia vibratoria. De esta manera es posible la absorción IR, donde los modos vibratorios se denominan modos **IR activos**.

El siguiente término,

$$\alpha_{0ij} E_{0j} \cos(2\pi\nu_0 t), \quad (1.16)$$

indica que la luz incidente de frecuencia ν_0 , induce un momento dipolar que oscila y emite una radiación con esta misma frecuencia (**esparcimiento elástico de Rayleigh**).

La ecuación (1.16) representa la parte constante de la polarizabilidad. El último término, (1.17),

$$q_{0s} E_{0j} \sum_{s=1}^k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_s} \right)_{q=0} \cos 2\pi(\nu_0 \pm \nu_s) t, \quad (1.17)$$

representa la parte del momento dipolar inducido por la luz y es también proporcional a la parte oscilatoria de la polarizabilidad. Por eso, si $\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_s} \right)_{q=0}$ es diferente de cero, los términos indicados corresponden a la luz esparcida con la suma y diferencia de frecuencias; este es el **esparcimiento Raman** (y el modo vibratorio es denominado **Raman activo**). Convencionalmente, al esparcimiento de la luz con disminución de la frecuencia se le llama **esparcimiento de Stokes** y el inverso, es decir, con aumento de la frecuencia, se le llama **esparcimiento de anti-Stokes** (Fig. 1.7) [26].

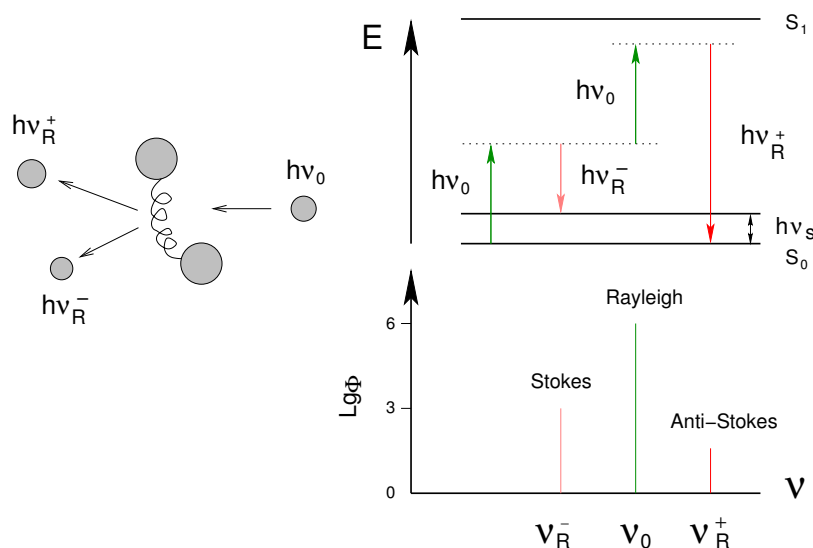


Fig. 1.7: Principio del esparcimiento Raman: a) Durante un impacto elástico del fotón de energía $h\nu_0$ con la molécula, el fotón esparcido tiene la misma energía (Rayleigh); si el impacto es inelástico, se esparce un fotón con energías menor o mayor a la energía del fotón incidente, en una cantidad igual a la energía vibratoria $h\nu_s$ de los átomos en la molécula. b) Diagrama de niveles: debido al fotón incidente, las moléculas son llevadas del estado vibratorio fundamental al estado vibratorio excitado, donde son esparcidos un fotón de luz de energía $h\nu_R^- = h\nu_0 - h\nu_s$ (línea de Stokes) y otro con energía $h\nu_R^+ = h\nu_0 + h\nu_s$ (línea de anti-Stokes).

A temperatura ambiente la mayoría de moléculas están en su estado vibratorio funda-

mental y, de acuerdo a la ley de Boltzmann, un número muy pequeño está en el estado excitado vibratorio. Por lo tanto, el proceso Raman, en el cual la energía vibratoria se transfiere a la molécula y emite un fotón de menor energía $h\nu_0 - h\nu_s$, tiene alta probabilidad comparado con el proceso inverso.

El espectro Raman de un líquido, que es obtenido con ayuda del arreglo experimental mostrado en la Fig. 1.8, es descrito por la ecuación (1.18). La muestra es irradiada a lo largo del eje z , la radiación Raman es observada en la dirección del eje y del sistema de coordenadas cartesianas de laboratorio fijas. La muestra es irradiada con una luz linealmente polarizada cuyo vector eléctrico es orientado en la dirección x , esto es perpendicular al plano de observación definido por la dirección de la irradiación y de la observación. La

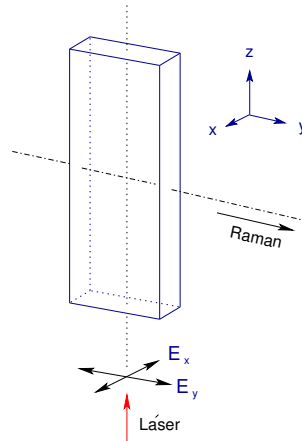


Fig. 1.8: Orientación del vector del campo eléctrico de la vibración excitadora con respecto al plano de observación yz .

potencia radiante observada es proporcional a la integral del coeficiente de esparcimiento Raman (sección transversal diferencial absoluta del esparcimiento Raman) $d\sigma/d\Omega$ en $\text{cm}^2 \text{sr}^{-1}$ con sección transversal σ y ángulo sólido Ω . Esto es, para la línea de Stokes de la vibración Raman activa $\tilde{\nu}$ está dada por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k_{\perp}}^{-} = \frac{\pi^2}{45 \varepsilon_0^2} \cdot \frac{b_k^2 (\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)^4}{1 - \exp(-hc\tilde{\nu}_k/kT)} \cdot g_k \cdot (45 \bar{\alpha}_k^2 + 7 \gamma_k^2) \cdot L. \quad (1.18)$$

Aquí $\tilde{\nu}_0$ y $\tilde{\nu}_k$ representan la frecuencia de la radiación de excitación y de la vibración de la muestra, respectivamente, y g_k es el grado de degeneración de esta vibración. La expresión $g_k \cdot (45 \bar{\alpha}_k^2 + 7 \gamma_k^2)$ se conoce con el nombre de *actividad de esparcimiento* y $b_k^2 = h/8\pi^2 c \tilde{\nu}_k$ es el cuadrado de la amplitud del punto cero de la vibración. Reduciendo la ecuación (1.18) se encuentra,

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k\perp}^- = \frac{h}{2^3 c \varepsilon_0^2} \cdot \frac{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)^4}{\tilde{\nu}_k [1 - \exp(-hc\tilde{\nu}_k/kT)]} \cdot g_k \cdot (\bar{\alpha}_k^2 + 7/45 \gamma_k^2) \cdot L. \quad (1.19)$$

El factor de campo interno,

$$L = (n_R/n_0)(n_R^2 + 2)^2 (n_0^2 + 2)^2/3^4, \quad (1.20)$$

(con índices de refracción n_0 y n_R correspondientes a las longitudes de onda de la radiación de excitación y Raman, respectivamente) toma en cuenta el incremento del campo eléctrico incidente y esparcido debido a la naturaleza dieléctrica del medio esparcidor.

Si el vector eléctrico de la radiación de excitación es orientado en dirección de b , paralelo al plano de la dirección de irradiación y observación, entonces el coeficiente de esparcimiento está dado por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k\perp}^- = \frac{h}{2^3 c \varepsilon_0^2} \cdot \frac{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)^4}{\tilde{\nu}_k [1 - \exp(-hc\tilde{\nu}_k/kT)]} \cdot g_k \cdot (6/45 \gamma_k^2) L. \quad (1.21)$$

En el caso del esparcimiento Raman de anti-Stokes, con el vector eléctrico de la radiación de excitación orientado perpendicularmente al plano de observación, el coeficiente de esparcimiento es

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k\perp}^+ = \frac{h}{2^3 c \varepsilon_0^2} \cdot \frac{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)^4}{\tilde{\nu}_k [\exp(hc\tilde{\nu}_k/kT) - 1]} \cdot g_k \cdot (\bar{\alpha}_k^2 + 7/45 \gamma_k^2) L. \quad (1.22)$$

La razón de los coeficientes de las líneas Raman de Stokes y anti-Stokes está dada por:

$$\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k_{\perp}}^{-} / \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{k_{\perp}}^{+} = \left(\frac{\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k}{\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_k}\right)^4 \cdot e^{hc\tilde{\nu}_k/kT}. \quad (1.23)$$

Esta ecuación permite determinar sin contacto la temperatura de la muestra [27]. En el tratamiento clásico el término exponencial no aparece. Este término resulta de argumentos puramente mecánico-cuánticos y está en concordancia con los resultados experimentales [28].

“El genio se compone del dos por ciento de talento y del 98 por ciento de perseverante aplicación”.

Ludwing Van Beethoven.

2

Microscopía Raman

La microscopía Raman fue rápidamente desarrollada desde el año de 1966, cuando *Delhaye y Migeon* [29] afirmaron que la intensidad de la señal Raman esparcida debe ser independiente del volumen. Así, como se mostró después experimentalmente, la intensidad de la señal permanece esencialmente constante con la disminución de las dimensiones de la muestra hasta las dimensiones determinadas por el límite de difracción, y, por lo tanto, de la longitud de onda de la excitación láser. Pocos años después se definieron los principios básicos de la microscopía Raman. El sistema óptico básico de la microscopía Raman emplea la configuración de esparcimiento especular [30].

Las características importantes de la microscopía Raman están directamente relacionadas con dos aspectos ópticos fundamentales, a saber:

- ❖ El enfoque de la excitación láser incidente sobre la muestra, y
- ❖ La colección de la luz esparcida.

Estos aspectos de la aplicación microscópica del efecto Raman se tratarán en las siguientes dos secciones.

2.1. Enfoque de la Excitación

En la espectroscopia Raman convencional el haz láser de bombeo es usualmente enfocado sobre la muestra con lentes de distancia focal de 10 – 30 cm. El haz láser es entonces concentrado en un “cilindro focal”. Con este proceso se alcanza una considerable ganancia en la intensidad del esparcimiento Raman. Se ha demostrado que el efecto de enfoque del haz láser, en este caso, no se manifiesta en una importante despolarización de la excitación. Se debe manifestar, no obstante, que la alta irradiancia láser puede dañar en algunos casos la muestra objeto de estudio.

El vector eléctrico de la excitación en la región focal dentro de la muestra está dado por la siguiente expresión [31]:

$$\mathcal{E} = \begin{pmatrix} i(I_0 + I_2 \cos 2\psi) \\ -I_2 \sin \psi \\ -2I_1 \cos \psi \end{pmatrix} \quad (2.1)$$

Aquí hemos supuesto que Z es la dirección de propagación del haz láser y que es plano-polarizado en la dirección de X antes de pasar a través del objetivo del microscopio. El ángulo ψ es medido en el sentido contrario a las agujas del reloj con respecto al eje X . Las integrales de la ecuación (2.1) se determinan, para el caso de no absorción y de una muestra isótropa de índice de refracción n , en la forma [32]:

$$I_0(u, v, n) = 2 \int_0^{\theta_m} D(\theta) \sin \theta \left[\frac{m}{n^2 \cos \theta + m} + \frac{1}{\cos \theta + m} \right] \\ \times \cos \theta J_0 \left[\frac{v \sin \theta}{\sin \theta_m} \right] e^{iu \cos \theta / \sin^2 \theta_m} \cos^{1/2} \theta d\theta, \quad (2.2)$$

$$I_1(u, v, n) = 2 \int_0^{\theta_m} D(\theta) \operatorname{sen} \theta \left[\frac{\operatorname{sen} \theta}{n^2 \cos \theta + m} \right] \cos \theta J_1 \left[\frac{v \operatorname{sen} \theta}{\operatorname{sen} \theta_m} \right] \times e^{iu \cos \theta / \operatorname{sen}^2 \theta_m} \cos^{1/2} \theta d\theta \quad (2.3)$$

y

$$I_2(u, v, n) = 2 \int_0^{\theta_m} D(\theta) \operatorname{sen} \theta \left[\frac{m}{n^2 \cos \theta + m} - \frac{1}{\cos \theta + m} \right] \times \cos \theta J_2 \left[\frac{v \operatorname{sen} \theta}{\operatorname{sen} \theta_m} \right] e^{iu \cos \theta / \operatorname{sen}^2 \theta_m} \cos^{1/2} \theta d\theta, \quad (2.4)$$

donde θ es el ángulo de incidencia del rayo de luz de excitación; $D(\theta) = N \operatorname{csc} \theta \exp(-\operatorname{sen}^2 \theta / \operatorname{sen}^2 \theta_m)$, representa la distribución radial gaussiana en el haz láser, y N es una constante de normalización. Un punto en la región focal se especifica por las coorde-

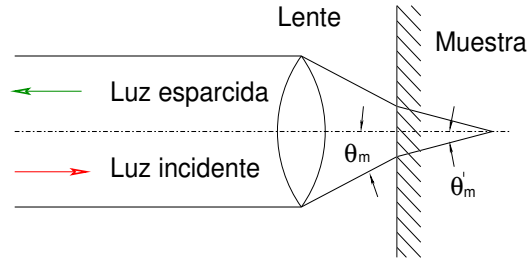


Fig. 2.1: Semiapertura efectiva θ'_m para la muestra de índice de refracción n .

nadas cilíndricas de menor dimensión $u = kZ \operatorname{sen}^2 \theta_m$ y $v = k(X^2 + Y^2)^{1/2} \operatorname{sen} \theta_m$, así como del ángulo ψ . Aquí $k = 2\pi/\lambda$ es el número de onda; $m = \sqrt{(n^2 - \operatorname{sen}^2 \theta)}$, y J_n son las funciones de Bessel de primer orden. Las integrales definidas por las ecuaciones (2.2), (2.3) y (2.4) son funciones del índice de refracción real e isótropo n de la muestra. Dentro de las muestras de índice de refracción mucho más grande que la unidad, el ángulo medio del cono θ_m puede ser reemplazado por $\theta'_m = \operatorname{sen}^{-1}[(1/n) \operatorname{sen} \theta_m]$, como se muestra en la Fig. 2.1 [33].

2.2. Óptica de Colección de Luz

Según la teoría de dispersión semiclásica de *Placzek* [24], que es totalmente adecuada para la descripción del efecto Raman normal, la intensidad de la luz esparcida está dada por:

$$\mathfrak{I}_s = I_e K |\tilde{\mathbf{e}}_e \alpha \mathbf{e}_s|^2 d\Omega, \quad (2.5)$$

donde $K = 4\pi^2 a^2 \bar{\nu}_s^4$, $a \approx 1/137$ y $\bar{\nu}_s$ es el número de onda de la luz esparcida. La energía esparcida por unidad de tiempo (intensidad) dentro del ángulo sólido $d\Omega$ está dada por \mathfrak{I} , mientras que I_e es la energía por unidad de área y por unidad de tiempo (irradiancia) de la excitación incidente sobre la muestra. Los vectores unitarios \mathbf{e}_e y \mathbf{e}_s definen las direcciones de los campos eléctricos y de la radiación incidente y la esparcida, respectivamente, y α es el tensor de esparcimiento.

La ecuación (2.5) muestra que la intensidad Raman total depende del ángulo sólido Ω en el cual es colectada la luz esparcida. En la configuración de esparcimiento especular Ω describe aproximadamente los conos de la luz incidente y esparcida. Cuando el eje del cono es colineal con Z y la excitación se considera polarizada en la dirección de X , la expresión para la intensidad Raman relativa tiene la forma:

$$\begin{aligned} \mathfrak{I} = & (\alpha_{XX}^2 A + \alpha_{XY}^2 A + \alpha_{XZ}^2 B) (2C_0 + C_2) \\ & + (\alpha_{YX}^2 A + \alpha_{YY}^2 A + \alpha_{YZ}^2 B) C_2 \\ & + (\alpha_{ZX}^2 A + \alpha_{ZY}^2 A + \alpha_{ZZ}^2 B) 4C_1, \end{aligned} \quad (2.6)$$

donde

$$C_j = 2\pi \int_0^\infty \int_0^\infty |I_j(u, v, n)|^2 v dv du, \quad j = 0, 1. \quad (2.7)$$

Los parámetros A y B , que se obtienen por integración sobre el cono de esparcimiento, se definen como:

$$A = \pi^2 \int_0^{\theta'_m} (\cos^2 \theta + 1) \sin \theta d\theta = \pi^2 \left(\frac{4}{3} - \cos \theta'_m - \frac{1}{3} \cos^3 \theta'_m \right) \quad (2.8)$$

y

$$B = 2\pi^2 \int_0^{\theta'_m} \sin^3 \theta d\theta = 2\pi^2 \left(\frac{2}{3} - \cos \theta'_m + \frac{1}{3} \cos^3 \theta'_m \right), \quad (2.9)$$

donde θ'_m es el ángulo medio efectivo. Los parámetros A , B y los valores de las integrales C_j son funciones del índice de refracción, n .

La ecuación (2.6) sirve como base para la interpretación de las medidas de la polarización en un medio isótropo. Si la luz esparcida es analizada en la dirección X paralela a la dirección de la polarización de la excitación, la intensidad de la luz esparcida está dada por:

$$\begin{aligned} \mathfrak{I}_{\parallel} = & (\alpha_{XX}^2 A + \alpha_{XZ}^2 B) (2C_0 + C_2) + (\alpha_{YX}^2 A + \alpha_{YZ}^2 B) C_2 \\ & + (\alpha_{ZX}^2 A + \alpha_{ZZ}^2 B) 4C_1. \end{aligned} \quad (2.10)$$

Por otro lado si el análisis es perpendicular a la dirección de polarización de la excitación, la expresión para la intensidad toma la forma:

$$\begin{aligned} \mathfrak{I}_{\perp} = & (\alpha_{XY}^2 A + \alpha_{XZ}^2 B) (2C_0 + C_2) + (\alpha_{YY}^2 A + \alpha_{YZ}^2 B) C_2 \\ & + (\alpha_{ZY}^2 A + \alpha_{ZZ}^2 B) 4C_1. \end{aligned} \quad (2.11)$$

Así, los valores diferentes de cero de B , C_1 y C_2 se usan para evaluar la “pérdida de polarización” que se observa en el espectro Raman de una muestra de cristal puro.

Para muestras líquidas y gaseosas las intensidades de la luz esparcida son dadas en

términos de los tensores invariantes Σ^0 , Σ^1 y Σ^2 en la forma:

$$\begin{aligned} \mathfrak{J}_{\parallel} = & \left[\frac{1}{3}A\Sigma^0 + \frac{1}{6}B\Sigma^1 + \left(\frac{2}{15}A + \frac{1}{10}B \right) \Sigma^2 \right] 2C_0 \\ & + \left[\frac{1}{3}B\Sigma^0 + \frac{1}{6}A\Sigma^1 + \left(\frac{1}{10}A + \frac{2}{15}B \right) \Sigma^2 \right] 4C_1 \\ & + \left[\frac{1}{3}A\Sigma^0 + \left(\frac{1}{6}A + \frac{1}{3}B \right) \Sigma^1 + \left(\frac{7}{30}A + \frac{1}{5}B \right) \Sigma^2 \right] 4C_2, \end{aligned} \quad (2.12)$$

y

$$\begin{aligned} \mathfrak{J}_{\perp} = & \left(\frac{1}{6}\Sigma^1 + \frac{1}{10}\Sigma^2 \right) (A+B)2C_0 \\ & + \left[\frac{1}{3}B\Sigma^2 + \frac{1}{6}A\Sigma^1 + \left(\frac{1}{10}A + \frac{2}{15}B \right) \Sigma^2 \right] 4C_1 \\ & + \left[\frac{1}{3}A\Sigma^0 + \left(\frac{1}{6}A + \frac{1}{3}B \right) \Sigma^1 + \left(\frac{7}{30}A + \frac{1}{5}B \right) \Sigma^2 \right] C_2, \end{aligned} \quad (2.13)$$

respectivamente. De estas dos expresiones podemos determinar la relación de despolarización $\rho = \mathfrak{J}_{\perp}/\mathfrak{J}_{\parallel}$.

Las ecuaciones (2.10) y (2.11) se utilizan en la interpretación del espectro Raman en muestras isótropas y anisótropas. En el caso de muestras isótropas se pueden obtener relaciones de despolarización correctas aún cuando se usen objetivos con alta apertura numérica. Sin embargo, si se incluye un divisor de haz, sus características de reflexión y transmisión deben ser evaluadas e introducir las correcciones apropiadas.

2.3. Muestras Absorbentes

Las muestras absorbentes presentan ciertas dificultades prácticas. Para la configuración tradicional de 90° , cuando se analizan espectros Raman de soluciones, se ha demostrado que hay una concentración óptima. Así, la intensidad Raman relativa, como una función de la concentración, muestra un máximo. El modelo simple es cualitativamente consistente

con esta observación, aunque la concordancia cuantitativa con las medidas experimentales no se ha obtenido.

El análisis se ha hecho sobre la base de la geometría mostrada en la Fig. 2.2. Se

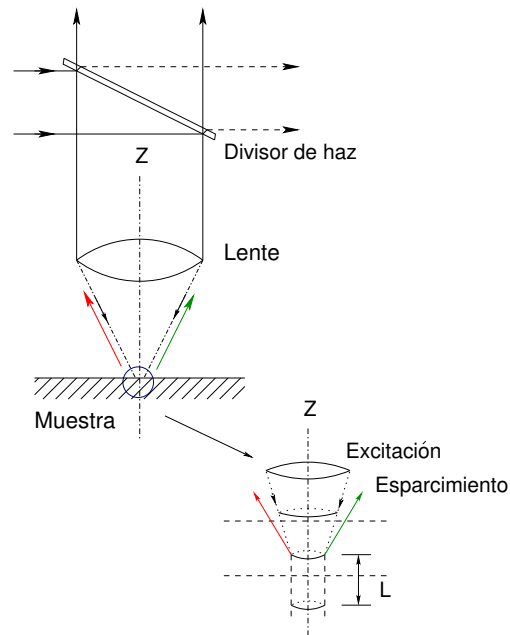


Fig. 2.2: Geometría del esparcimiento especular.

considera que la excitación láser es un haz paralelo dentro del cilindro focal. Para una distribución radial gaussiana en el haz de excitación, la irradiancia en el punto dentro de la muestra está dada por:

$$I_e = I_e^0 e^{-c\epsilon_e Z} e^{-4(X^2+Y^2)/d^2}. \quad (2.14)$$

La intensidad de la luz, que es esparcida por el volumen $dXdYdZ$ dentro de la muestra, se puede expresar en la forma:

$$d\mathcal{J}_s^0 \propto I_e c dXdYdZ, \quad (2.15)$$

entonces la intensidad de la luz esparcida en la dirección de Z toma la forma:

$$d\mathfrak{J}_s = d\mathfrak{J}_s^0 e^{-c\varepsilon_s Z}. \quad (2.16)$$

Las ecuaciones (2.4) y (2.16) conducen a la relación:

$$d\mathfrak{J}_s \propto I_e^0 c e^{-c(\varepsilon_s + \varepsilon_e)Z} dZ e^{-4(X^2 + Y^2)/d^2} dXdY, \quad (2.17)$$

cuya integración arroja aproximadamente,

$$\mathfrak{J}_s \propto \frac{\pi(1 - 1/e)}{16} \frac{I_e^0 d^2}{\varepsilon_e + \varepsilon_s} (1 - e^{-c(\varepsilon_e + \varepsilon_s)L}). \quad (2.18)$$

Aquí, L es la profundidad de foco efectiva y d es el diámetro de la mancha del láser dentro de la muestra (ver Fig. 2.1).

Un problema que surge de la absorción de la muestra es su degradación debida a la influencia de la excitación láser intensa. El “incendio” de especímenes es seguramente debido a la combinación de los efectos térmicos y a la descomposición fotoquímica. Sin embargo, es un problema muy serio en la microscopía Raman que hasta ahora no ha recibido la suficiente atención [34].

2.4. Rodaja Delgada de una Muestra

Consideremos, en el plano del objeto, una rodaja muy delgada de una muestra isotrópica y homogénea cuya superficie S_0 está definida por el cuello del haz láser enfocado (ver Fig.2.3). Asumiendo un perfil radial para la excitación láser, esta rodaja se puede considerar como una fuente de luz Raman emitiendo uniformemente en todas direcciones. El flujo de luz Raman elemental capturado por el objetivo de microscopio para un ángulo de

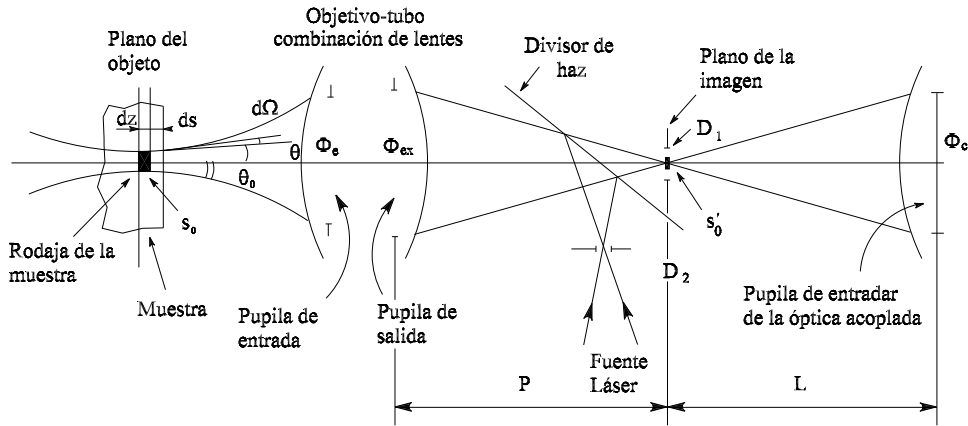


Fig. 2.3: Colección del flujo Raman de una rodaja de muestra por un objetivo de microscopio.

esparcimiento especular θ y un ángulo elemental sólido $d\Omega$ se puede expresar como:

$$d^3\phi = L_R d^2\mathcal{E}, \quad (2.19)$$

donde L_R y $d^2\mathcal{E}$ son la fuente de luminancia Raman (brillo) y el extendido geométrico o el movimiento del tubo elemental de luz Raman, como se define por θ y $d\Omega$, respectivamente,

$$L_R = \left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right) \rho I_0 dz, \quad (2.20)$$

donde $\left(\frac{d\sigma}{d\Omega} \right)$ es la sección transversal diferencial Raman para la banda dada y para una longitud de onda de excitación dada, ρ es la densidad molecular (número de moléculas por unidad de volumen), I_0 es la irradiancia láser en la muestra (potencia por unidad de área) y dz es el espesor de la rodaja. La extensión geométrica está dada por:

$$d^2\mathcal{E} = ds \cos \theta d\Omega, \quad (2.21)$$

donde ds es la superficie elemental alrededor de un punto dado de la superficie de la rodaja, θ y Ω ya se definieron anteriormente. El flujo total que entra en el instrumento es entonces:

$$d\phi_0 = L_R \mathcal{E} = L_R \int_0^{s_0} ds \int_0^{\theta_0} d^2\mathcal{E}, \quad (2.22)$$

donde θ_0 es el ángulo de aceptación media para el objetivo de microscopio.

Asumiendo ahora que dz y s_0 son pequeños comparados con la distancia de trabajo y al diámetro frontal del lente, respectivamente, \mathcal{E} puede escribirse en la forma:

$$\mathcal{E} = 2\pi \int_0^{s_0} ds \int_0^{\theta_0} \sin \theta \cos \theta d\theta. \quad (2.23)$$

Entonces, después de la integración,

$$d\phi_0 = L_R \pi s_0 \sin^2 \theta_0. \quad (2.24)$$

El flujo de luz Raman que entra al instrumento es proporcional al cuadrado de la apertura numérica del objetivo. Por lo tanto, una ganancia significativa en la eficiencia de la colección de la luz para la muestra delgada se puede alcanzar con el uso de objetivos con apertura numérica larga.

“No hay amor más sincero que el amor a la comida”.

George Bernard Shaw.

3

Aminoácidos y Proteínas

En el estudio de los procesos que ocurren en los organismos vivos, se hace hincapié en la bioquímica de las proteínas ya que ellas están presentes en el mayor número y mayor variedad de eventos que cualquier otro tipo de biomoléculas.

La característica estructural más general de una proteína es que es un polímero, es decir, una gran molécula compuesta de unidades pequeñas unidas covalentemente de un modo característico. Estas unidades monoméricas son los *aminoácidos* y el tipo de unión implicado se conoce como *enlace peptídico*. En este capítulo se hace una descripción general de los aminoácidos y de las proteínas.

3.1. Aminoácidos

Actualmente, hay unos 200 aminoácidos conocidos que se encuentran en la naturaleza. Muchos de éstos existen solamente en determinadas especies, y algunos se han encon-

trado sólo en un organismo. Se encuentran libres disueltos en el protoplasma o unidos covalentemente con otros aminoácidos en péptidos y proteínas.

La mayoría de los aminoácidos naturales poseen la estructura general mostrada en la Fig.3.1 en tres representaciones equivalentes. Cada una representa un *aminoácido*

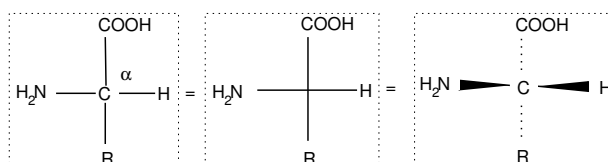


Fig. 3.1: Estructura general de los aminoácidos.

α , donde los grupos funcionales amino ($-\text{NH}_2$) y carboxílico ($-\text{COOH}$) están unidos al carbono α . Al pH fisiológico, ambos existen casi exclusivamente en forma iónica.

La característica estructural que distingue un aminoácido α de otro, es la naturaleza química del grupo **R**. Puede variar desde H—(un simple átomo de hidrógeno) en la glicina a una estructura compleja, tal como se muestra en la Fig.3.2 (el grupo guanidino) en la

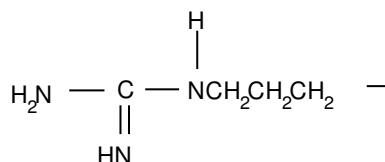


Fig. 3.2: Grupo guanidino en la arginina.

arginina. En la tabla 3.1 se muestran los aminoácidos apolar y polar al un pH fisiológico.

3.1.1. Estereoisomerismo de los Aminoácidos

Con la notable excepción de la glicina, el átomo de carbono α en los aminoácidos está unido a cuatro átomos o grupos de átomos diferentes. Debido a esta característica estructural, los aminoácidos pueden existir en diferentes configuraciones *estereoisoméricas*, que se distinguen unas de otras por la orientación espacial de los grupos unidos al carbono α . Por cada carbono α presente existen dos configuraciones distintas y por lo tanto, para una

Apolar	Polar
Alanina	Glicina
Valina	Serina
Leucina	Treonina
Isoleucina	Cisteina
Metionina	Tirosina
Fenilalanina	Ácido aspártico
Triptófano	Asparragina
Prolina	Ácido glutámico
	Glutamina
	Lisina
	Histidina
	Arginina

Cuadro 3.1: Clasificación de los α aminoácidos con base en la polaridad de las cadenas laterales al pH fisiológico.

sustancia con sólo uno de tales átomos de carbono el número de estereoisómeros diferentes es dos. De los veinte aminoácidos comunes sólo la treonina y la isoleucina tienen más de un carbono asimétrico. Las dos formas diferentes se conocen como configuraciones L y D, designación basada en la relación de la configuración de los carbonos α a la conocida configuración de los dos estereoisómeros del gliceraldehído. Por convención, la forma L del gliceraldehído designa la estructura mostrada en la Fig.3.3, en donde el grupo -OH está orientado espacialmente hacia la izquierda. La forma D del gliceraldehído (Fig.3.4) corresponde al isómero estructural en donde el grupo -OH está orientado hacia la derecha. *Sólo los aminoácidos L existen en las proteínas.*

3.1.2. Propiedades Iónicas de los Aminoácidos

Los valores de pK_a de los grupos α -carboxilo y α -amino están en la vecindad de 2 y 9-10 respectivamente, y al pH fisiológico prevalente de aproximadamente 7 ambos grupos funcionales existirán ionizados ($-\text{COO}^-$ y $-\text{NH}_3^+$) dando un switterion. Esta estructura de switterion caracteriza también a los aminoácidos en el estado sólido cristalino.

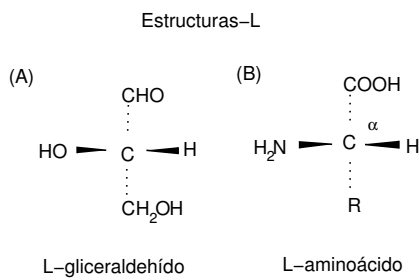


Fig. 3.3: A) Fórmula de proyección del L-gliceraldehído; B) Fórmula de proyección de un L- α aminoácido.

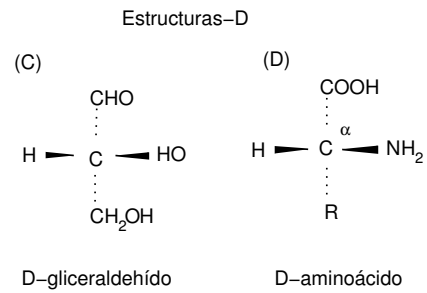


Fig. 3.4: C) Fórmula de proyección del D-gliceraldehído; D) Fórmula de proyección de un D- α aminoácido.

La carga molecular neta de algunos aminoácidos refleja también la presencia de un tercer grupo ionizable en la cadena lateral R. En la forma completamente protonada de los compuestos, mostrada en la Tabla 3.1, se pueden designar como *ácidos trifuncionales*. De los 20 aminoácidos enumerados en esta categoría están el ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, cisteína, tirosina, lisina y arginina. Debido a la presencia de un grupo carboxílico extra, con un valor de pK_a distintivamente ácido, los ácidos glutámico y aspártico se denominan *aminoácidos ácidos*. En el otro extremo, con el valor de pK_a característicamente básico, tenemos a *lisina* y *arginina*, que se denominan *aminoácidos básicos*. La histidina, la cisteína y la tirosina no están nítidamente separadas y se pueden clasificar como sustancias débilmente básicas o débilmente ácidas. Todos los demás aminoácidos comunes enumerados en la Tabla 3.1 se clasifican como *neutros*, puesto que sus grupos R no aportan cargas.

Un *péptido* consta de dos o más aminoácidos unidos covalentemente entre sí por enlaces peptídicos (Fig.3.5). A pesar de la identidad del aminoácido, cada posición en el péptido se denomina *residuo aminoacídico*, o simplemente *residuo*. Si el péptido contiene 2-10 residuos, a la sustancia se la denomina *oligopéptido*. Frecuentemente, el número de residuos en los oligopéptidos se especifica por el uso de los prefijos griegos: dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptido, y así sucesivamente. Un péptido con más de 10 residuos se llama *polipéptido*. Aunque existen péptidos cíclicos y ramificados, la mayoría de los péptidos

tiene *disposición lineal, en forma de cadena con dos residuos terminales*. Puesto que el enlace entre residuos sucesivos implica los grupos α -carboxilo y α -amino de aminoácidos adyacentes, se deduce que un residuo terminal poseerá un grupo amino libre y un grupo carboxilo libre. El primero se denomina *residuo N-terminal* y el último *residuo C-terminal*.

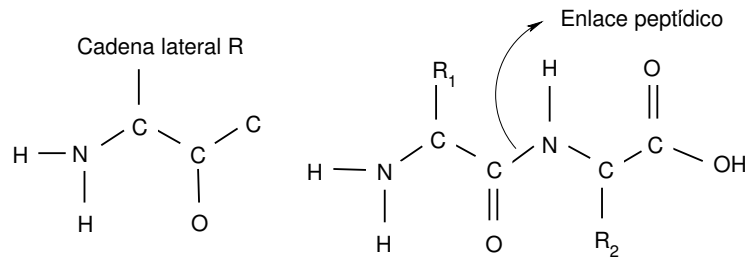


Fig. 3.5: Enlace peptídico.

3.2. Proteínas

Las proteínas consisten de una o más cadenas polipeptídicas, plegado de una manera específica que es determinado fundamentalmente por cadenas laterales de los aminoácidos comprimidos. La estructura de las proteínas puede considerarse en varios niveles de estructura. En primer lugar, hay una estructura primaria, la cual es la secuencia de diferentes aminoácidos de cadenas polipeptídicas. Este nivel más bajo de estructura determina todos los otros niveles y por eso la actividad biológica de la proteína en conjunto. La estructura secundaria describe la manera en que la cadena del polipéptido se pliega localmente en una estructura estable de secuencia regular como α hélices y β hojas plegadas (ver Fig.3.6). La estructura terciaria describe el plegado de estas estructuras secundarias en la proteína final. Finalmente, la estructura cuaternaria describe la manera en que varias cadenas polipeptídicas (o subunidades) ensambla en largas estructuras proteicas como, por ejemplo, dímeros o tetrameros. Un ejemplo de dímero es la proteína tubulina, que se muestra en la Fig.3.7. Las proteínas constituyen aproximadamente el 50 % del peso total

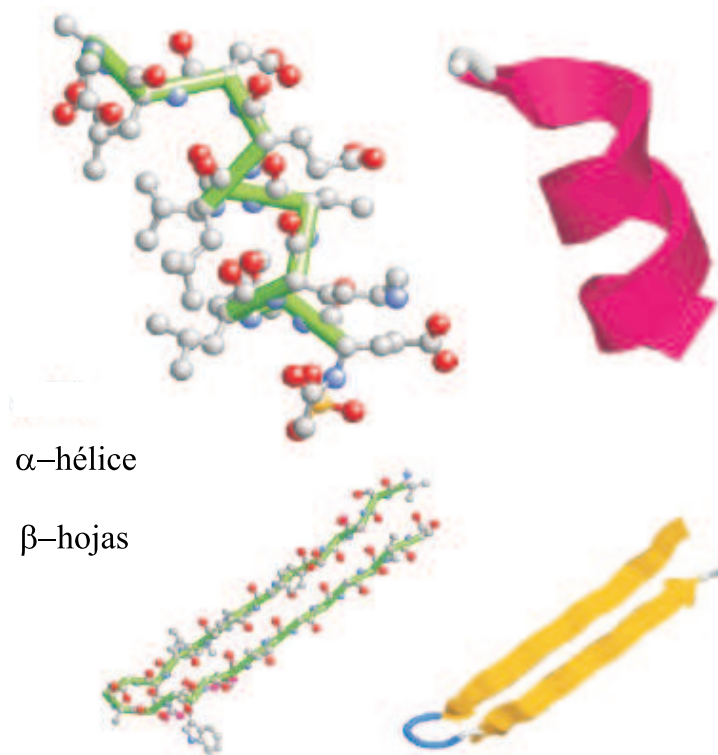


Fig. 3.6: Estructura de los α -hélice (arriba) y β -hojas (abajo).

de la materia biológica, y juega un papel central en la mayoría de procesos biológicos. Sus tamaños individuales pueden ir de 50 a más de 2000 unidades de aminoácido, que corresponden a pesos moleculares que van desde 5.5 a 220 kd (kilodalton). Diferentes proteínas pueden tener diversas funcionalidades. Las proteínas específicas llamadas enzimas catalizan reacciones (bio)químicas particulares, incrementando las velocidades de reacción correspondientes en un millón de dobles o más. Los anticuerpos están envueltos en la defensa inmunológica de un organismo. Algunas proteínas son responsables para el transporte regulado de los químicos a través del organismo (por ejemplo, la hemoglobina para el transporte del oxígeno). Las proteínas motoras son capaces de convertir la energía química en la energía mecánica, efectuando el trabajo físico. Una última clase importante de proteínas que queremos mencionar es aquella que contiene proteínas que son parte del citoesqueleto, es decir, el conjunto de moléculas que ayudan a mantener la forma mecánica

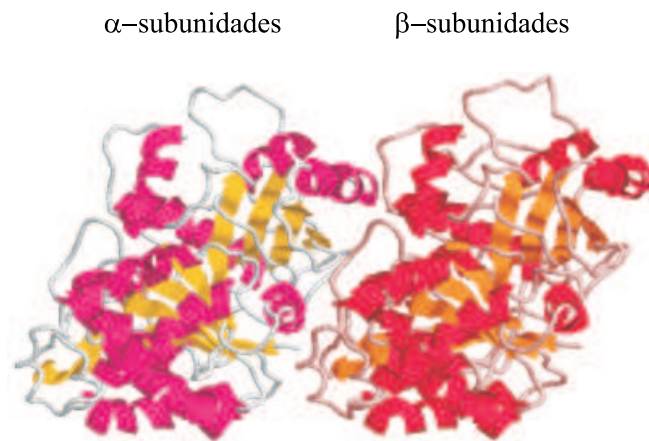


Fig. 3.7: Estructura de la proteína tubulina dimérica, consistente de dos 50 kd subunidades α y β tubulina. La tubulina es el constituyente de los microtubos filamentosos.

rígida de una célula [35].

“Más que las ideas, a los hombres los separan los intereses”.

Alexis de Tocqueville.

4

Análisis Estadístico

Para el análisis de un conjunto muy grande de datos, como es el caso de los espectros Raman de muestras biomédicas, se usan dos técnicas del Análisis Multivariante, el Análisis en Componentes Principales (PCA) y el Análisis Discriminante Lineal (LDA). El PCA descubre o reduce la dimensionalidad del conjunto de datos e identifica las nuevas variables significativas llamadas Componentes Principales (PC's). El LDA maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de los grupos.

4.1. Datos Multivariantes

Un conjunto de datos multivariantes describe objetos y sus características. Un objeto puede ser, por ejemplo, una muestra, un espectro o una estructura química. Los objetos son caracterizados por un conjunto predefinido de características. Una característica es una variable numérica que describe un aspecto de los objetos; las características típicas,

por ejemplo, son las concentraciones de sustancias seleccionadas o las intensidades de señales espectrales. Una buena aplicación de los métodos estadísticos requiere un número razonable de objetos y características; típicamente para problemas químicos son de 20 a 1000 objetos y de 3 a 500 características. Tales datos son mejor descritos por una matriz X , que contiene una fila para cada uno de los objetos n , y una columna para cada una de las características p .

Cada característica puede ser considerada como una coordenada de un punto; cada objeto corresponde entonces a un punto en un espacio de característica p -dimensional. La hipótesis fundamental para la interpretación de datos multivariantes es la existencia de relaciones entre las posiciones o las distancias de puntos (objetos) y las propiedades relevantes. Un plano de esparcimiento es una representación bidimensional del espacio de características en el cual, por ejemplo, cada punto corresponde a un objeto (Fig.4.1). Si se seleccionan dos características como un plano de coordenadas se obtiene un plano

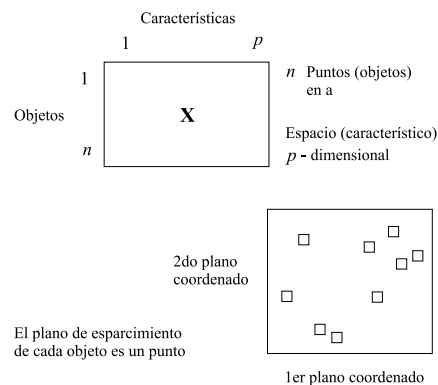


Fig. 4.1: Datos multivariantes y variables latentes. En un plano de característica simple se usan dos características seleccionadas como un plano de coordenadas. En los métodos multivariantes típicos (PCA, PLS) se usan las variables latentes como plano de coordenadas. Muchos métodos usan variables latentes que son funciones lineales de todas las características; esto corresponde a una proyección sobre una línea recta.

de características; tal plano, sin embargo, utiliza sólo una parte pequeña de la información de los datos. El concepto esencial del análisis de datos multivariantes es el uso de las llamadas *variables latentes* (PC's) como plano de coordenadas. Una variable latente es

una función matemática de todas las características y por consiguiente puede contener mucho más información que un par de características. Los diferentes métodos para calcular las variables latentes pueden agruparse en métodos lineal y no lineal. El principio del PCA consiste en una representación de los datos multivariantes p -dimensionales por un número mínimo de variables latentes.

4.2. Proyección del Espacio Característico

Una dirección particular que define una variable latente lineal en un espacio característico p -dimensional se describe por un vector \mathbf{a} (a_1, a_2, \dots, a_p) que es usualmente escalado a la misma longitud. El valor de la variable latente correspondiente u para un objeto \mathbf{x} (x_1, x_2, \dots, x_p) se obtiene proyectando el objeto punto sobre una línea recta que se define por la dirección \mathbf{a} (Fig.4.2). Matemáticamente ésta es una combinación lineal de las carac-

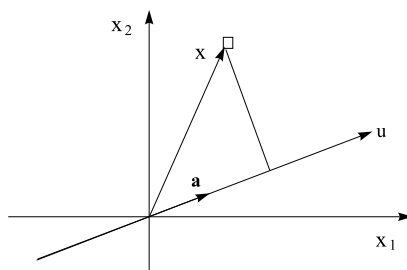


Fig. 4.2: Proyección de un vector objeto \mathbf{x} sobre una línea recta que define una variable latente a través del vector \mathbf{a} . El valor (cuenta) de la variable latente es u . El número de características, p , es dos en este esquema pero en aplicaciones químicas normalmente está entre 5 y 200.

terísticas x_j del objeto y de las componentes de vector \mathbf{a}_j ; una anotación equivalente es el producto escalar de los vectores \mathbf{a}^T y \mathbf{x} .

$$u = \mathbf{a}^T \mathbf{x} = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_px_p \quad (4.1)$$

El valor de una variable latente se llama una *cuenta* (score); las cuentas se usan a menudo como plano de coordenadas. Las componentes vectoriales a_j se llaman pesos; ellos definen la dirección de la variable latente en el espacio característico y ellos describen las contribuciones de las características individuales a las cuentas. Normalmente se usan dos direcciones ortogonales a_1 y a_2 como ejes de proyección (el producto de $a_1 \cdot a_2$ es cero) para definir un plano de proyección.

4.3. Análisis en Componentes Principales

El PCA es una de las técnicas multivariantes más antiguas y ampliamente usadas. Originalmente fue introducida por Pearson [36] e independientemente por Hotelling [37].

La variable latente que mejor describe las distancias relativas entre los objetos está dada por la dirección con la máxima varianza. Esta dirección se llama el primer componente principal (PC1). El segundo componente principal (PC2) es ortogonal a PC1 y de nuevo tiene la varianza posible máxima. Los demás componentes principales se pueden determinar de la misma manera. Para los datos con n objetos y p características el número máximo de componentes principales se da por el mínimo de p y n . La determinación de todos los componentes principales corresponde a una rotación del sistema de coordenadas p -dimensional. En muchos casos se usan solamente PC1 y PC2 para definir un plano de proyección para una inspección visual de los datos multivariantes. Notar que el coeficiente de correlación entre dos de los coeficientes de la correlación entre cualquier par de componentes es cero; el PCA es, por consiguiente, a menudo usado para transformar los datos que exhiben las más altas características de correlación en un conjunto de nuevas variables sin correlación (las cuentas PC).

En la Fig.4.3 un ejemplo bidimensional con seis objetos demuestra la variable latente con la máxima varianza (PC1) en comparación con la otra variable latente que separa

óptimamente las dos clases dadas de objetos. La relevancia de un componente principal

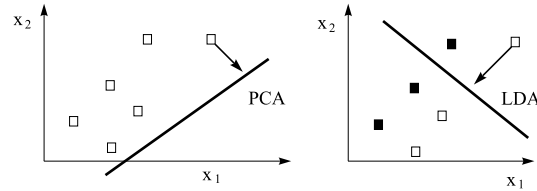


Fig. 4.3: Diferentes vistas de las variables latentes definidas. El PCA preserva las distancias entre los objetos por una variable latente que posee la máxima varianza de las cuentas. El LDA, análisis de discriminación lineal, resulta en una variable latente que permite la separación máxima entre dos clases dadas.

es medida por la varianza de las cuentas correspondientes expresadas en porcentaje de la varianza total (calculada como la suma de las varianzas de todas las características). Si la suma de las varianzas de dos cuentas, que se usan como proyección de coordenadas, es alta (por ejemplo, alrededor de 70 % de la varianza total) entonces el plano de esparcimiento representa una buena visualización bidimensional de la estructura de datos p-dimensional.

4.3.1. Definición de los Componentes Principales

El primer componente principal PC1 de las observaciones es una combinación lineal, u_1 , de las variables originales,

$$u_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \cdots + a_{1p}x_p, \quad (4.2)$$

cuya varianza de la muestra es grande para todos los coeficientes, a_{11}, \cdots, a_{1p} (al cual lo podemos escribir como el vector \mathbf{a}_1). Ya que la varianza de u_1 puede incrementarse sin límite simplemente por incrementos de los elementos de \mathbf{a}_1 , se coloca la siguiente restricción a estos coeficientes: $\mathbf{a}_1' \mathbf{a}_1 = 1$.

El segundo componente principal PC2, u_2 es una combinación lineal

$$u_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \cdots + a_{2p}x_p \quad (4.3)$$

es decir, $u_2 = \mathbf{a}'_2 \mathbf{x}$, el cual tiene una varianza grande que está sujeta a las dos siguientes restricciones

$$\mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_2 = 1, \quad \mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_1 = 0. \quad (4.4)$$

Similarmente la componente principal j -ésima es la combinación lineal

$$u_j = \mathbf{a}'_j \mathbf{x} \quad (4.5)$$

la cual tiene una varianza grande que está sujeta a las restricciones

$$\mathbf{a}'_j \mathbf{a}_j = 1, \quad \mathbf{a}'_j \mathbf{a}_i = 0, \quad (i < j). \quad (4.6)$$

Para buscar los coeficientes que definan a la primera componente principal nosotros necesitamos elegir los elementos de \mathbf{a}_1 de tal manera que minimice la varianza de u_1 , sujeto a la restricción, $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1$. La varianza de u_1 está dada por

$$Var(u_1) = Var(\mathbf{a}'_1 \mathbf{x}) = \mathbf{a}'_1 \mathbf{S} \mathbf{a}_1, \quad (4.7)$$

donde \mathbf{S} es la matriz de varianza-covarianza de las variables originales.

Un procedimiento estándar para maximizar una función de varias variables, sujeta a una o más restricciones, es el método de *Multiplicadores de Lagrange*. Aplicando esta técnica para maximizar la varianza de u_1 , como se da en (4.7), sujeta a la restricción, $\mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1$, conlleva a la solución que \mathbf{a}_1 es el vector propio de \mathbf{S} , correspondiente al valor propio

más grande. Para determinar la segunda componente, la técnica de los multiplicadores de Lagrange es seguidamente usada para maximizar la varianza de u_2 , $\mathbf{a}'_2 S \mathbf{a}_2$, sujeta a dos restricciones $\mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_2 = 1$ y $\mathbf{a}'_2 \mathbf{a}_1 = 0$. Esto conlleva a la solución que \mathbf{a}_2 es el vector propio de S correspondiente a su segundo valor propio más grande. Similarmente la componente principal j -ésima está definida por el vector propio asociado con el j -ésimo valor propio más grande.

Si los valores propios de S son $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ entonces es fácil de mostrar que por una elección de $\mathbf{a}'_i \mathbf{a}_i = 1$ la varianza del componente principal i -ésimo está dado por λ_i . Por ejemplo, u_1 tiene varianza dada por (4.7); ahora si \mathbf{a}_1 es un vector propio de S , nosotros sabemos que

$$S \mathbf{a}_1 = \lambda_1 \mathbf{a}_1 \quad (4.8)$$

por lo que (4.7) se puede reescribir como

$$Var(u_1) = \mathbf{a}'_1 \lambda_1 \mathbf{a}_1 = \lambda_1 \mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = \lambda_1 \quad (\text{ya que } \mathbf{a}'_1 \mathbf{a}_1 = 1). \quad (4.9)$$

La varianza total de los p componentes principales será igual a la varianza total de las variables originales, tal que

$$\sum_{i=1}^p \lambda_i = \text{traza}(S). \quad (4.10)$$

Consecuentemente, la j -ésima componente principal da cuenta de la proporción

$$t = \frac{\lambda_j}{\text{traza}(S)} \quad (4.11)$$

de la variación total en los datos originales y primeramente, digamos p_1 , las componentes

($p_1 < p$) responden de una proporción

$$T = \frac{\sum_{i=1}^{p_1} \lambda_i}{\text{traza}(S)} \quad (4.12)$$

de la variación total.

4.3.2. Correlaciones de Variables y Componentes

La covarianza de las variables observadas con la j -ésima componente principal se encuentran fácilmente como sigue:

$$\text{Cov}(\mathbf{x}, \mathbf{u}_j) = \text{Cov}(\mathbf{x}, \mathbf{x}' \mathbf{a}_j) = \mathbf{E}(\mathbf{x}\mathbf{x}') \mathbf{a}_j = \mathbf{S} \mathbf{a}_j = \lambda_j \mathbf{a}_j. \quad (4.13)$$

Consecuentemente la covarianza de la variable i con una componente j está dada por

$$\text{Cov}(x_i, u_j) = \lambda_j a_{ji} \quad (4.14)$$

y la correlación de la variable i con la componente j es por lo tanto

$$r_{x_i u_j} = \frac{\text{Cov}(x_i, u_j)}{\sigma_{x_i} \sigma_{u_j}} = \frac{\lambda_j a_{ji}}{s_{ii}^{1/2} \sqrt{\lambda_j}} = \frac{\sqrt{\lambda_j} a_{ji}}{s_{ii}^{1/2}}. \quad (4.15)$$

Si los componentes son extraídos de la matriz de correlación en lugar de la matriz de covarianza, entonces $r_{x_i u_j} = \sqrt{\lambda_j} a_{ji}$.

4.3.3. Cálculo de las Cuentas del Componente Principal

Para obtener las cuentas para un individual en las componentes principales derivadas, podemos simplemente aplicar las fórmulas (4.2), (4.3) y (4.4) a los valores de las variables originales individuales. Esto es, por lo general, más conveniente para un arreglo de

material tal que las cuentas del componente principal tenga un promedio de cero, por la aplicación de los vectores, $\mathbf{a}_1, \dots, \mathbf{a}_p$ al vector $(\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}})$, donde \mathbf{x}_i contiene los valores de las variables originales para un individual i y $\bar{\mathbf{x}}$ es el vector de los valores medios de las variables originales. Las cuentas de componentes para un individual i están dadas por

$$u_{i1} = \mathbf{a}'_1 (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}) \dots u_{ip} = \mathbf{a}'_p (\mathbf{x}_i - \bar{\mathbf{x}}). \quad (4.16)$$

Una aplicación del PCA en el análisis químico de la contaminación atmosférica se muestra en la Fig.4.4. Los datos originales son concentraciones de 20 hidrocarburos aromáticos policíclicos, medidos en 70 muestras de aerosol (50 de la ciudad de Viena, 20 de la ciudad de Linz en Austria)[38].

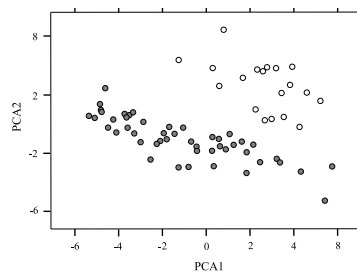


Fig. 4.4: Plano de esparcimiento de los datos de contaminación. Objetos: 50 muestras de la ciudad Viena (●) y 20 muestras de la ciudad de Linz (○), Austria. Características: concentraciones (suma en %) de 20 hidrocarburos policíclicos, autoescaladas. Las varianzas del PC1 y PC2 son 45.9 % y 26.0 % de la varianza total, respectivamente. Las muestras de las dos ciudades están claramente separadas y muestran perfiles diferentes de concentración.

4.4. Análisis Discriminante Lineal (LDA)

El LDA es una técnica de reconocimiento de patrones, como tal, presupone un conocimiento a *priori* del número de clases, así como la pertenencia a las mismas de cada uno de los miembros del conjunto de datos. El objetivo es diseñar y aplicar reglas de clasificación para diferenciar las clases consideradas y predecir a qué clase pertenece un conjunto

de muestras desconocidas. El LDA estima la probabilidad a *posteriori* de que un objeto pertenezca a una determinada categoría, creando funciones de decisión que separan las clases a las que pertenecen los objetos. El procedimiento es encontrar combinaciones lineales de las variables, que van a ser las denominadas funciones discriminantes, de forma que sea máximo el cociente S_B/S_W siendo S_B la matriz interclases y S_W la matriz entre-clases. El cálculo de las funciones discriminantes se realiza de tal forma que las clases se observen lo más separadas posibles y se reduzca la dimensionalidad sin pérdida de diferenciación entre dichas clases. Estas funciones constituyen los nuevos ejes donde mejor se contemplan las diferencias entre categorías o clases [39].

Sean Ω_1 y Ω_2 dos clases, X_1, \dots, X_p p variables observables, $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_p)'$ las observaciones de las variables sobre un individuo ω . Asignamos ω a una de las dos clases.

Una regla discriminante es un criterio que permite asignar ω , para esto se plantea una función discriminante $D(x_1, \dots, x_p)$. Por lo tanto, la regla de clasificación es

Si $D(x_1, \dots, x_p) \geq 0$ asignamos ω a Ω_1 ,
 en caso contrario asignamos ω a Ω_2 .

De acuerdo con esta regla R^p se divide en dos regiones

$$R_1 = \{\mathbf{x} | D(\mathbf{x}) > 0\}, \quad R_2 = \{\mathbf{x} | D(\mathbf{x}) < 0\}.$$

La probabilidad de clasificación errónea (pce) es

$$pce = P(\mathbf{x} \in R_2)P(\Omega_1) + P(\mathbf{x} \in R_1)P(\Omega_2). \quad (4.17)$$

4.4.1. Clasificación en dos Clases

Sean los vectores μ_1 y μ_2 de las variables Ω_1 y Ω_2 , respectivamente, y suponemos que la matriz de covarianza Σ es común. Si la media y covarianza son las mismas por todas las clases, las distancias de Mahalanobis de las observaciones $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_p)'$ de un individuo ω son

$$M^2(\mathbf{x}, \mu_i) = (\mathbf{x} - \mu_i)' \Sigma^{-1} (\mathbf{x} - \mu_i), \quad i = 1, 2. \quad (4.18)$$

Esto es nada más que una distancia Euclidiana de peso. Un primer criterio de clasificación consiste en asignar ω a la población más próxima:

$$\begin{aligned} \text{Si } M^2(\mathbf{x}, \mu_1) < M^2(\mathbf{x}, \mu_2) & \quad \text{asignamos } \omega \text{ a } \Omega_1, \\ \text{en caso contrario} & \quad \text{asignamos } \omega \text{ a } \Omega_2. \end{aligned} \quad (4.19)$$

Esta regla se expresa como una función discriminante, en la forma

$$M^2(\mathbf{x}, \mu_2) - M^2(\mathbf{x}, \mu_1) = (\mu_2 - \mu_1)' \Sigma^{-1} (\mu_2 + \mu_1) + 2\mathbf{x}' \Sigma^{-1} (\mu_1 - \mu_2). \quad (4.20)$$

Definimos la función discriminante

$$L(\mathbf{x}) = \left[\mathbf{x} - \frac{1}{2}(\mu_1 + \mu_2) \right]' \Sigma^{-1} (\mu_1 - \mu_2), \quad (4.21)$$

y tenemos

$$M^2(\mathbf{x}, \mu_2) - M^2(\mathbf{x}, \mu_1) = 2L(\mathbf{x}) - L((\mu_1 + \mu_2)/2). \quad (4.22)$$

Entonces la regla (4.20) se escribe en la forma:

$$\begin{aligned} \text{Si } L(\mathbf{x}) > 0 & \quad \text{asignamos } \omega \text{ a } \Omega_1, \\ \text{en caso contrario} & \quad \text{asignamos } \omega \text{ a } \Omega_2. \end{aligned} \quad (4.23)$$

La función lineal (4.21) es el discriminador lineal de Fisher.

4.4.2. Clasificación en Clases Normales

Suponemos que la distribución de X_1, \dots, X_p en Ω_1 es $N_p(\mu_1, \Sigma_1)$ y en Ω_2 es $N_p(\mu_2, \Sigma_2)$ es decir,

$$f_i = (2\pi)^{-p/2} |\Sigma_i^{-1}|^{1/2} \exp\left[-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mu_i)' \Sigma_i^{-1} (\mathbf{x} - \mu_i)\right]. \quad (4.24)$$

Si suponemos $\mu_1 \neq \mu_2$, $\Sigma_1 = \Sigma_2 = \Sigma$, entonces es clasificador lineal es

$$V(\mathbf{x}) = -\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mu_1)' \Sigma^{-1} (\mathbf{x} - \mu_1) + \frac{1}{2}(\mathbf{x} - \mu_2)' \Sigma^{-1} (\mathbf{x} - \mu_2) = L(\mathbf{x}).$$

La distancia de Mahalanobis entre dos clases es

$$\alpha = (\mu_1 - \mu_2)' \Sigma^{-1} (\mu_1 - \mu_2).$$

4.4.3. Clasificación Cuando los Parámetros son Estimados

En las aplicaciones prácticas $\mu_1, \mu_2, \Sigma_1, \Sigma_2$ son desconocidos y se pueden estimar a partir de las dimensiones de las muestras n_1, n_2 de las dos clases y sustituir μ_1, μ_2 por los vectores $\bar{\mathbf{x}}_1, \bar{\mathbf{x}}_2$, y Σ_1, Σ_2 por las matrices de covarianza $\mathbb{S}_1, \mathbb{S}_2$. Si utilizamos un estimador

lineal, la estimación de Σ sería

$$S = \frac{1}{n_1 + n_2} [n_1 S_1 + n_2 S_2] \quad (4.25)$$

y el discriminador lineal es [40]

$$L(\mathbf{x}) = \left[\mathbf{x} - \frac{1}{2}(\bar{\mathbf{x}}_1 + \bar{\mathbf{x}}_2) \right]' S^{-1} (\bar{\mathbf{x}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_2). \quad (4.26)$$

y

$$\alpha = (\bar{\mathbf{x}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_2)' S^{-1} (\bar{\mathbf{x}}_1 - \bar{\mathbf{x}}_2). \quad (4.27)$$

En la (Fig.4.5) se muestra una aplicación del LDA para clasificar muestras de café. Se

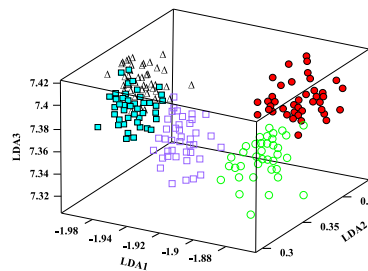


Fig. 4.5: LDA de cinco tipos de café.

expusieron cinco tipos de granos de café a un arreglo de sensores de gas químico. Para cada tipo de café, se realizaron 45 “olfateos” y la respuesta del arreglo de sensores de gas se procesó para obtener un vector característico 60-dimensional.

Parte II

EXPERIMENTAL

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real”.

Max Planck.

5

Sistemas Raman

Se muestra el montaje de un sistema Raman normal y un sistema micro-Raman con geometría de 180° que trabajan con distintas fuentes láser en la región visible, esto se consigue cambiando el filtro holográfico y el filtro de interferencia y moviendo un espejo para direccionar el haz láser a usar. Inicialmente se probaron algunas configuraciones de montaje sistema Raman, como el de geometría de 90° , con y sin fibra óptica, y el sistema con geometría de 180° (esparcimiento especular), usando un divisor de haz. Seguidamente retiramos el divisor de haz e hicimos incidir el haz láser bajo cierto ángulo de inclinación sobre el filtro holográfico. Esta configuración resultó ser muy versátil porque permite alinear el sistema óptico y orientar la emisión Raman sobre la rendija del monocromador con mucha facilidad.

Finalmente se muestra un sistema micro-Raman comercial Renishaw que se usó para estudiar el cristalino de cerdo.

5.1. Sistemas Raman ensamblados

5.1.1. Equipo Utilizado

Se usó el láser de helio-neón linealmente polarizado (Melles Griot) de 632.8 nm y 20 mW de potencia y las líneas de emisión de 488 nm y 514.5 nm del láser de argón linealmente polarizado (Spectra-Physics Modelo Stabilite 2017), enfriado con agua, las dos de 2.6 W de potencia.

El espectrómetro es un Jobin Yvon modelo HR 460 con un detector CCD de 256×1024 pixeles (enfriado con aire) con su fuente CCD-3000/SpectrumOne y una interface IEEE-488 GPIB de National Instruments. La resolución espectral del monocromador con la rejilla de 1200 líneas/mm es $\leq 0,05 \text{ nm}$, en la línea de emisión del mercurio de 546.074 nm. El sistema Raman trabaja con el filtro holográfico *SuperNotch – PlusTM* HSPF-18558, para el láser de He-Ne, y con el filtro *Notch – PlusTM* HNPF-11856 (Kaiser Optical Systems, Inc.), para el láser de argón. El filtro holográfico bloquea la luz Rayleigh y deja pasar luz de otras longitudes de onda, diferentes a la del láser. El espectrómetro y la cámara CCD se controlan con el software Spectramax (Galactics).

Para eliminar las líneas plasma del láser de He-Ne se utilizaron los filtros de interferencia de las firmas Edmund Scientific, de tolerancia FWHM $\pm 2 \text{ nm}$, y Melles Griot, de tolerancia FWHM de coordenadas 632,454 nm y 633,513 nm. Para concentrar la señal Raman en la rendija del monocromador se usaron lentes de 5 y 10 cm de distancia focal.

La computadora, para el registro de los espectros, es una Pentium III de 800 MHz de velocidad, 128 MB de memoria RAM y un disco duro de 20 MB. Para la impresión de los espectros se utiliza una impresora de inyección de tinta Hewlett Packard 920.

Todo el equipo, a excepción de la computadora y la impresora, se encuentran sobre una mesa holográfica (Leybol) con suspensión de aire.

5.1.2. Geometría de 90° con Fibra Óptica

Inicialmente se montó un sistema Raman con láser de argón cuyo haz se trasladó, a través de una fibra óptica de plástico de 1 mm de diámetro, desde el Laboratorio de Láseres al Laboratorio de Espectroscopia, como se muestra en la Fig. 5.1.

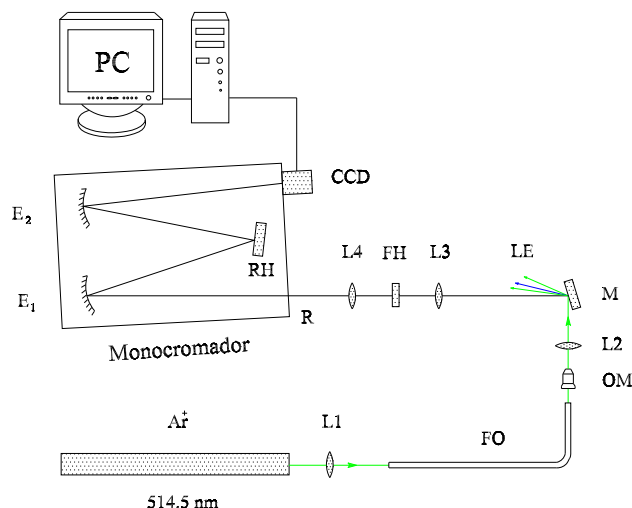


Fig. 5.1: Montaje del sistema Raman con fibra óptica: L, lentes; FO, fibra óptica; OM, objetivo de microscopio; M, muestra (oblea de silicio); LE, luz esparcida; FH, filtro holográfico; R, rendija; E1, espejo colimador; E2, espejo focalizador; RH, rejilla holográfica; CCD, detector y PC, computadora.

La fibra óptica se introdujo en una manguera de plástico tendida sobre el piso y se protegió con una plancha de aluminio. Para sujetar los extremos de la fibra óptica se diseñaron y construyeron dos monturas de acrílico, como se muestra en la Fig. 5.2. El haz láser de argón (514.5 nm) se introdujo en la fibra óptica con ayuda de la lente 1 y en el otro extremo, para colectar el haz láser, se colocó un objetivo de microscopio de 5×. Después del objetivo se colocó la lente 2 para enfocar el haz láser sobre la muestra, colocada bajo cierto ángulo con respecto al haz incidente. La luz esparcida se colecta con la lente 3 y se orienta al filtro holográfico y luego a la rendija del monocromador, con ayuda de la lente 4. Estas lentes tienen una distancia focal de 5 cm. Para obtener luz Raman polarizada paralelamente o perpendicularmente, se utiliza un polarizador situado después del filtro holográfico.

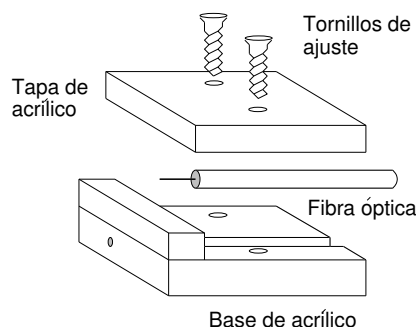


Fig. 5.2: Montura de la fibra óptica.

La muestra utilizada fue una oblea de silicio. Se hicieron varias mediciones para diferentes ángulos de inclinación de la oblea de silicio con respecto al haz incidente, pero no se logró obtener el pico Raman característico del silicio (520 cm^{-1}), debido a la dificultad en la alineación del sistema óptico.

5.1.3. Geometría de 90° sin Fibra Óptica

Esta configuración se utilizó haciendo incidir sobre la muestra el haz láser de He-Ne a 632.8 nm de longitud de onda, bajo cierto ángulo, como se muestra en la Fig. 5.3. Para colectar parte de la luz esparcida sobre la muestra se utiliza la lente 1. El filtro holográfico deja pasar la luz Raman, la que es enfocada sobre la rendija del monocromador con la lente 2. El eje de las lentes 1 y 2 es perpendicular al plano del filtro holográfico. Se hicieron mediciones para diferentes ángulos de inclinación de la muestra con respecto al haz incidente, pero no se logró detectar la emisión Raman del silicio. Esto se debe a la dificultad para orientar la luz Raman sobre la rendija del monocromador, para cada ángulo de inclinación.

5.1.4. Geometría de 180°

Seguidamente se diseñó una configuración con esparcimiento especular, donde el haz láser incide perpendicularmente sobre la muestra (Fig. 5.4). Se montó el sistema Raman de

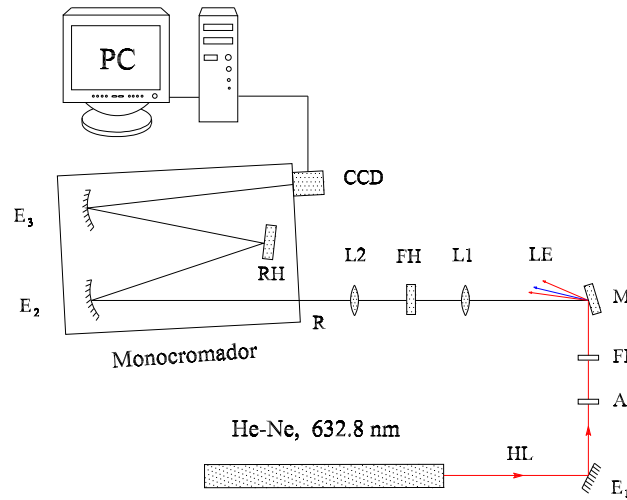


Fig. 5.3: Montaje del sistema Raman con geometría de 90° o de incidencia rasante: HL, haz láser; E, espejos; A, atenuador; y FI, filtro de interferencia.

acuerdo a este diseño y se logró obtener el espectro Raman del silicio. El sistema Raman desarrollado puede trabajar con cualquier fuente de excitación en la región visible, siempre y cuando se coloque el FH y el FI para cada longitud de onda a usar.

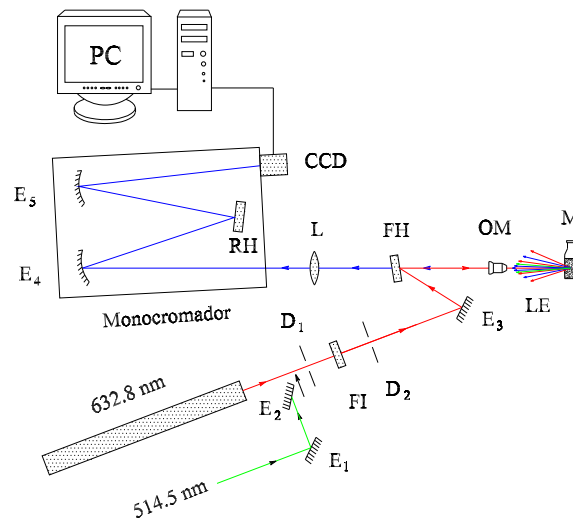


Fig. 5.4: Montaje del sistema Raman con geometría de 180°: D, diafragmas.

El haz láser de 632.8 nm en su recorrido, pasa a través de un atenuador de densidad neutra (en los casos que sea necesario), luego por un filtro de interferencia (Edmund

Scientific, tolerancia FWHM ± 2 nm), que elimina las frecuencias de plasma del láser. Posteriormente el haz incide sobre el filtro holográfico bajo cierto ángulo, el cual se regula con el espejo 3. El ángulo de inclinación del eje normal del filtro holográfico debe estar entre 5 y 10° con respecto al eje del objetivo de microscopio (5×, Edmund Scientific). El haz láser se refleja en el filtro holográfico, pasa a través del objetivo de microscopio hasta llegar a la muestra. La luz esparcida en la muestra, que es atrapada y colimada por el objetivo, llega al filtro holográfico, quien bloquea la luz Rayleigh y deja pasar la señal Raman. Esta señal se enfoca con la lente L, de 5 cm de distancia focal, sobre la rendija del monocromador, pasa hasta el espejo colimador y se refleja a la rejilla holográfica (1200 líneas/mm o 1800 líneas/mm), la cual descompone la señal en diferentes frecuencias y la envía, con ayuda del espejo focalizador, a la cámara CCD. Esta transforma las señales ópticas en pulsos eléctricos para luego en la computadora, a través de la tarjeta GPIB, convertirlos en espectros de vibración de los enlaces interatómicos de las moléculas de la muestra.

Este sistema Raman, comparado con otros sistemas Raman comerciales, es muy práctico porque podemos intercambiar fácilmente el láser, el filtro de interferencia y el filtro holográfico y trabajar con diferentes longitudes de onda de excitación. El sistema Raman dispersivo desarrollado es muy importante porque es la base para la implementación de la espectroscopia micro-Raman y la espectroscopia de superficie mejorada (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS), que tiene muchas aplicaciones en el estudio de pesticidas y moléculas biológicas [41].

5.1.5. Calibración del Sistema Raman

Calibración del sistema a la línea del silicio

Para la calibración del sistema Raman se utilizó la línea de emisión del mercurio a 546.074 nm. Consiste en lo siguiente. Se coloca la lámpara de mercurio frente a la rendija

del monocromador y se atenúa la intensidad de luz incidente para no saturar el detector CCD. Enseguida con el software Spectramax se gradúa el ancho de la rendija del monocromador y el tiempo de exposición del CCD. En nuestro caso se colocó un ancho de rendija de 1 mm, con un tiempo de exposición de 0.01s y una acumulación. Se mide el espectro, si la línea espectral no coincide con la línea de emisión del mercurio se hace un ajuste a la posición de la rejilla de difracción de 1200 líneas/mm del monocromador, se repite nuevamente el proceso tantas veces hasta lograr posicionar la línea de emisión lo más cerca posible a la posición de 546.074 nm. Se hicieron varias mediciones hasta que se logró posicionar la línea de emisión del mercurio en 546.06 nm.

Además de tener calibrado el sistema a la línea de emisión del mercurio, antes de cada medición el sistema Raman se calibra a la línea del silicio de 520 cm^{-1} [42], como se muestra en la Fig. 5.5. El espectro se obtuvo utilizando el láser de He-Ne con 8.3 mW de potencia en la muestra, 30s de exposición, una acumulación y 1 mm de ancho de rendija del monocromador.

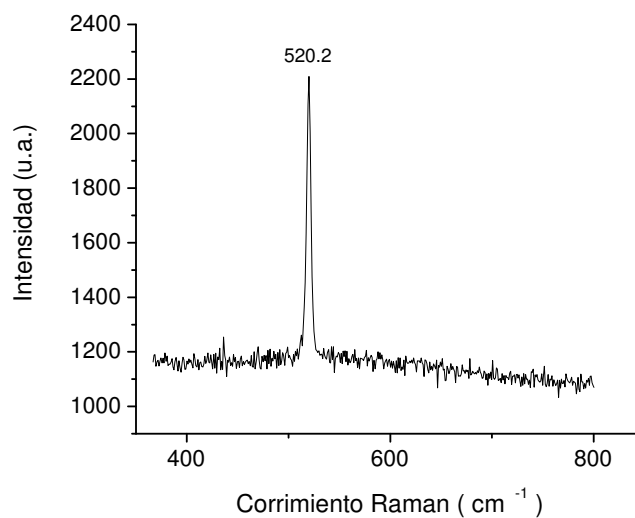


Fig. 5.5: Espectro Raman del silicio.

Curvas de transmitancia del filtro holográfico

La inclinación del eje normal del filtro holográfico HSPF-18558, con respecto a la dirección de la emisión Raman, es muy importante para determinar sus curvas de transmitancia. Al aumentar el ángulo de inclinación, el rango de medición se acerca más a la banda de emisión del láser. Para determinar las curvas de transmitancia del filtro holográfico se utilizó luz blanca, según el esquema mostrado en la Fig. 5.6.

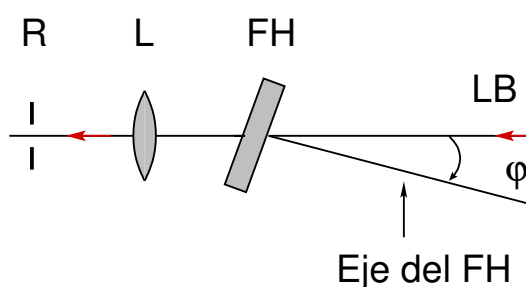


Fig. 5.6: Variación del ángulo para determinar las líneas de corte del filtro holográfico: LB, luz blanca; y φ , ángulo de inclinación del FH, con respecto a la dirección de la luz blanca.

Se varió el ángulo φ desde 5° hasta 10° y para cada valor del ángulo se encontró el espectro de luz blanca, como se muestra en la Fig. 5.7.

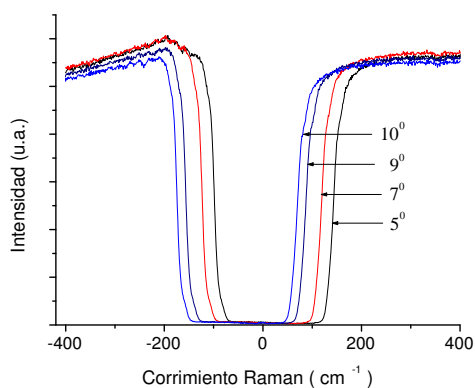


Fig. 5.7: Curvas para determinar las líneas de corte del filtro holográfico.

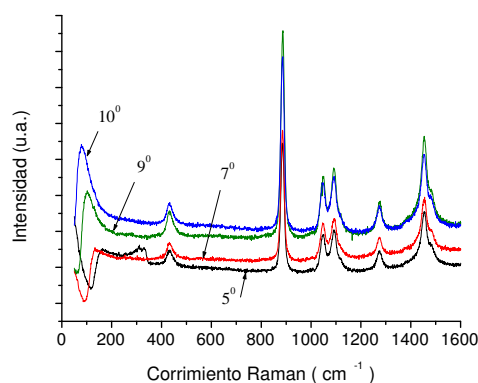


Fig. 5.8: Espectros Raman del etanol: 8.3 mW de potencia en muestra, 5s de exposición y 2 acumulaciones.

Se observa que, a medida que disminuye el ángulo φ , la parte positiva de la curva del

espectro de luz blanca se aleja de la línea de emisión del láser (línea Rayleigh), esto no es conveniente si se tiene que analizar sustancias que tengan picos Raman cerca de esta línea. Asimismo, no es recomendable acercarse demasiado a la parte positiva de la curva a la línea Rayleigh porque a medida que aumenta el ángulo de inclinación del filtro holográfico aparecen picos anchos entre $80 - 200 \text{ cm}^{-1}$, como se observa en los espectros del etanol de la Fig. 5.8, para ángulos de 9° y 10° . Se observa también, que los picos del etanol, para el ángulo de 9° , son más intensos que los picos correspondientes para los otros ángulos de inclinación del filtro holográfico.

El espectro (a) de la Fig. 5.9 corresponde al espectro de luz blanca, para una inclinación del filtro holográfico de 9° , como se muestra en la Fig. 5.7. El espectro (b) es del etanol, mostrado en la Fig. 5.8, también para un ángulo de inclinación del filtro holográfico de 9° . El espectro (c) se encontró sin utilizar ninguna muestra, haciendo incidir el haz láser sobre el filtro de interferencia y el filtro holográfico con un tiempo de 1.6s y una acumulación.

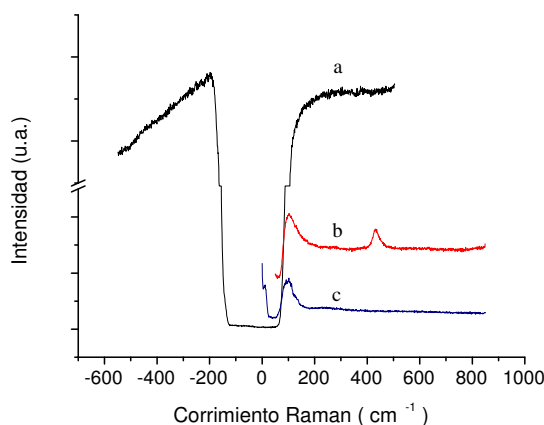


Fig. 5.9: (a) Curva de corte del filtro holográfico para una inclinación de 9° ; (b) espectro Raman del etanol; (c) espectro de la luz láser al atravesar el filtro de interferencia y el filtro holográfico.

Se concluye que el ángulo de inclinación del filtro holográfico de 9° es el adecuado para el sistema Raman montado, ya que los espectros Raman del etanol son más intensos que los obtenidos para otros ángulos de inclinación. Además, la línea de corte del filtro holo-

gráfico, localizada alrededor de 100 cm^{-1} , nos permite detectar señales Raman alrededor de esta zona, como el pico intenso del telurio de cadmio (CdTe), situado en 120 cm^{-1} [43]. Por otro lado, de las gráficas de la Fig. 5.9, se deduce que los picos anchos que aparecen en el espectro del etanol, entre $80 - 200 \text{ cm}^{-1}$, se deben a las líneas de plasma que no logra eliminar totalmente el filtro de interferencia (Melles Griot).

5.2. Montaje del Sistema Micro-Raman

Se implementó un sistema de microscopía Raman, agregando al sistema Raman dispersivo normal un microscopio Leica modelo DMLM con objetivos de $10 \times / 0,25$, $50 \times / 0,75$ y $100 \times / 0,90$, como se muestra en la Fig. 5.10.

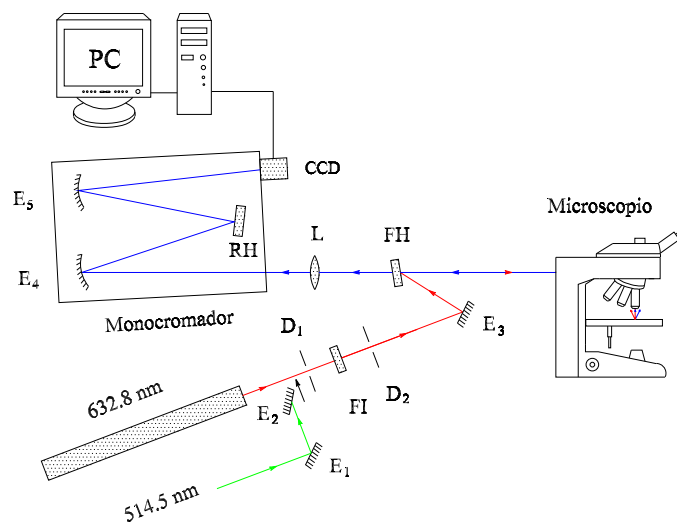


Fig. 5.10: Sistema micro-Raman.

Como se puede observar en las Fig. 5.4 y Fig. 5.10, para pasar del sistema Raman dispersivo al micro-Raman solamente se retira el objetivo de microscopio de $5 \times$ y para trabajar con otra fuente láser se cambia el filtro de interferencia y el filtro holográfico y se coloca el espejo móvil 2, obligando al haz del nuevo láser a pasar por los diafragmas 1 y 2. Después de hacer estos cambios hay que tener cuidado de que el microscopio esté

alineado con la luz láser incidente.

El microscopio descansa sobre una mesa sujeta en un costado de la mesa holográfica. El microscopio tiene un movimiento vertical que se gradúa con cuatro tornillos, cuyos extremos sostienen a la base de la mesa. La desventaja de esta mesa es que no tiene movimiento horizontal, por esta razón el movimiento horizontal del microscopio se realiza manualmente.

Para alinear el microscopio se hace pasar la luz láser a través de un diafragma colocado entre el filtro holográfico y el microscopio. Si el haz láser reflejado de la lente anterior del microscopio no pasa a través del diafragma, entonces se desplaza el microscopio hasta lograrlo. El mismo procedimiento se aplica colocando un espejo (o la misma oblea de silicio) en la base del microscopio de movimiento XY. Si el haz reflejado del espejo (o de la oblea de silicio) no retorna por el mismo camino se mueve el microscopio tanto verticalmente como horizontalmente hasta obligarlo a pasar por el agujero del diafragma.

Para comprobar que el haz reflejado pasa por la rendija del monocromador, se retira el espejo de la base y se conecta la fuente de luz blanca del microscopio. Si esta luz no pasa totalmente por la rendija se mueve cuidadosamente el monocromador hasta lograrlo.

Al cambiar la fuente láser, el microscopio queda un tanto desalineado por lo que es necesario repetir el procedimiento anterior para alinearlo. El sistema micro-Raman puede desalinearse por los cambios de temperatura del medio ambiente. Por estas razones antes de cada sesión de mediciones es necesario comprobar que todo el sistema esté totalmente alineado.

Antes de cada medición el sistema micro-Raman se calibra al pico Raman del silicio (520 cm^{-1}), como se indica en el capítulo anterior.

5.3. Sistema Micro-Raman Comercial

El equipo mostrado en la Fig.5.11 es un sistema micro-Raman comercial (Renishaw, modelo 1000B), que usa como fuente de excitación un diodo láser de 830 nm de longitud de onda (cercano infrarrojo, NIR). Con esta longitud de onda se reduce enormemente la fluorescencia de muestras biológicas. Por esta razón se usó para estudiar la distribución de proteínas cristalinas y de los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina del cristalino de cerdo, a lo largo de los ejes visual y ecuatorial (ver Capítulo 6).

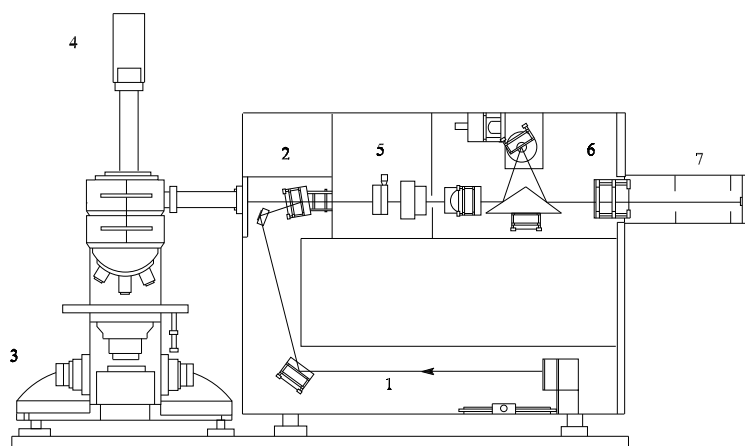


Fig. 5.11: Sistema micro-Raman infrarrojo: 1-haz láser, 2- filtro holográfico, 3-microscopio, 4-cámara de vídeo, 5-diafragma, 6-rendija, 7-cámara CCD.

El recorrido del haz láser en el sistema mostrado es el siguiente. El haz láser 1 es dirigido a través de espejos hasta el filtro holográfico 2, el cual lo refleja y dirige hasta la muestra localizada en la base móvil del microscopio 3 (Leica, modelo DMLM). El enfoque del haz láser (~ 63 mW) sobre la muestra se realiza mediante movimientos verticales de la muestra hasta obtener una mancha mínima del haz. Esta mancha es captada por la cámara de vídeo 4 y mostrada en el monitor de la computadora. La señal Raman, colectada por el objetivo del microscopio ($50\times$, diámetro de la mancha láser $\sim 2\mu\text{m}$), pasa por el filtro holográfico y por el diafragma 5 (0.6 mm de ancho) hasta descomponerse en sus diferentes frecuencias en la rejilla holográfica (600 líneas/mm con una resolución de 4 cm^{-1}). Esta

señal llega hasta la cámara CCD (RemCam, 1024x256 pixels), quien lo transforma en señales eléctricas, que finalmente se presentan en forma de espectros en el monitor de la computadora. Los espectros se midieron con un tiempo de exposición de 10s y una acumulación. Para la calibración del sistema Raman se usa una oblea de silicio, en la banda de 520 cm^{-1} , y el programa WIRE de Renishaw.

5.4. Enfoque de la Radiación Láser Sobre la Muestra

El enfoque de la radiación láser sobre la muestra es muy importante para optimizar el volumen focal de excitación de la zona que se va a analizar. Cuando la excitación se enfoca sobre la superficie de la muestra el volumen focal es menor que cuando la radiación láser se enfoca dentro de la muestra [43], como se indica en la Fig. 5.12.

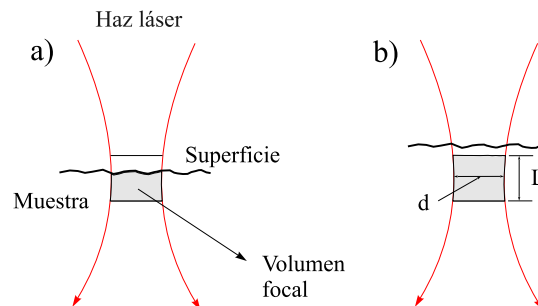


Fig. 5.12: Volumen focal en la superficie (a) y bajo la superficie (b) de la muestra.

Por esta razón, el espectro Raman, medido cuando parte del volumen focal está fuera de la muestra (5.12a), es menos intenso que el espectro Raman medido con el volumen focal dentro de la muestra (5.12b). El volumen focal V y la profundidad de foco L se encuentran de la siguiente forma

$$V = \frac{\pi^2}{4\lambda} d^4, \quad L = \frac{\pi d^2}{\lambda}, \quad (5.1)$$

donde λ es la longitud de onda del haz láser; d , el diámetro de la mancha del haz láser.

En los Apéndices A y B, se muestran algunos espectros de sólidos (L-glutamina y L-glutámico) y líquidos (Alcoholes etílico y metílico), respectivamente, medidos con el sistema Raman normal ensamblado en el laboratorio. En el Apéndice C se muestra un uso del filtro holográfico para la longitud de onda de 514.5 nm. Se muestra que girando este filtro holográfico (Notch-Plus) en un ángulo de $\varphi = 32^\circ$, se pueden medir espectros Raman usando la línea del láser de argón de 488 nm. Como ejemplo se muestran los espectros del alcohol etílico, obtenidos con ambas longitudes de onda.

Parte III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Ojo por ojo, y el mundo acabará ciego”.

Mahatma Gandhi.

6

Cristalino: Proteínas y Aminoácidos

La luz visible monocromática induce fluorescencia, debido a las transiciones electrónicas, en muchos constituyentes esenciales de células y tejidos de animales y plantas, que enmascara parcial o totalmente al espectro Raman [44]. Sin embargo, en el estudio del ojo humano y animal se reportan muchos trabajos utilizando como fuente de excitación a un láser de Ar^+ en la longitud de onda de 514.5 nm [45, 46]. A medida que aumenta la longitud de onda de excitación, la fluorescencia de la muestra disminuye hasta eliminarse casi totalmente en la longitud de onda de 1064 nm. Por esta razón, los espectros Raman de las proteínas y aminoácidos, a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo, se midieron con un sistema Raman comercial de la marca Renishaw (Modelo 1000B), que usa una fuente de excitación en el cercano infrarrojo de 830 nm.

6.1. Aspectos Generales

En esta sección se presentan aspectos generales que se usan para el estudio de la distribución de las proteínas y de los aminoácidos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo.

6.1.1. Muestras de Cristalino

Los cristalinos de cerdo macho normal de la raza Yorkshire fueron obtenidos del rastro local inmediatamente después de ser sacrificados. Los cristalinos fueron removidos, lavados con agua destilada, y fijados en formalina. Los cristalinos fueron después montados en un crióstato y cortados en rodajas de 500 μm de espesor. Estas rodajas fueron seguidamente montadas sobre vidrio portamuestra para las mediciones Raman.

6.1.2. Trayectoria del Haz Láser en el Cristalino

La Fig. 6.1 muestra la trayectoria de un haz láser a lo largo de los planos visual (a) y ecuatorial (b) de un cristalino fresco de cerdo.

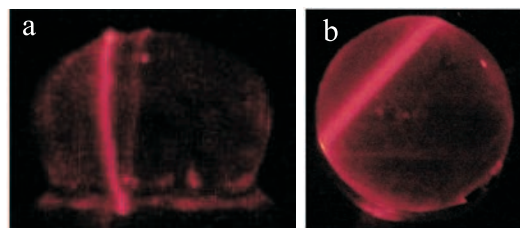


Fig. 6.1: Trayectoria del haz láser (632.8 nm) a lo largo de los planos visual (a) y ecuatorial (b).

Para este propósito se usó un láser de He-Ne en la longitud de onda de 632.8 nm. Se observó que la trayectoria de este haz láser en el plano visual tiene una trayectoria curva, mientras que en el plano ecuatorial el haz tiene una trayectoria rectilínea. Se espera que los aminoácidos del cristalino a lo largo del eje visual cambie más drásticamente que a lo

largo del eje ecuatorial. Estos cambios pueden tener una relación directa con el gradiente del índice de refracción del cristalino.

6.1.3. Medición de las Intensidades de los Picos Raman

Todos los espectros Raman se midieron a lo largo de los ejes visual, desde el polo anterior hasta el polo posterior, y ecuatorial. El número total de espectros promedio en el eje visual fueron 48 ($n=242$) y en el eje ecuatorial 58 ($n=291$). La intensidad de cada pico Raman se midió trazando una línea base entre sus dos puntos mínimos y una línea, paralela al eje de las intensidades, desde su punto máximo hasta la intersección con la línea base. Además se midieron las intensidades de los picos Raman derivando los espectros y promediando las intensidades de cada pico. Se construyeron gráficos de las intensidades de los picos correspondientes a las proteínas en función de la distancia (ejes visual y ecuatorial). Para determinar el comportamiento de las proteínas a lo largo de estos ejes, se aplicó a los gráficos una aproximación polinomial de segundo orden.

6.1.4. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se usó un programa desarrollado en la plataforma de MATLAB, basado en el análisis multivariante. El Análisis Principal de Componentes (PCA) y el Análisis de Discriminación Lineal (LDA) son dos técnicas normalmente usadas para la clasificación de los datos y reducción de la dimensionalidad. Se usaron los componentes principales para describir los espectros como una combinación lineal de los pesos y del componente principal. Cada componente principal describe en los espectros la variación decreciente del promedio del conjunto de datos. El LDA maximiza la relación de la varianza entre clases en cualquier conjunto particular de datos, con lo cual se garantiza una máxima separabilidad. Se usaron los pesos de los PCs como variables de entrada en el modelo

LDA, que maximiza la variancia entre los grupos y minimiza la variancia dentro de los grupos [47].

Antes de calcular los PCs, los datos fueron diferenciados y escalados [48].

6.2. Proteínas Cristalinas

En esta sección se hace un análisis espectral para determinar la distribución de las proteínas a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo conservado en formalina.

6.2.1. Introducción

El índice de refracción del cristalino del humano tiene un valor de 1.38 en la corteza y 1.40 en el núcleo [49], por esta razón la luz debe cambiar de dirección al pasar del medio ambiente al tejido del cristalino. Este cambio implica también que las constituyentes del tejido no deben estar distribuidas homogéneamente en todo el volumen del cristalino, se espera que exista una diferencia de estructura entre las capas del mismo. Por tener características muy similares al ojo humano, se hizo un estudio del ojo de cerdo.

El cristalino humano es una estructura encapsulada consistente casi en su integridad de un gran número de células largas rígidas conocidas como fibras cristalinas o células fibrosas [50]. En estas células las proteínas cristalinas α , β y γ cubren más del 90 % del total de proteínas y contribuyen a un alto índice de refracción del cristalino [51]. La proteína α es la proteína más abundante en las fibras cristalinas en más del 40 % del total de proteínas fibrosas [52].

Uzunbajakava et al. [53] estudió la distribución de proteínas en células humanas solas, usando un microscopio confocal para imágenes Raman no resonantes ($\lambda=647.1$ nm). Para este estudio se usaron células epiteliales de cristalinos humanos. Ellos encontraron que

las proteínas están homogéneamente distribuidas en el espacio nuclear de las células epiteliales del cristalino. Aunque las proteínas cristalinas se encuentran en todas las células de la lente, ellas no se distribuyen uniformemente. Aunque las células de fibra contienen cada una de las proteínas cristalinas en diferentes proporciones, el epitelio sólo contiene proteínas α [50]. La espectroscopia Raman, comparada con otros métodos analíticos [54], tiene la ventaja de ser una técnica non-invasiva poderosa para el estudio de muestras biológicas, ya que proporciona información detallada de la estructura y conformación de moléculas orgánicas [55].

6.2.2. Espectros Raman

La Fig. 6.2 muestra las bandas espectrales del cristalino de cerdo en la región de 1060-800 cm^{-1} . Estas bandas son importantes porque ellas proporcionan información relaciona-

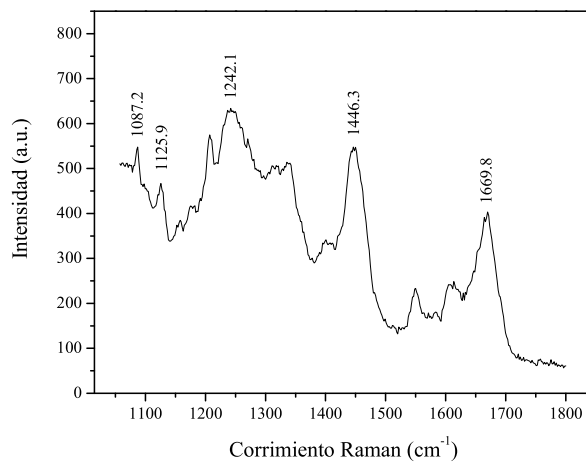


Fig. 6.2: Picos Raman característicos de las proteínas del cristalino.

da con las variaciones de la distribución de proteínas a lo largo de los ejes visual y ecuatorial. El pico en 1087.2 cm^{-1} se debe a las vibraciones de estiramiento del enlace C-N de proteínas. La Fig. 6.3a muestra que las intensidades del pico decrecen a lo largo del eje

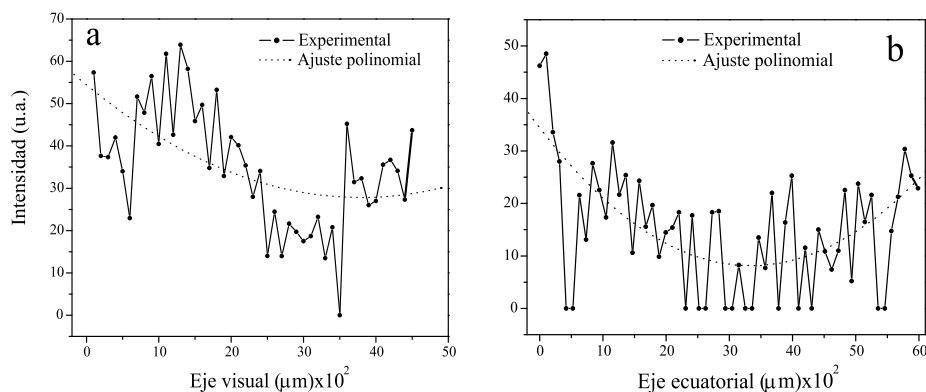


Fig. 6.3: Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente a las vibraciones del enlace C-N de proteínas, a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.

visual. Sin embargo, para el eje ecuatorial las intensidades del mismo pico en 1085.8 cm^{-1} decrecen y después se incrementan, como se muestra en la Fig. 6.3b. El pico en 1125.9 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento del enlace C-N de proteínas o a las vibraciones de estiramiento del enlace C-C de lípidos. Fig. 6.4a muestra que las intensi-

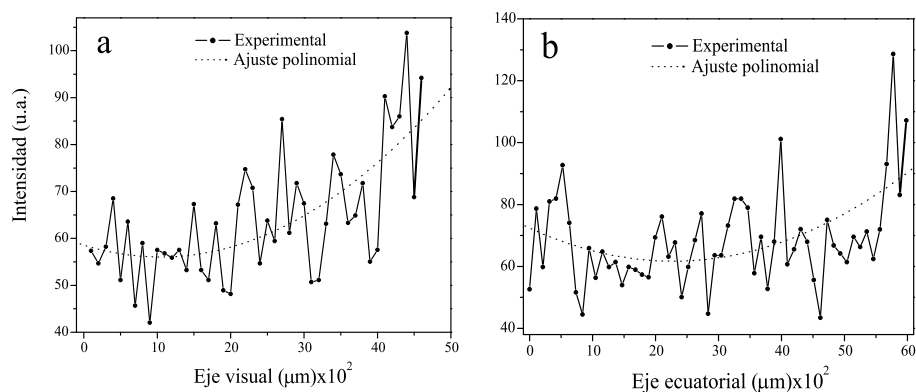


Fig. 6.4: Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente al enlaces C-N de proteínas y C-C de lípidos, a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.

dades de este pico se incrementan a lo largo del eje visual. Esto significa que la cantidad de proteínas se incrementa en el eje visual. Las intensidades del pico correspondiente en 1124.5 cm^{-1} , obtenido a lo largo del eje ecuatorial, se incrementan ligeramente, como se muestra en la Fig. 6.4b. El pico en 1242.1 cm^{-1} corresponde a la Amida III (modo C-N de estiramiento de las proteínas, que indica principalmente una conformación α -hélice). En la

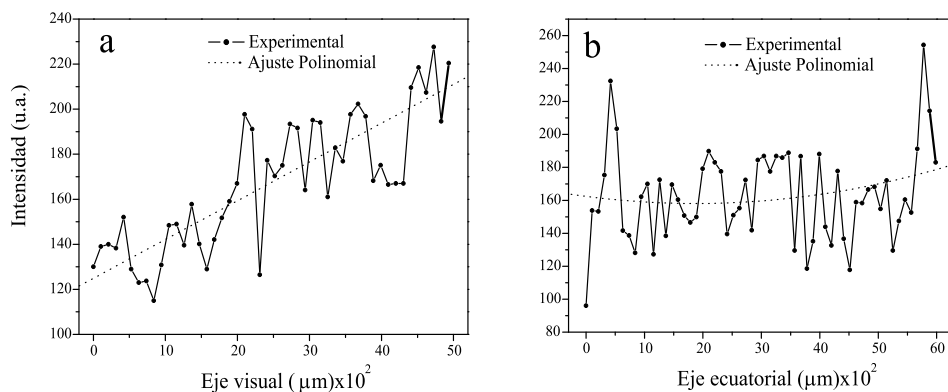


Fig. 6.5: Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente a la amida III a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.

Fig. 6.5a se muestran las variaciones de las intensidades de este pico a lo largo del eje visual. Se observa que la Amida III se incrementa con la distancia. Las intensidades del mismo pico, obtenidas en el eje ecuatorial, en promedio tienen pequeñas variaciones a lo largo de este eje (ver Fig. 6.5b). El pico Raman en 1446.3 cm^{-1} se debe al modo de vibración de doblamiento del enlace CH_2 de proteínas y lípidos.

En la Fig. 6.6a se observa que las intensidades del pico se incrementa a lo largo del eje visual. Sin embargo, las intensidades del mismo pico a lo largo del eje ecuatorial se incrementa ligeramente, como se muestra en la Fig. 6.6b. La Fig. ??a muestra las varia-

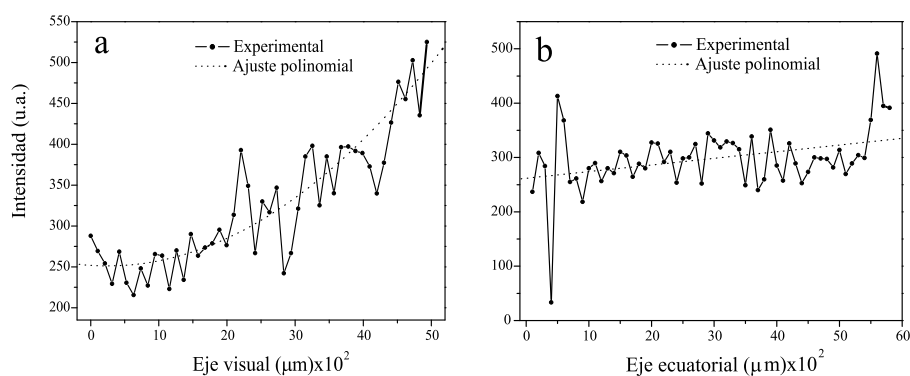


Fig. 6.6: Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente al enlace CH_2 de proteínas y lípidos a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.

ciones de la intensidad, a lo largo del eje visual, del pico en 1670.1 cm^{-1} , que corresponde

a la Amida I (modo de estiramiento del enlace C=C de proteínas, conformación α -helix). Las intensidades de este pico se incrementan con la distancia. En el eje ecuatorial las intensidades del mismo pico se incrementa muy poco [ver Fig. 6.7b]. Los picos en 1670.1

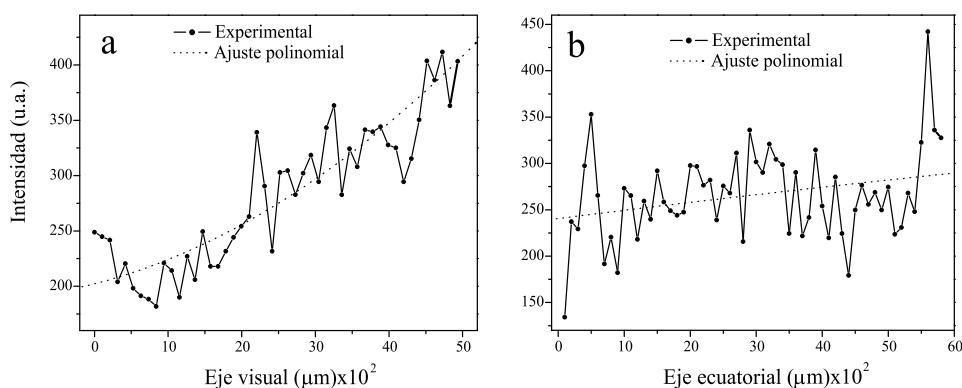


Fig. 6.7: Variaciones de la intensidad del pico Raman de la vibración de estiramiento del enlace C=C de la amide I a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.

cm^{-1} y en 1242.1 cm^{-1} son característicos de la estructura de hoja plegada β y son un buen índice para caracterizar la estructura secundaria del esqueleto peptídico [54]. Las intensidades del pico fluctúan considerablemente y se incrementan a lo largo del eje visual. Estos resultados están en concordancia con lo sostenido por Patel y Bron [51], que los cambios en las concentraciones de proteínas, a través de la sustancia del cristalino, tienen influencia sobre el gradiente de refracción.

6.2.3. Análisis de Datos

Los cinco primeros PCs, que representan más del 95.7% del total de la variancia en el conjunto de datos, fueron introducidos al modelo LDA. La validación cruzada del modelo de datos dio una correcta clasificación del modelo de espectros en 82.7%. La Fig. 6.8 muestra las proyecciones del modelo de espectros en el espacio LD. Como podría esperarse de las diferencias espectrales, hay una separación entre los espectros medidos en el eje visual y los medidos en el eje ecuatorial. También se encontró que la dispersión de los datos

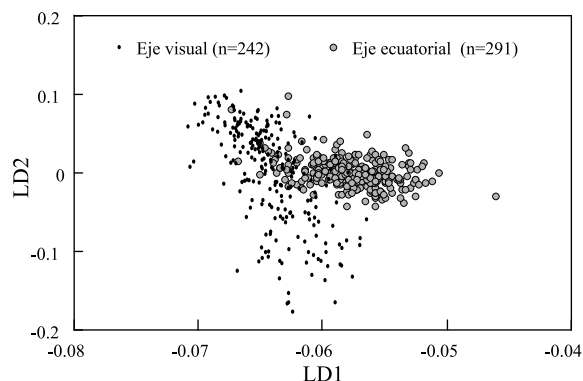


Fig. 6.8: Proyección discriminante lineal para cada espectro de los grupos visual y ecuatorial del cristalino.

en el eje visual es más grande que en el eje ecuatorial, debido a las fluctuaciones de los componentes que se encuentran en el cristalino.

6.3. Aminoácidos

En esta sección se hace un estudio similar al realizado para las proteínas en la sección 6.2. Se analiza la distribución de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) a lo largo de los ejes visual y ecuatorial.

6.3.1. Introducción

La espectroscopia Raman se usa ampliamente en el estudio de la estructura de proteínas y aminoácidos, cuya información se obtiene de las señales Raman, debidas a las vibraciones moleculares internas [56] de la muestra.

Con relación al cristalino de bovino, se ha encontrado que la parte nuclear tiene la concentración más alta de proteínas γ y el contenido de las proteínas α aumenta significativamente del núcleo a la corteza, mientras que la parte periférica del cristalino tiene un contenido de aminoácido un poco diferente [57]. Estos perfiles de proteínas y aminoácidos se han estudiado basados en las intensidades relativas de los picos Raman de las líneas

en 624 cm^{-1} (fenilalanina) y 644 cm^{-1} (tirosina). Además, usando el mismo procedimiento, se ha reportado que las proteínas α aumentan y las γ disminuyen en la corteza de cristalino de ratas adultas [58].

La micro-espectroscopia Raman confocal se ha usado para estudiar los cambios del triptópano, tirosina y fenilalanina en la región nuclear del cristalino humano de edades variables. Se encontró que los cambios del triptópano y la tirosina probablemente reflejan el corrimiento de maduración de la parte cortical a la parte nuclear [59], y que independientemente de la edad, el núcleo tiene el más alto contenido de estos aminoácidos [60].

Las técnicas acústica y Raman se usan para medir el contenido de proteínas en el cristalino del ojo (humano, porcino). Para el cristalino de porcino el contenido de proteínas tiene una disminución gradual del núcleo a la periferia, y para el cristalino humano se observa el mismo perfil [61]. Además, los perfiles de la proteína y del contenido de agua del cristalino de porcino son similares a los perfiles del índice de refracción óptico [62].

Ya que los aminoácidos son los ladrillos de las proteínas del cristalino y a su vez estas proteínas están relacionadas con el gradiente del índice de refracción del cristalino, entonces esto sugiere que los aminoácidos también estén relacionados de la misma manera. En este estudio examinamos la distribución de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo, usando la espectroscopia Raman en el cercano infrarrojo.

6.3.2. Espectros Raman

Se han reportado previamente una serie de estudios sobre la asignación de las señales Raman en cristalinos [63, 64, 65]. La Fig. 6.9 muestra los picos Raman más representativos de aminoácidos aromáticos de un cristalino de cerdo normal. Este es un espectro Raman promedio, obtenido de 242 espectros. Los aminoácidos aromáticos tienen algunos picos característicos: tirosina en 642.3 , 830.6 , 853.5 , y 1615.5 cm^{-1} ; triptópano en 758.4 , 878.1 ,

and 1548.6 cm^{-1} ; fenilalanina en 621.2 , 1003 , 1031.2 , y 1606 cm^{-1} .

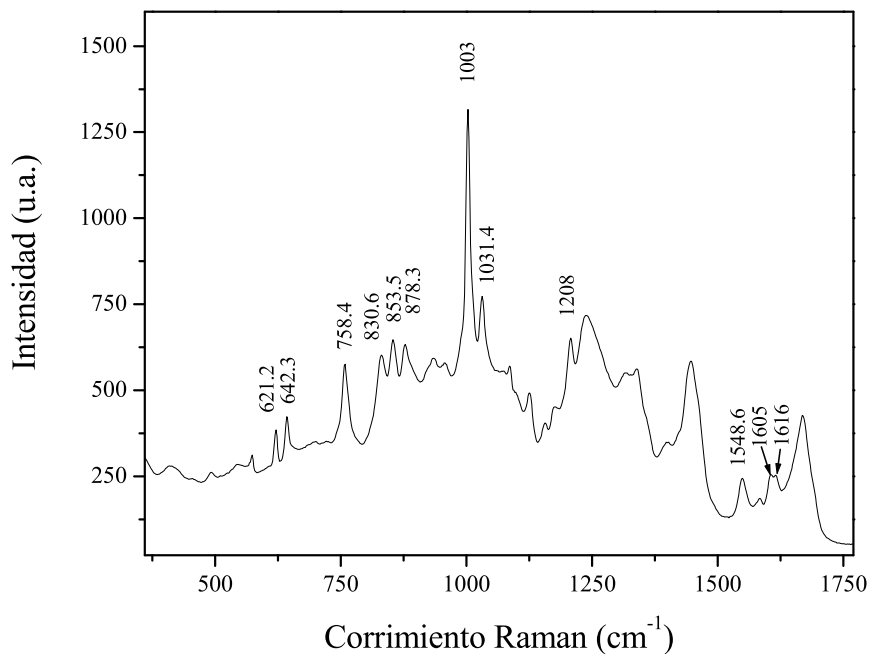


Fig. 6.9: Algunos picos Raman característicos de los aminoácidos en un cristalino de cerdo normal.

6.3.3. Cambios en el Triptófano y la Tirosina

La Fig. 6.10 muestra la distribución de las intensidades del pico en 758.4 cm^{-1} a lo largo de los ejes visual y ecuatorial de la sección transversal de un cristalino de cerdo. Este pico corresponde a la vibración simétrica de respiro del anillo del triptófano. A lo largo del eje visual, la pendiente de la curva del ajuste polinomial disminuye de punto a punto y finalmente ella toma valores negativos (Fig. 6.10a). Además, a lo largo del eje ecuatorial, las intensidades del triptófano en la parte nuclear del cristalino son más prominentes que en la parte de la corteza (Fig. 6.10b). El doblete de la tirosina en 830.6 y 853.5 cm^{-1} frecuentemente se usa como frecuencias de prueba para investigar la naturaleza del microambiente de la tirosina en las proteínas del cristalino [2]. Estos picos corresponden a las vibraciones

fuera de plano de respiro del anillo y a la vibración de respiro del anillo, respectivamente. La Fig. 6.11 muestra las intensidades del pico de la tirosina en 830.6 cm^{-1} . A lo largo del

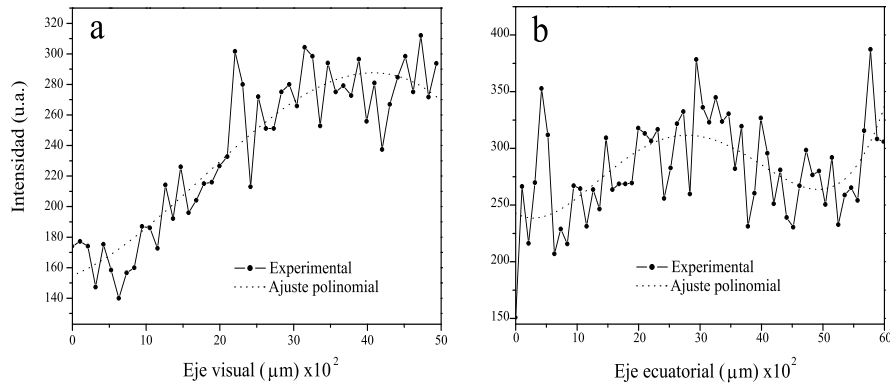


Fig. 6.10: Distribución de las intensidades de los picos Raman en 758.4 cm^{-1} del triptófano a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)

eje visual la pendiente de la curva polinomial disminuye de punto a punto y finalmente ella toma valores negativos (Fig. 6.11a). En el eje ecuatorial (Fig. 6.11b), las intensidades en la parte nuclear del cristalino son más grandes que en la parte de la corteza. El mismo perfil se observa para las intensidades del pico en 853.5 cm^{-1} en ambos ejes (Fig. 6.12). Como

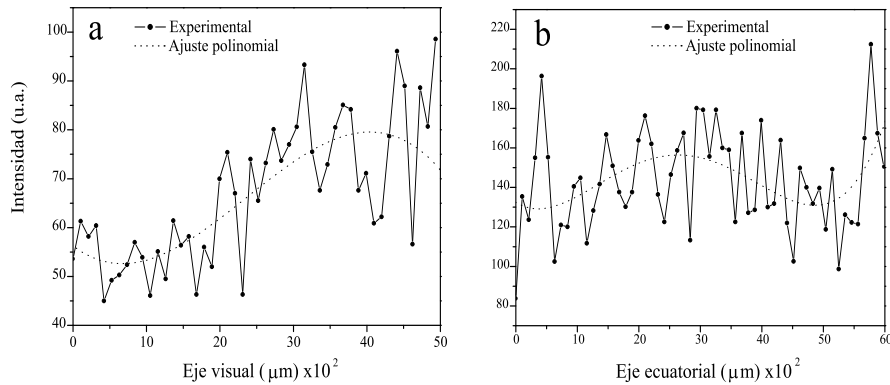


Fig. 6.11: Distribución de las intensidades de los picos Raman en 830.6 cm^{-1} de la tirosina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)

podemos observar en la Fig. 6.10-6.12, las intensidades de los picos característicos de la tirosina y el triptófano tienen el mismo perfil en ambos ejes. Esto significa que a lo largo del eje visual la cantidad de tirosina y triptófano se incrementa y después, en la posición

de 4 mm, disminuye. Por otro lado, los cambios de intensidad a lo largo del eje ecuatorial indican que en la parte nuclear estos aminoácidos están más concentrados que en la parte de la corteza. A lo largo del eje visual, la curva de ajuste del triptófano es más prominente que la curva de ajuste de la tirosina. Además, la curva de ajuste del triptófano en la parte nuclear del eje ecuatorial es más prominente que la curva de ajuste de la tirosina. Esto significa que el triptófano en la parte nuclear es más concentrado que la tirosina.

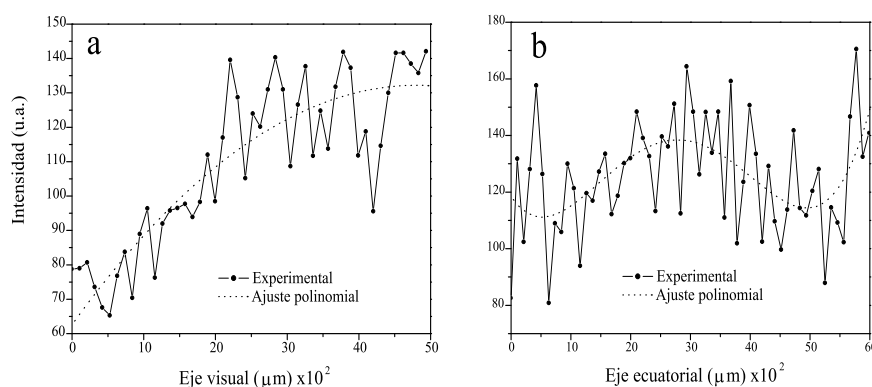


Fig. 6.12: Distribución de las intensidades de los picos Raman en 853.5 cm^{-1} de la tirosina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)

6.3.4. Cambios en la Fenilalanina

La fenilalanina tiene una vibración simétrica de respiro del anillo en 1003 cm^{-1} y una vibración de doblamiento en el plano del enlace C-H en 1031.4 cm^{-1} . Estos son los picos más intensos del espectro de la fenilalanina. La Fig. 6.13 muestra la variación de la intensidad del pico de la fenilalanina en 1003 cm^{-1} a lo largo de los ejes visual y ecuatorial. Se encontró que la intensidad de este pico a lo largo del eje visual se incrementa (Fig. 6.13a). Esto significa que la cantidad de la fenilalanina se incrementa del polo anterior al polo posterior del cristalino. Además, la intensidad (y por lo tanto la cantidad de fenilalanina) del mismo pico a lo largo del eje ecuatorial se incrementa ligeramente y después, entre 2-2.3 mm, disminuye, como muestra la curva polinomial ajustada (Fig. 6.13b). La Fig. 6.14

muestra la intensidad del pico de la fenilalanina en 1031.4 cm^{-1} . Este pico tiene el mismo perfil que el pico en 1003 cm^{-1} .

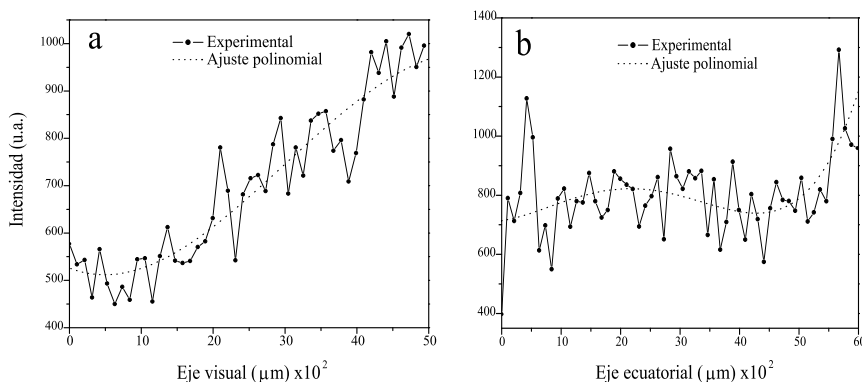


Fig. 6.13: Distribución de las intensidades de los picos Raman en 1003 cm^{-1} de la fenilalanina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)

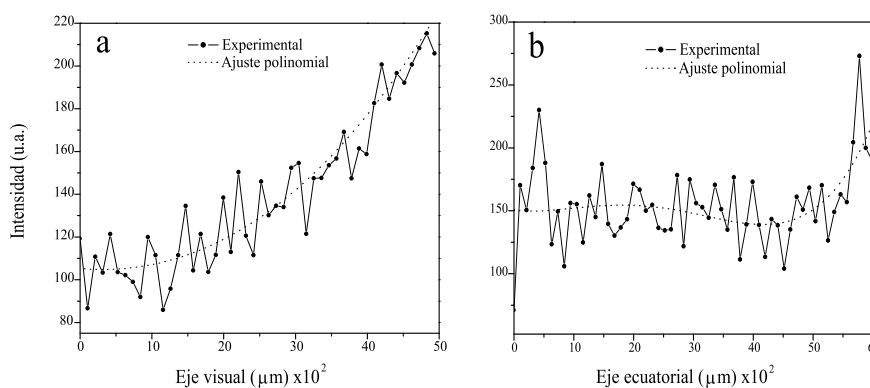


Fig. 6.14: Distribución de las intensidades de los picos Raman en 1032 cm^{-1} de la fenilalanina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)

Las gráficas, construidas usando el método de derivadas para medir las intensidades, presentan el mismo perfil que las gráficas correspondientes, usando el método de la línea base (ver Apéndice D). Esto demuestra que los perfiles de las intensidades de los picos Raman, mostrados en las gráficas, reflejan un comportamiento propio de los componentes de la muestra y que los errores de medición de las intensidades en forma manual, fueron mínimos.

6.3.5. Análisis de Datos

Diez PCs, que representan el 100 % de la variancia total en el conjunto de datos, fueron colocados en el modelo del LDA. La Fig. 6.15 muestra las proyecciones en el LD espacio

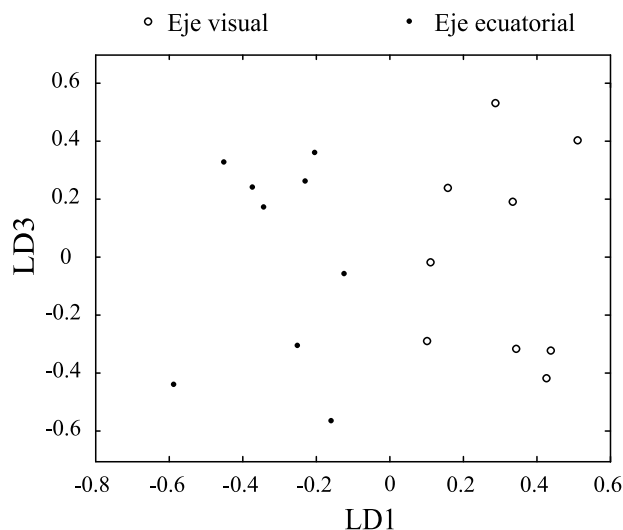


Fig. 6.15: Proyecciones del discriminante lineal para nueve picos Raman de la tirosina, triptópano y fenilalanina, medidos en los ejes visual y ecuatorial.

de nueve intensidades de picos correspondientes a los picos más intensos de la tirosina (642.3, 830.6, 853.5 cm^{-1}), triptópano (758.4, 878.3, 1548.6 cm^{-1}) y fenilalanina (621.2, 1003, 1031.4 cm^{-1}), medidos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial. La validación cruzada (CV) del modelo de datos mostró una correcta clasificación de 100 % del grupo de espectros. Esto significa que la distribución de los aminoácidos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial tienen diferentes perfiles y son bien diferenciados. Se observaron cambios de intensidad de los picos más representativos de la tirosina, triptópano y fenilalanina a lo largo de los ejes visual y ecuatorial.

Parte IV

CONCLUSIONES

“Una conclusión es el lugar a donde llegaste cansado de pensar”.

Anónimo.

7

Conclusiones e Investigaciones Futuras

Se hace una presentación breve de las conclusiones de cada capítulo y del trabajo en general. Finalmente, se menciona las líneas de investigación en el área biomédica que se vienen desarrollando y sus perspectivas en el futuro como alternativas de nuevas técnicas de diagnóstico prematuro de enfermedades.

7.1. Conclusiones Particulares

Se exponen las conclusiones de los capítulos relacionados con los temas de carácter teórico, del montaje de los sistemas Raman y del estudio de proteínas y aminoácidos en el cristalino de cerdo.

7.1.1. Capítulo 1

En este capítulo se muestra que la emisión de la luz Raman por parte de las moléculas excitadas con luz monocromática está regida por reglas de selección. En tal sentido, un modo vibratorio es denominado *Raman activo* si el elemento

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial q_s} \right)_{q=0}$$

de la ecuación (1.17) es diferente de cero. Por otro lado, si el elemento

$$\left(\frac{\partial p_i}{\partial q_s} \right)_{q=0}$$

de la ecuación (1.14) es diferente de cero, el modo vibratorio se llama *Infrarrojo activo*.

7.1.2. Capítulo 2

Se muestra que microscopía Raman está relacionada con dos aspectos ópticos fundamentales, a saber

- ❖ El enfoque de la excitación láser incidente sobre la muestra, y
- ❖ La colección de la luz esparcida.

Se muestra que la intensidad de la luz Raman esparcida total es directamente proporcional a la intensidad de la radiación láser incidente y al cuadrado del diámetro de la mancha del láser dentro de la muestra (ec. 2.18).

7.1.3. Capítulo 3

Se muestra que la unión de aminoácidos a través de enlaces polipeptídicos da origen a las proteínas. De este modo, los aminoácidos constituyen los ladrillos de las proteínas y

se encuentran en dos configuraciones L y D, según sea la orientación del grupo -OH en el gliceraldehído de las Figs. (3.3) y (3.4). De éstos aminoácidos, sólo los aminoácidos L se encuentran en la naturaleza.

Las proteínas presentan cuatro estructuras, de ellas la estructura secundaria muestra que la cadena del polipéptido se pliega localmente en una estructura estable de secuencia regular como α hélices y β hojas plegadas (Fig.3.6).

7.1.4. Capítulo 4

El análisis multivariante, a través del análisis de componentes principales (PCA) y del análisis de discriminación lineal (LDA), resulta ser una herramienta matemática potente en aplicaciones biomédicas, donde las variables son muy grandes. El PCA reduce la dimensionalidad de un conjunto grande de datos e identifica las nuevas variables significantes, mientras que el LDA maximiza la variancia entre grupos y minimiza la variancia dentro de los grupos.

7.1.5. Capítulo 5

De las diferentes configuraciones de montaje del sistema Raman normal, la más adecuada resultó ser la configuración especular. En esta configuración, la radiación láser de excitación tiene una incidencia especular sobre la muestra, a través un objetivo de microscopio de $5\times$ de amplificación. La distribución de los elementos ópticos, en el diseño propuesto, resultó ser muy adecuada porque permite intercambiar muy fácilmente las fuentes láser (He-Ne y Ar^+). El sistema micro-Raman se obtuvo retirando el objetivo de microscopio y colocando un microscopio Leica DMLM. El microscopio descansa sobre una meza con movimiento vertical, que fue diseñada para ser colocada en un costado de la meza holográfica. El movimiento vertical permite posicionar el microscopio, con respecto al haz

láser.

7.1.6. Capítulo 6

Se encontró que tanto las proteínas como los aminoácidos tienen diferentes distribuciones a lo largo de los eje visual y ecuatorial.

En general, las proteínas se incrementan a lo largo del eje visual, mientras que en el eje ecuatorial se mantienen casi constantes. Este comportamiento está relacionado con el gradiente del índice de refracción.

Los aminoácidos, a lo largo del eje visual, se incrementan hasta $\sim 4\text{mm}$, a partir del polo anterior, y luego disminuyen ligeramente. En el eje ecuatorial, la mayor concentración de aminoácidos se encuentra en la parte nuclear.

7.2. Conclusiones Generales

7.2.1. Proteínas

Usando el análisis de discriminación lineal se ha demostrado una separación espectral de la distribución de proteínas en grupos a lo largo de los ejes visual y ecuatorial. Se observó algunos cambios en la conformación de proteínas a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo. A lo largo del eje visual el considerable incremento de las proteínas proporciona una excelente información para explicar el gradiente refractivo del cristalino. Sin embargo, la intensidad del pico en 1087.2 cm^{-1} disminuye a lo largo del eje visual, esto significa que la proteína correspondiente disminuye. A lo largo del eje ecuatorial las proteínas casi no varían. Nuestros resultados están en concordancia con la concepción previa que los cambios ópticos en la luz esparcida es debido a la concentración de la proteínas a lo largo del eje visual, pero a lo largo del eje ecuatorial éstos aspectos

no se mencionan. Las fluctuaciones de las proteínas en ambos ejes son considerables, porque ellos no están distribuidos homogéneamente en el cuerpo del cristalino.

7.2.2. Aminoácidos

El método LDA muestra una gran separación entre ambos grupos de intensidades de picos de aminoácidos (tirosina, triptófano, fenilalanina), medidos en los ejes visual y ecuatorial. Esto da una buena fiabilidad al experimento. Se observaron algunos cambios en la conformación de los aminoácidos, a lo largo de los ejes visual y ecuatorial de la sección transversal del cristalino de cerdo. Basado en las intensidades de los picos Raman de la tirosina y del triptófano, se concluye que a lo largo del eje visual, del polo anterior al polo posterior, ellas se incrementan hasta la posición de ~ 4 mm, y luego disminuyen. Además, la parte nuclear tiene la concentración más alta de estos aminoácidos. Por otro lado, a lo largo del eje visual, la fenilalanina aumenta, mientras que a lo largo del eje ecuatorial aumenta y después, en la posición de 2-2.3 mm, disminuye. Las proteínas de la lente tienen tendencias similares a lo largo del eje visual. Las fluctuaciones de los aminoácidos en ambos ejes son considerables, porque ellos no están distribuidos homogéneamente en el cuerpo del cristalino. Los incrementos de las proteínas, a lo largo del eje visual, están relacionados con el índice de refracción, por consiguiente los incrementos de los aminoácidos analizados también deben estar relacionados de la misma forma, ya que los aminoácidos son los ladrillos de proteínas.

7.3. Investigaciones Futuras

Actualmente se tienen dos líneas de investigación iniciadas, que son:

7.3.1. Cáncer de Mama

En este campo se han iniciado estudios del cáncer de mama en cortes histológicos de biopsias cancerosas. Actualmente se tienen varios resultados preliminares, en los cuales se ha podido identificar y distinguir tejidos afectados de tejidos sanos. El objetivo final de estas investigaciones es determinar un método de detección temprana del cáncer de mama.

7.3.2. Detección de la TRH y TSH

Se ha realizado una investigación previa relacionada con la influencia de la hormona generadora de tirotropina (TRH) sobre la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en suero de sangre de ratas tiroidectomizadas de la cepa Wistar. La identificación de la TRH o la TSH *in situ* es un problema muy grande en el área de las neurociencias.

Apéndices



Aminoácidos: L-glutamina y L-glutámico

Con ayuda del sistema Raman dispersivo se midieron los espectros Raman de algunas sustancias líquidas y sólidas y se compararon con los respectivos espectros reportados en la literatura científica. El sistema Raman se ha diseñado para usar fuentes de excitación que emiten en el rango visible, como son los láseres de He-Ne y de Ar⁺ en las longitudes de onda de 632.8 nm, 488 y 514.5 nm, respectivamente.

Las intensidades de los espectros Raman dependen de la estructura de la molécula en estudio y del volumen focal, así las sustancias líquidas como los alcoholes tienen picos Raman muy intensos; sin embargo, algunas sustancias sólidas presentan un espectro Raman no muy intenso, como en el caso del silicio y varios otros semiconductores. En estos casos, para evitar la saturación del detector CCD o la obtención de espectros de baja definición, un papel importante juegan los tiempos de exposición de la muestra a la excitación láser y el número de acumulaciones.

En la Fig. A.1 se muestra el espectro Raman de la L-glutamina (Sigma, G-5763), usan-

do el láser de He-Ne con 8.3 mW de potencia en muestra, con un tiempo de exposición de 10s, dos acumulaciones y un ancho de rendija del monocromador de 1mm. Se encontró el espectro Raman de la misma sustancia en un sistema FT-Raman comercial con láser de 1064 nm de longitud de onda. Estos espectros se compararon con el correspondiente espectro mostrado por McCreery [66]. Los picos Raman de ambos espectros (ver Fig. A.1

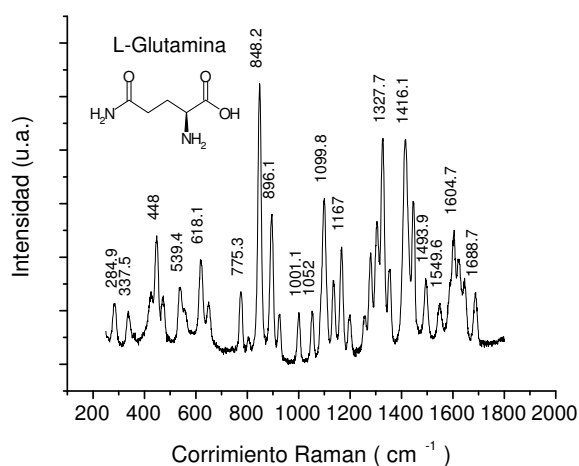


Fig. A.1: Espectro Raman de la L-glutamina.

y Fig. A.2) concuerdan muy bien con los picos reportados por McCreery. Por ejemplo, los picos más intensos en la región de 200–2000 cm⁻¹ del espectro de la L-glutamina, reportado por McCreery, están localizados con los números de onda 849.1, 1097.4 y 1330.8 cm⁻¹, estos picos en el espectro, medido con el sistema Raman dispersivo, están localizados con los números de onda de 848.2, 1099.8 y 1327.7 cm⁻¹, respectivamente; mientras que en el espectro correspondiente, medido con el sistema FT-Raman, estos picos están localizados en 846.0, 1094.8 y 1328.2 cm⁻¹. Se puede observar que las desviaciones de los picos del espectro medido en el sistema Raman dispersivo montado, con respecto a los presentados por McCreery, son de 0.9, 2.4 y 3.1 cm⁻¹, respectivamente; mientras que para los picos del espectro FT-Raman, tales desviaciones son de 3.1, 2.6 y 2.6 cm⁻¹, respectivamente. Los espectros se registraron a temperatura del medio ambiente (24°). Las pequeñas desvia-

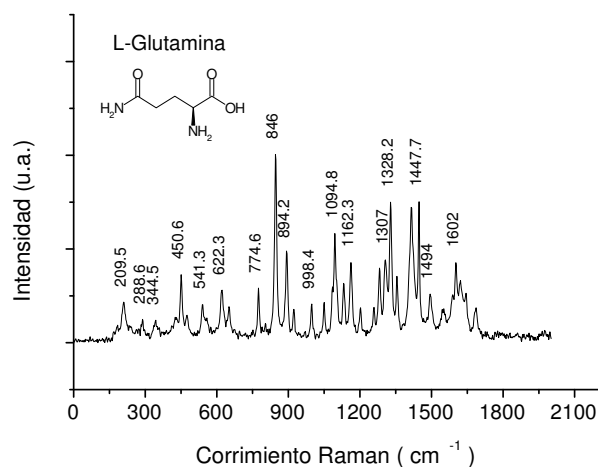


Fig. A.2: Espectro FT-Raman de la L-glutamina.

ciones observadas se encuentran dentro de los límites aceptados y se deben a varios factores como la calibración del sistema, que no es igual para todos los sistemas Raman.

En las Fig. A.3 y Fig. A.4 se muestra el espectro Raman del ácido L-glutámico.

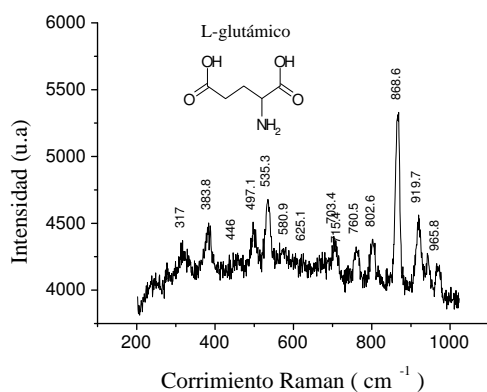


Fig. A.3: Espectro Raman del ácido L-glutámico en la región de 200-1000 cm^{-1} .

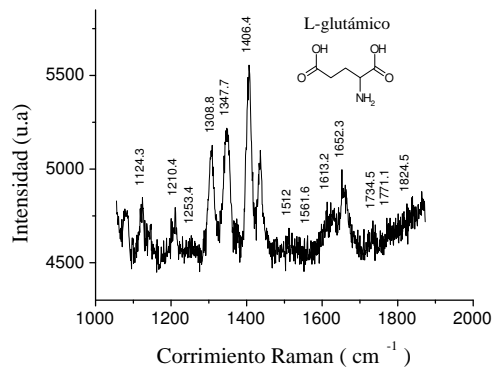


Fig. A.4: Espectro Raman del ácido L-glutámico en la región de 1000-1800 cm^{-1} .

Los picos Raman de estos espectros concuerdan muy bien con los reportados por McCreery. Así, por ejemplo, el pico más intenso, localizado en 868.6 cm^{-1} , en el espectro Raman reportado por McCreery se encuentra en 866.6 cm^{-1} , siendo la diferencia de 2 cm^{-1} . El siguiente pico Raman en intensidad está localizado en 1406.4 cm^{-1} , mientras

que McCreery lo reporta en 1407.9 cm^{-1} , siendo la diferencia de 1.5 cm^{-1} .

B

Alcoholes Etílico y Metílico

En la Fig. B.1 y en la Fig. B.2 se muestran los espectros del alcohol etílico (99,88 %, J. T. Baker, SDA-40B), medidos con el sistema Raman dispersivo y con el sistema FT-Raman, respectivamente. Estos espectros concuerdan muy bien con el espectro reportado en la

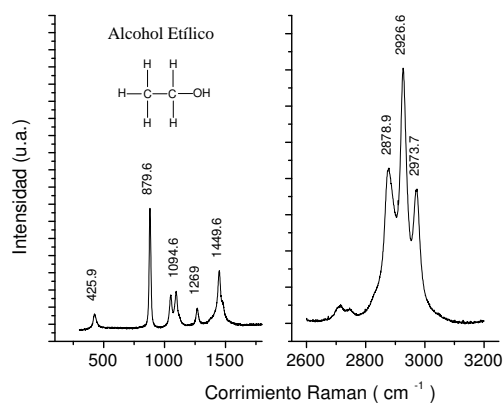


Fig. B.1: Espectro Raman del alcohol etílico.

referencia [41], donde en la región de $200 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ el pico más intenso se localiza

en 880 cm^{-1} , en el espectro Raman dispersivo está en 879.6 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de alargamiento en fase C-C-O, con una desviación de 0.4 cm^{-1} , y en el espectro FT-Raman en 880.7 cm^{-1} , con una desviación de 0.7 cm^{-1} . Asimismo, en la

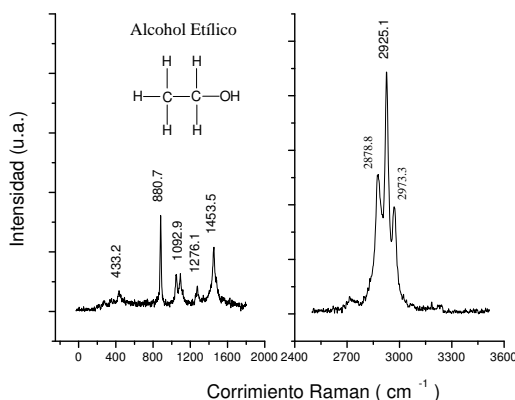


Fig. B.2: Espectro FT-Raman del alcohol etílico.

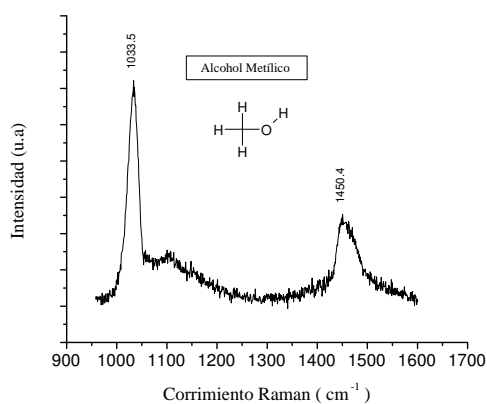


Fig. B.3: Espectro Raman del alcohol Metílico.

región de $2600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ el pico más intenso en el espectro de la referencia [41] se sitúa en 2926 cm^{-1} , mientras que en el espectro Raman dispersivo aparece en 2926.6 cm^{-1} , correspondiente a la vibración antisimétrica de alargamiento CH_2 , con una desviación de 0.6 cm^{-1} ; por otro lado, en el espectro FT-Raman el pico mencionado está en 2925.1 cm^{-1} , con una desviación de 0.9 cm^{-1} . Esto demuestra una vez más que el sistema Raman

dispersivo montado funciona adecuadamente.

En la Fig. B.3 se muestra el espectro Raman del alcohol metílico, se puede observar que los picos más intensos están localizados en 1033.5 cm^{-1} y 1450.4 cm^{-1} . Este espectro se obtuvo usando una fuente de excitación de 632.8 nm de longitud de onda, 1 s de exposición y 3 acumulaciones. McCreery [66] reporta un espectro Raman del alcohol metílico con picos localizados en 1033.0 cm^{-1} y 1451.7 cm^{-1} . Se puede notar la gran coincidencia entre los correspondientes picos. El pico más intenso de 1450.4 cm^{-1} corresponde a una vibración de doblamiento antisimétrica (δ_a) del CH_3 y el segundo pico de 1033.5 cm^{-1} corresponde a una vibración de estiramiento del enlace C-O.



Uso del Filtro Holográfico de 514.5 nm

Usando luz blanca se midieron las curvas de transmitancia del filtro Notch-Plus a la longitud de onda de 514.5 nm para ángulos de inclinación de 9° y 32° , con un tiempo de exposición de 0.6s y dos acumulaciones, para cada caso, como se muestra en la Fig. C.1.

Se usó el filtro Notch-Plus para medir el espectro del alcohol etílico con luz láser de argón a 488 nm. La medición se realizó inclinando el eje del filtro holográfico a un ángulo $\varphi = 32^\circ$ con un tiempo de exposición de 1s, 2 acumulaciones y una potencia láser en muestra de 9.5 mW. También se midió el espectro del mismo alcohol etílico usando la línea de emisión de 514.5 nm del mismo láser de argón, para una inclinación del eje del filtro holográfico de 9° , con un tiempo de exposición de 0.36s, 2 acumulaciones y una potencia láser en muestra de 11.44 mW. Los dos espectros se muestran en la Fig. C.1.

Los desniveles en la curva de transmitancia del filtro holográfico de la Fig. C.1, se deben a la forma inclinada del espectro de la luz blanca, medido sin la presencia del filtro holográfico, como se muestra en la Fig. C.2.

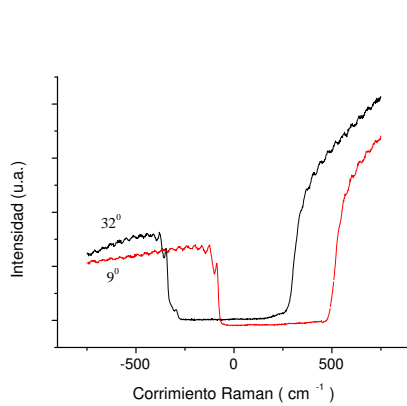


Fig. C.1: Curvas de transmitancia del filtro holográfico para la longitud de onda de 514.5 nm.

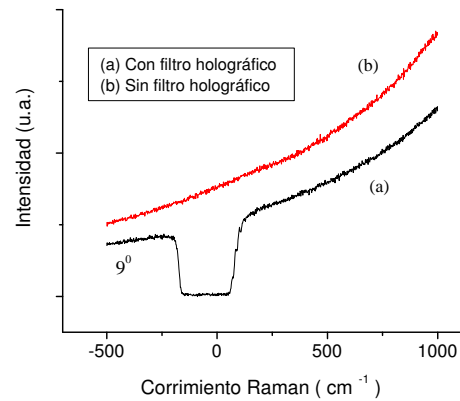


Fig. C.2: (a) Curva de transmitancia para una inclinación del filtro holográfico de 9°, (b) Espectro de luz blanca sin filtro holográfico.

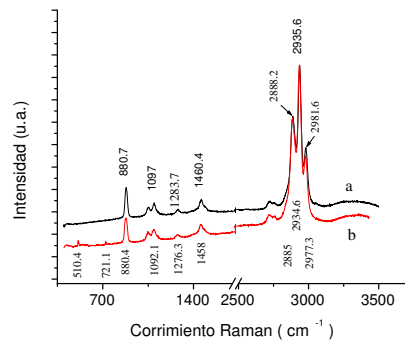


Fig. C.3: Espectros Raman del alcohol etílico medidos usando las líneas de emisión del láser de argón de 514.5 nm (a) y 488 nm (b).

De la Fig. C.3 se observa que las posiciones de los picos del espectro (b), con respecto a las posiciones de los picos del espectro (a), están desplazadas hacia las frecuencias menores en cantidades menores a 5 cm^{-1} . Durante la medición del espectro del alcohol etílico con luz láser de 488 nm no se utilizó filtro de interferencia, por eso aparecen líneas plasma del láser en 510.4 cm^{-1} y 721.1 cm^{-1} .



Derivadas de los Espectros Raman

Durante las mediciones de las intensidades de los espectros Raman, trazando manualmente una línea base entre dos puntos, se pueden introducir errores. Para comprobar que las mediciones de las intensidades de los picos Raman, realizadas en forma manual, se midieron adecuadamente, se derivaron los espectros (ver [D.1](#)) usando el programa Matlab y se midieron las intensidades de cada pico Raman de la tirosina, triptófano y de la fenilalanina. Se tomaron estas intensidades y se graficaron con respecto a la distancia a lo largo de los ejes visual y ecuatorial del cristalino de cerdo.

Como se puede observar en las Figs. [D.2-D.6](#), los perfiles de las intensidades de los aminoácidos, usando la corrección de una línea base entre dos puntos y aplicando la primera derivada a los espectros Raman, son muy similares. Esto significa que los errores introducidos en la medición de las intensidades de los picos, usando la línea base entre dos puntos, son mínimos.

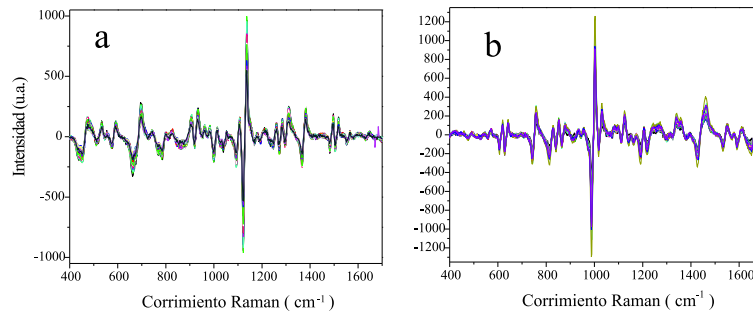


Fig. D.1: Derivadas de los espectros Raman del cristalino de cerdo, tomados a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

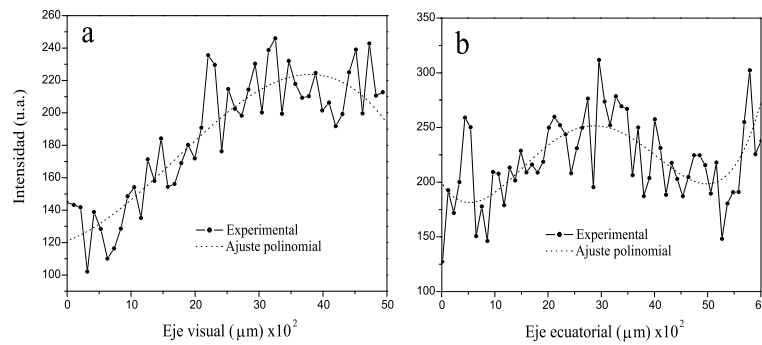


Fig. D.2: Distribución de las intensidades del pico Raman en 758.4 cm^{-1} del triptófano, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

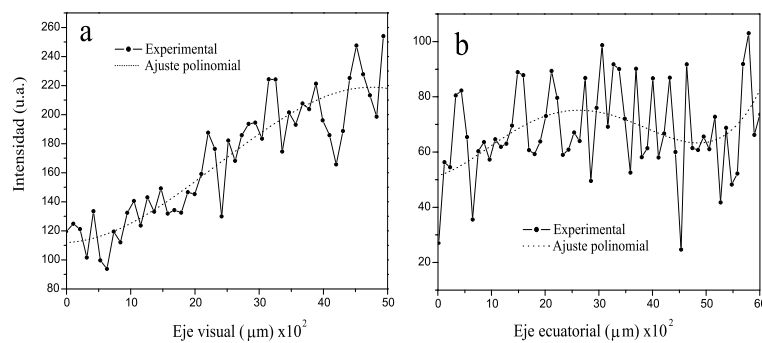


Fig. D.3: Distribución de las intensidades del pico Raman en 830.6 cm^{-1} de la tirosina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

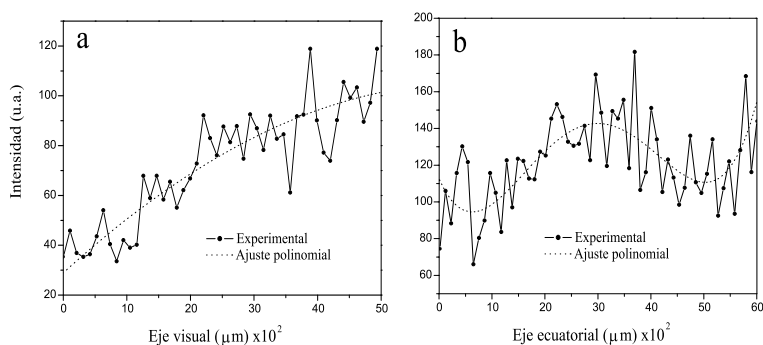


Fig. D.4: Distribución de las intensidades del pico Raman en 853.5 cm^{-1} de la tirosina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

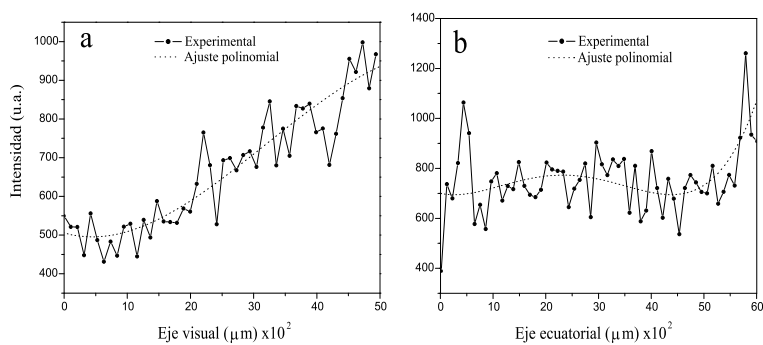


Fig. D.5: Distribución de las intensidades del pico Raman en 1003 cm^{-1} de la fenilalanina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

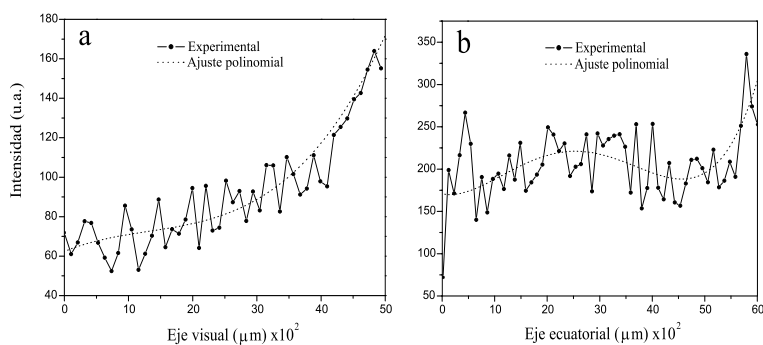


Fig. D.6: Distribución de las intensidades del pico Raman en 1032 cm^{-1} de la fenilalanina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.

Referencias

- [1] N.-T. Yu, J. F. R. Jr Kuck, C. C. Askren, *Curr. Eye Res.* **1** (1982) 615.
- [2] H. Yuh, F.-Y. Huang, *J. Chin. Chem. Soc.* **49** (2002) 283.
- [3] D. Wolverson, *Raman Spectroscopy*, in: D. L. Andrews and A. A. Demidov (Ed.), *An Introduction to Laser Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1995, p. 91.
- [4] M. G. Comstock and J. A. Gray, "*Raman Spectroscopy of Symetric Oxyanions*", *J. Chem. Educ.* **76**, 1272-1275 (1999).
- [5] L. Brillouin, *Ann. Phys. (Paris)* **88** (1922) 17.
- [6] A. Smekal, *Naturwiss* **16** (1923) 873.
- [7] M. Cardona, *Light Scattering in Solids I*, Springer-Verlag, Berlin, 1983.
- [8] C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* **121** (1928) 69.
- [9] G. Landsberg and L. Mandelstam, *Naturwis* **16** 557 (1928) 772.
- [10] W. Hayes and R. Loudon: *Scattering of light by crystals*, John Wiley & Sons, New York, 1978.
- [11] J. Reichardt, S. E. Bisson, S. Reichardt, C. Weitkamp, and B. Neidhart, "*Rotational vibrational-rotational Raman differential absorption lidar for atmospheric ozone measurements: methodology and experiment*", *Appl. Opt.* **39** (2000) 6072-6079.
- [12] K. P. J. Williams, G. D. Pitt, B. J. E. Smith and A. Whitley, "*Use of a Rapid Scanning Stigmatic Raman Imaging Spectrograph in the Industrial Environment*", *J. Raman Spectrosc.* **25** (1994) 131-138.
- [13] W. Xu, S. Zhu, X. Fu, Q. Chen, "*The structure of TiO_x thin film studied by Raman spectroscopy and XRD*", *Appl. Surf. Sci.* **148** (1999) 253-262.
- [14] H. P. J. Buschman, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, A. van der Laarse, A. V. G. Brusckke, M. S. Feld, *Human coronary atherosclerosis studied by morphological NIR Raman confocal microspectroscopy*, *Proceedings of SPIE*, Vol. **3608** (1999) 7-11.
- [15] H. G. M. Edwards, *Raman spectroscopy as a diagnostic probe for ancient skin*, *Proceedings of SPIE*, Vol. **3608** (1999) 92-95.
- [16] E. A. Carter, A. C. Williams, B. W. Barry and H. G. M. Edwards, *The Hazards and Benefits of in Vivo raman Spectroscopy of Human Skin*, *Proceedings of SPIE*, Vol. **3608** (1999) 103-111.
- [17] R. M. Lemor, M. B. Kruger, D. M. Wieliczka, J. R. Swafford and P. Spencer, *Spectroscopic and morphologic characterisation of the dentin /adhesive interface*, *Proceedings of SPIE*, Vol. **3608** (1999) 73-79.
- [18] B. Schrader: *Infrared an Raman Spectroscopy Methods and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany), 1995, p. 8.
- [19] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberly, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1990, p. 10.
- [20] B. Schrader: *Infrared an Raman Spectroscopy Methods and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany), 1995, p. 12.

- [21] L. Andrews and A. Demidov: *An Introduction to Laser Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1995, p. 96.
- [22] J. R. Ferraro and K. Nakamoto: *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1994, p. 25.
- [23] K. Nakamoto: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds Part A: Theory and Applications in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1997, p. 7.
- [24] G. Placzek (1934). *Rayleigh–Streuung und Raman Effekt*, in *Handbuch der Radiologie*, E. Marx (Ed.), 6,205-374. Akademische Verlag: Leipzig.
- [25] J. R. Ferraro and K. Nakamoto: *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1994.
- [26] W. Demtröder: *Láser Spectroscopy Basic Concepts and Instrumentation*, Springer-Verlag, 2nd edn, Berlin Heidelberg, 1996, p. 491.
- [27] B. Schrader: *Infrared an Raman Spectroscopy Methods and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany), 1995, p. 25.
- [28] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberly: *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic Press, San Diego, 1990, p. 65.
- [29] M. Delhaye and M. Migeon, C. R. Acad. Sci. Paris, 262, 702, (1966) 1513.
- [30] J. J. Laserna, *Modern Techniques in Raman Spectroscopy*, Jhon Wiley & Sons, Chichester, 1996, p. 109.
- [31] B. Richards, E. Wolf, Proc. Roy. Soc. London A **253** (1959) 358.
- [32] C. Brémard, P. Dhamelincourt, J. Laureyns, and G. Turrell, J. Mol. Struct. **142** (1986) 13.
- [33] G. Turrell, Practical Raman Spectroscopy, Raman Sampling, in: D. J. Gardiner, P. R. Graves, Springer Verlag, Berlin, 1989, pp. 20.
- [34] G. Turrell and J. Corset, *Raman Microscopy: Developments and Applications*, Academic Press, London, 1996, p. 36.
- [35] J. van Mameren, *Single molecule mechanics of biopolymers: An optical tweezers study*, Master Thesis of Physics, Vrije Universiteit, Amsterdam, 2002, p. 3.
- [36] K. Pearson, *On lines and planes of closest fit to system of points in space*, Philosophical Magazine **2**, (1901) 559-72.
- [37] H. Hotelling, *Analysis of a complex of statistical variables into principal components*, Journal of Educational Psychology **24** (1933) 417-41.
- [38] J. Jaklin, P. Krenmayr, K. Varmuza, *Polycyclic aromatic compounds in the atmosphere of Linz (Austria)*. Fresenius Z. Anal. Chem. **331** (1988) 479-485.
- [39] A. Alcázar, F. Pablos, M. J. Martín, A. G. González, Talanta **57** (2002) 45.
- [40] B. S. Everitt, G. Dunn *Applied Multivariate Data Analysis*, Edward Arnold, London, Great Britain, 19915, p. 45.
- [41] J. R. Ferraro and K. Nakamoto: *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, San Diego, 1994, p. 163.
- [42] G. Turrell and J. Corset: *Raman Microscopy: Developments and Applications*. Academic Press, San Diego, 1996, p. 261.
- [43] S. Jimenez, *Micro-Raman spectroscopy: a powerful technique for materials reserch*, Microelec. J. **31**, (2000) 419-427.

- [44] B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, T. Löchte, H. Schulz, E. Tatsch and S. Wessel, *J. Mol. Struct.* **480-481** (1999) 21-32.
- [45] M. Manfait and I. Năbiev, Applications in Medicine, in: G. Turrell and J. Corset: Raman Microscopy, Developments and Applications, Academic Press, London, 1996, pp. 391-393.
- [46] J. P. Wicksted, N. J. C. Bauer, R. J. Erckens, F. H. Jongsma, E. E. Smit-Kepel, M. Motamedi and W. F. March, *Proceedings of SPIE*, **3608** (1999) 112-121.
- [47] M. Stone, C. Kendall, N. Shepaherd, P. Crow, H. Barr, *J. Raman Spectrosc.* **33** (2002) 564.
- [48] T. C. Bakker Schut, R. Wolthuis, P. J. Caspers, G. J. Puppels, *J. Raman Spectrosc.* **33** (2002) 580.
- [49] P. K. Kaiser and R. M. Boynton, *Human Color Vision*, Optical Society of America, Washington, DC, 1996, pp. 96-97.
- [50] R. F. Jacob, R. J. Cenedella, R. P. Mason, *The Rigaku Journal* **17** (2000) 5.
- [51] C. K. Patel, A. J. Bron, *Association of Optometrists* **27** (2001).
- [52] D. Tang, D. B. Borchman, M. C. Yappert, *Ophthalmic Res.* **31** (1999) 452.
- [53] N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, B. Willekens, G. Vrensen, J. Greve, C. Otto, *Biopolym (Biospectrosc)* **72** (2003) 1.
- [54] Y. Ho and F.-Y. Huang, *J. Chin. Chem. Soc.* **49** (2002) 283.
- [55] P. Rösch, J. Popp, W. Kiefer, *J. Mol. Struct.* **480-481** (1999) 121.
- [56] J. L. Haston, S. B. Engelsens, M. Roessle, J. Clarkson, E. W. Blanch, C. Baldock, C. M. Kieley, T. J. Wess, *J. Biol. Chem.* 2003, (in press).
- [57] N.-T. Yu, E. J. East, *J. Biol. Chem.* **250** (1974) 2196.
- [58] E. J. East, R. C. C. Chang, N.-T. Yu, *J. Biol. Chem.* **253** (1978) 1436.
- [59] M. H. Smeets, G. F. Vrensen, K. Otto, G. J. Puppels, J. Greve, *Biochim. Biophys. Acta* **1164(3)** (1993) 236.
- [60] I. Siebinga, G. F. Vrensen, K. Otto, G. J. Puppels, F. F. De Mul, J. Greve, *Exp. Eye Res.* **54(5)** (1992) 759.
- [61] C. L. De Korte, A. F. van der Steen, J. M. Thijssen, J. J. Duindam, C. Otto, G. J. Puppels, *Exp. Eye Res.* **59(5)** (1994) 617.
- [62] A. F. van der Steen, C. L. de Korte, J. M. Thijssen, *Ultrasound Med. Biol.* **20(9)** (1994) 967.
- [63] W. Chen, S. Năie, J. F. R. Jr. Kuck, N.-T. Yu, *Biophys. J.* **60** (1991) 447.
- [64] S. Năie, K. L. Bergbauer, J. F. R. Kuck, N.-T. Yu, *Exp. Eye Res.* **51** (1990) 619.
- [65] J. Pande, M. J. McDermott, R. H. Callender, A. Spector, *Arch. Biochem. Biophys.* **269** (1989) 250.
- [66] R. L. McCreery, *McCreery Raman Library*, Thermo Galactic, <http://spectra.galactic.com/SpectraOnline/code/Details.asp>.

Índice de figuras

1.1.	Modo normal de vibración del modelo de un balón y un resorte de una molécula diatómica como el HCl. El desplazamiento con respecto al tiempo para cada masa es una onda seno y el centro de gravedad es inmóvil.	10
1.2.	Modelo de una molécula diatómica. En la derecha están dos soluciones de la ecuación para el movimiento axial, donde el desplazamiento de las masas como función del tiempo está trazado para la traslación y vibración.	10
1.3.	Cambios de la polarizabilidad elipsoidal durante la vibración de la molécula de CO ₂	14
1.4.	Cambios en la polarizabilidad con respecto al desplazamiento de la coordenada durante las vibraciones ν_1 y $\nu_{2,3}$ en la molécula de CO ₂	15
1.5.	Cambios de la polarizabilidad elipsoidal durante las vibraciones normales de la molécula de H ₂ O.	15
1.6.	Mecanismos de esparcimiento IR y Raman.	16
1.7.	Principio del esparcimiento Raman: a) Durante un impacto elástico del fotón de energía $h\nu_0$ con la molécula, el fotón esparcido tiene la misma energía (Rayleigh); si el impacto es inelástico, se esparce un fotón con energías menor o mayor a la energía del fotón incidente, en una cantidad igual a la energía vibratoria $h\nu_s$ de los átomos en la molécula. b) Diagrama de niveles: debido al fotón incidente, las moléculas son llevadas del estado vibratorio fundamental al estado vibratorio excitado, donde son esparcidos un fotón de luz de energía $h\nu_R^- = h\nu_0 - h\nu_s$ (línea de Stokes) y otro con energía $h\nu_R^+ = h\nu_0 + h\nu_s$ (línea de anti-Stokes).	20
1.8.	Orientación del vector del campo eléctrico de la vibración excitadora con respecto al plano de observación yz	21
2.1.	Semiapertura efectiva θ'_m para la muestra de índice de refracción n	26
2.2.	Geometría del esparcimiento especular.	30
2.3.	Colección del flujo Raman de una rodaja de muestra por un objetivo de microscopio.	32
3.1.	Estructura general de los aminoácidos.	35
3.2.	Grupo guanidino en la arginina.	35
3.3.	A) Fórmula de proyección del L-gliceraldehído; B) Fórmula de proyección de un L- α aminoácido.	37
3.4.	C) Fórmula de proyección del D-gliceraldehído; D) Fórmula de proyección de un D- α aminoácido.	37
3.5.	Enlace peptídico.	38
3.6.	Estructura de los α -hélice (arriba) y β -hojas (abajo).	39
3.7.	Estructura de la proteína tubulina dimérica, consistente de dos 50 kd subunidades α y β tubulina. La tubulina es el constituyente de los microtubos filamentosos.	40

4.1. Datos multivariantes y variables latentes. En un plano de característica simple se usan dos características seleccionadas como un plano de coordenadas. En los métodos multivariantes típicos (PCA, PLS) se usan las variables latentes como plano de coordenadas. Muchos métodos usan variables latentes que son funciones lineales de todas las características; esto corresponde a una proyección sobre una línea recta.	42
4.2. Proyección de un vector objeto x sobre una línea recta que define una variable latente a través del vector a . El valor (cuenta) de la variable latente es u . El número de características, p , es dos en este esquema pero en aplicaciones químicas normalmente está entre 5 y 200.	43
4.3. Diferentes vistas de las variables latentes definidas. El PCA preserva las distancias entre los objetos por una variable latente que posee la máxima varianza de las cuentas. El LDA, análisis de discriminación lineal, resulta en una variable latente que permite la separación máxima entre dos clases dadas.	45
4.4. Plano de esparcimiento de los datos de contaminación. Objetos: 50 muestras de la ciudad Viena (●) y 20 muestras de la ciudad de Linz (○), Austria. Características: concentraciones (suma en %) de 20 hidrocarburos policíclicos, autoescaladas. Las varianzas del PC1 y PC2 son 45.9 % y 26.0 % de la varianza total, respectivamente. Las muestras de las dos ciudades están claramente separadas y muestran perfiles diferentes de concentración.	49
4.5. LDA de cinco tipos de café.	53
5.1. Montaje del sistema Raman con fibra óptica: L, lentes; FO, fibra óptica; OM, objetivo de microscopio; M, muestra (oblea de silicio) ; LE, luz esparcida; FH, filtro holográfico; R, rendija; E1, espejo colimador; E2, espejo focalizador; RH, rejilla holográfica; CCD, detector y PC, computadora.	59
5.2. Montura de la fibra óptica.	60
5.3. Montaje del sistema Raman con geometría de 90° o de incidencia rasante: HL, haz láser; E, espejos; A, atenuador; y FI, filtro de interferencia.	61
5.4. Montaje del sistema Raman con geometría de 180°: D, diafragmas.	61
5.5. Espectro Raman del silicio.	63
5.6. Variación del ángulo para determinar las líneas de corte del filtro holográfico: LB, luz blanca; y φ , ángulo de inclinación del FH, con respecto a la dirección de la luz blanca.	64
5.7. Curvas para determinar las líneas de corte del filtro holográfico.	64
5.8. Espectros Raman del etanol: 8.3 mW de potencia en muestra, 5s de exposición y 2 acumulaciones.	64
5.9. (a) Curva de corte del filtro holográfico para una inclinación de 9°; (b) espectro Raman del etanol; (c) espectro de la luz láser al atravesar el filtro de interferencia y el filtro holográfico.	65
5.10. Sistema micro-Raman.	66
5.11. Sistema micro-Raman infrarrojo: 1-haz láser, 2- filtro holográfico, 3-microscopio, 4-cámara de vídeo, 5-diafragma, 6-rendija, 7-cámara CCD.	68
5.12. Volumen focal en la superficie (a) y bajo la superficie (b) de la muestra.	69
6.1. Trayectoria del haz láser (632.8 nm) a lo largo de los planos visual (a) y ecuatorial (b).	74
6.2. Picos Raman característicos de las proteínas del cristalino.	77
6.3. Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente a las vibraciones del enlace C-N de proteínas, a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.	78
6.4. Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente al enlaces C-N de proteínas y C-C de lípidos, a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.	78
6.5. Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente a la amida III a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.	79
6.6. Variaciones de la intensidad del pico Raman correspondiente al enlace CH_2 de proteínas y lípidos a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.	79
6.7. Variaciones de la intensidad del pico Raman de la vibración de estiramiento del enlace C=C de la amide I a lo largo del a) eje visual y del b) eje ecuatorial.	80

6.8.	Proyección discriminante lineal para cada espectro de los grupos visual y ecuatorial del cristalino.	81
6.9.	Algunos picos Raman característicos de los aminoácidos en un cristalino de cerdo normal.	83
6.10.	Distribución de las intensidades de los picos Raman en 758.4 cm^{-1} del triptófano a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)	84
6.11.	Distribución de las intensidades de los picos Raman en 830.6 cm^{-1} de la tirosina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)	84
6.12.	Distribución de las intensidades de los picos Raman en 853.5 cm^{-1} de la tirosina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)	85
6.13.	Distribución de las intensidades de los picos Raman en 1003 cm^{-1} de la fenilalanina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)	86
6.14.	Distribución de las intensidades de los picos Raman en 1032 cm^{-1} de la fenilalanina a lo largo de los ejes visual a) y ecuatorial b)	86
6.15.	Proyecciones del discriminante lineal para nueve picos Raman de la tirosina, triptófano y fenilalanina, medidos en los ejes visual y ecuatorial.	87
A.1.	Espectro Raman de la L-glutamina.	99
A.2.	Espectro FT-Raman de la L-glutamina.	100
A.3.	Espectro Raman del ácido L-glutámico en la región de $200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$	100
A.4.	Espectro Raman del ácido L-glutámico en la región de $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$	100
B.1.	Espectro Raman del alcohol etílico.	102
B.2.	Espectro FT-Raman del alcohol etílico.	103
B.3.	Espectro Raman del alcohol Metílico.	103
C.1.	Curvas de transmitancia del filtro holográfico para la longitud de onda de 514.5 nm	106
C.2.	(a) Curva de transmitancia para una inclinación del filtro holográfico de 9° , (b) Espectro de luz blanca sin filtro holográfico.	106
C.3.	Espectros Raman del alcohol etílico medidos usando las líneas de emisión del láser de argón de 514.5 nm (a) y 488 nm (b).	106
D.1.	Derivadas de los espectros Raman del cristalino de cerdo, tomados a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	108
D.2.	Distribución de las intensidades del pico Raman en 758.4 cm^{-1} del triptófano, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	108
D.3.	Distribución de las intensidades del pico Raman en 830.6 cm^{-1} de la tirosina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	108
D.4.	Distribución de las intensidades del pico Raman en 853.5 cm^{-1} de la tirosina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	109
D.5.	Distribución de las intensidades del pico Raman en 1003 cm^{-1} de la fenilalanina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	109
D.6.	Distribución de las intensidades del pico Raman en 1032 cm^{-1} de la fenilalanina, usando derivadas de los espectros, medidos a lo largo de los ejes a) visual y b) ecuatorial.	109

Índice de cuadros

1.1. Líneas láser más representativas en la Espectroscopia Raman.	17
3.1. Clasificación de los α aminoácidos con base en la polaridad de las cadenas laterales al pH fisiológico.	36