

Recibido: 24.06.2020 | Aceptado: 15.01.2021

Palabras clave: Aplicaciones, diagnóstico, espectroscopía, medicina, Raman

El efecto Raman: descubrimiento y aplicaciones en el diagnóstico médico

GUADALUPE ELENA DONJUÁN LOREDO

lupitadon@gmail.com

FACULTAD DE MEDICINA, UASLP

MIGUEL GEBRE RAMÍREZ ELÍAS

miguel.gebre@uaslp.mx

FACULTAD DE CIENCIAS, UASLP

La espectroscopía Raman es una técnica óptica con aplicaciones en diversas áreas, incluida la biología y la medicina. Se basa en el efecto Raman, un fenómeno en el que la luz incidente pierde o gana energía a través de interacciones con una muestra. Estos cambios de energía dependen de la frecuencia de vibración de la molécula y pueden usarse para obtener información sobre la composición molecular de la muestra. Las aplicaciones de la espectroscopía Raman en las ciencias de la vida han incluido la cuantificación de biomoléculas, imágenes moleculares de células y tejidos, diagnóstico médico, entre otras. Esta técnica ha ganado popularidad en las aplicaciones biomédicas debido a que es no destructiva, no invasiva, relativamente rápida y no se requiere de una preparación previa de la muestra. Debido a estas características, se ha utilizado como una alternativa a las técnicas estándar como la biopsia o el análisis químico de sangre. El éxito de la espectroscopía Raman en aplicaciones biomédicas se basa en que la composición molecular del tejido sano es diferente a la del tejido enfermo, y esta diferencia puede reflejarse en la señal Raman. Adicionalmente, pueden identificarse biomarcadores que contribuyan al diagnóstico o monitoreo de enfermedades. Por lo anterior, la espectroscopía Raman ha sido considerada como una técnica con enorme potencial para aplicaciones biomédicas.



Imagen 1.
Chandrasekhara Venkata Raman

¿Quién fue Chandrasekhara Venkata Raman?

Este reconocido físico nació el 7 de noviembre de 1888 en Madrás, un pueblo ubicado al sur de la India (imagen 1.), su padre era profesor de matemáticas y física en la Universidad Rao Narasimha, por lo que desde muy pequeño estuvo en contacto con la literatura científica de esa época. Además de ser muy inteligente y curioso, le gustaba la música, que lo llevó a interesarse en la física vibracional de algunos instrumentos como tambores y el violín. A los 18 años se casó con Lokasundari Ammal y se mudaron a Calcuta, donde trabajó para el Departamento de Finanzas. Raman nunca dejó de lado su deseo de ser científico, así que, a la par de su trabajo en finanzas, realizaba

experimentos en la Asociación India para el Cultivo de las Ciencias (IACS). En 1917, decidió dedicarse de tiempo completo a la investigación y aceptó impartir una cátedra en la Universidad de Calcuta, donde permaneció 15 años. Fue elegido miembro de la Royal Society en 1924 y recibió el Premio Nobel de Física en 1930. A la fecha, es el único premio Nobel que ha obtenido la India y debe destacarse que la totalidad de su trabajo de investigación fue realizado en su país. En 1933, fue nombrado director y profesor del Instituto Indio de Ciencias (IIS) en Bangalore. En 1934 fundó la Academia India de Ciencias y en 1948 creó el Instituto de Investigación Raman (IIR) con donaciones externas y fondos propios. Fue presidente de la Academia

India de Ciencias y profesor del IIR hasta su muerte, el 21 de noviembre de 1970 (figura 1). A Raman se le describe como un hombre con gran pasión por la ciencia. Días antes de su muerte, Raman pronunció estas palabras: “La ciencia solo puede florecer cuando hay un impulso interno. No puede prosperar bajo presión externa” (Krishnan,1981).

¿Qué es el efecto Raman?

Cuando una muestra se ilumina con una fuente de luz, los fotones incidentes se absorben o dispersan. Si se absorben, la energía del fotón se transfiere a las moléculas; si se dispersan y la energía se conserva se denomina dispersión elástica. Sin embargo, una pequeña porción de fotones dispersos (uno de cada 10000 millones de fotones) se puede dispersar de manera inelástica, lo que significa un ligero cambio en la energía del fotón. Esta pequeña diferencia de energía entre el fotón incidente y el fotón dispersado es el efecto Raman, el cual proporciona información a nivel molecular, ya que los fotones interactúan con las moléculas de una muestra produciendo diferentes estados vibracionales moleculares característicos que permiten obtener un espectro único para

una muestra, también conocida como “huella digital” (figura 2).

¿Cómo fue el descubrimiento del efecto Raman?

En 1921, Raman viajó a Inglaterra para impartir una conferencia en el Congreso de Universidades del Imperio Británico en Oxford. Durante su viaje de regreso, observó el color azul del mar Mediterráneo y se preguntó sobre el origen del color del mar. Raman conocía la explicación conocida en aquel entonces, la cual decía que el color del mar se debía a la reflexión del cielo azul, dada por un importante físico inglés de la época, Lord Rayleigh; sin embargo, no estaba completamente convencido y aprovechó el viaje para realizar un experimento, apoyándose de un prisma polarizado de cuarzo y otros componentes que llevaba a la mano; observó que la intensidad espectral máxima de la luz era diferente para el cielo y el mar. Con este experimento concluyó que el color del mar se debía a la dispersión de la luz por las moléculas de agua, y no por el reflejo del cielo azul, de esta manera demostró que la explicación de Rayleigh era incorrecta. En su laboratorio en la India, Raman y sus colaboradores observaron el cambio de

frecuencia de la luz dispersada y sabían que el fenómeno no era la dispersión de Rayleigh, ya que ese tipo de dispersión no producía un cambio de frecuencia. Este fenómeno, posteriormente conocido como efecto Raman, lo describió en un artículo publicado en la revista *Nature* (Raman, 1928). Después de su publicación, el efecto Raman fue confirmado por algunos de los más importantes físicos del mundo en el campo de la óptica (Singh, 2018). Por esto, en 1929, la Sociedad Faraday de Londres celebró un simposio especial dedicado al efecto Raman. En 1930, Raman recibió el Premio Nobel de Física por sus “investigaciones sobre la dispersión de la luz y el efecto que lleva su nombre”.

¿Cómo se obtienen los espectros Raman?

Durante los años posteriores a la Segunda Guerra Mundial, los científicos utilizaron la espectroscopía Raman para compilar un catálogo de frecuencias vibratorias moleculares. Los primeros sistemas experimentales se basaron en fuentes de luz débiles (lámparas de mercurio) y tediosos métodos de detección (placas fotográficas), que dificultaban la medición de la débil señal Raman.

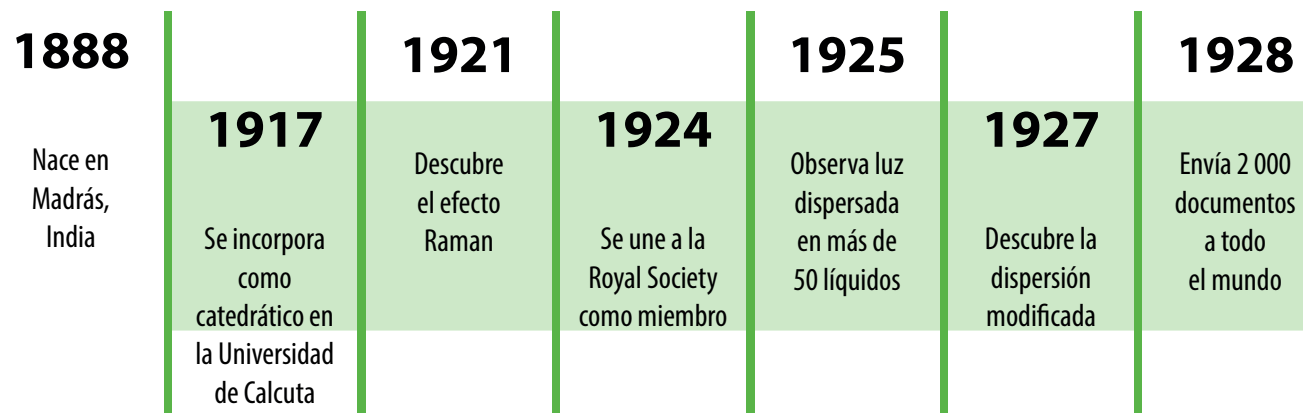


Figura 1. Línea temporal de la vida de Chandrasekhara Venkata Raman

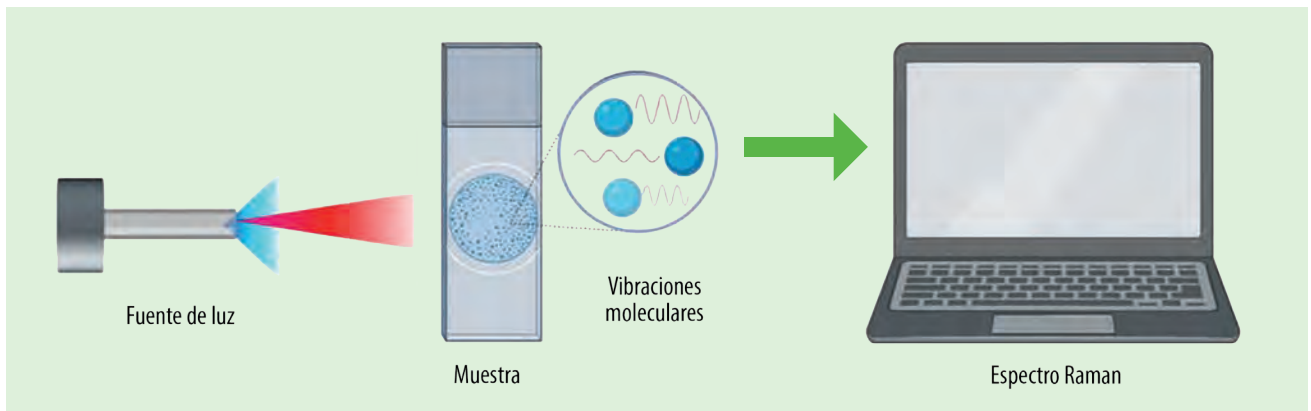


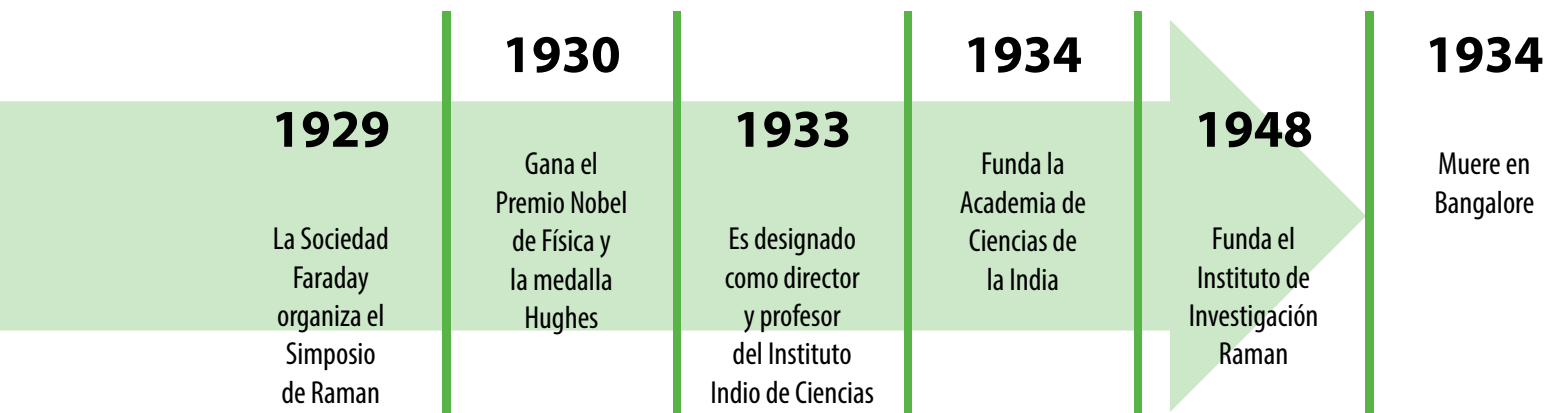
Figura 2.
Metodología de la espectroscopía Raman

El advenimiento del láser en la década de 1960 permitió mejorar la instrumentación Raman y también aumentó la sensibilidad de la técnica. La llegada del láser como fuente de luz, permitió el resurgimiento de la espectroscopía Raman como una técnica analítica común.

A fines de la década de 1970, surgió la microespectroscopía Raman, una combinación de la espectroscopía Raman con un microscopio óptico, la cual se convirtió en una herramienta importante para microanálisis y cuyas aplicaciones son diversas e incluyen desde la ciencia de los materiales hasta la biología celular. Los recientes

avances tecnológicos han permitido la reducción de la instrumentación Raman y desarrollar sistemas portátiles. Actualmente, un sistema Raman portátil (imagen 2) consiste en un diodo láser como fuente de luz, una sonda de fibra óptica para la entrega y recolección de la luz de la muestra, un espectrómetro para la detección de la señal Raman y una interfaz con la computadora (Ramírez-Elías, 2018). Estos sistemas han sido utilizados para diversas aplicaciones gracias a su portabilidad, a que son relativamente rápidos y menos costosos en comparación con los sistemas micro-Raman. Para aplicaciones biomédicas es necesario

considerar características como la potencia, tiempo de integración y longitud de onda del láser para evitar daños en la muestra, así como la exposición máxima permisible (definida por el Instituto Nacional Estadounidense de Estándares) y el aumento de temperatura. Adicionalmente, debe considerarse la contribución de ruido originado por diferentes fuentes, como la fluorescencia intrínseca, el ruido introducido por el equipo utilizado y el ruido generado por fuentes externas. Este ruido debe ser eliminado por métodos experimentales o computacionales para evitar que interfiera con la señal Raman (León-Bejarano, 2019).



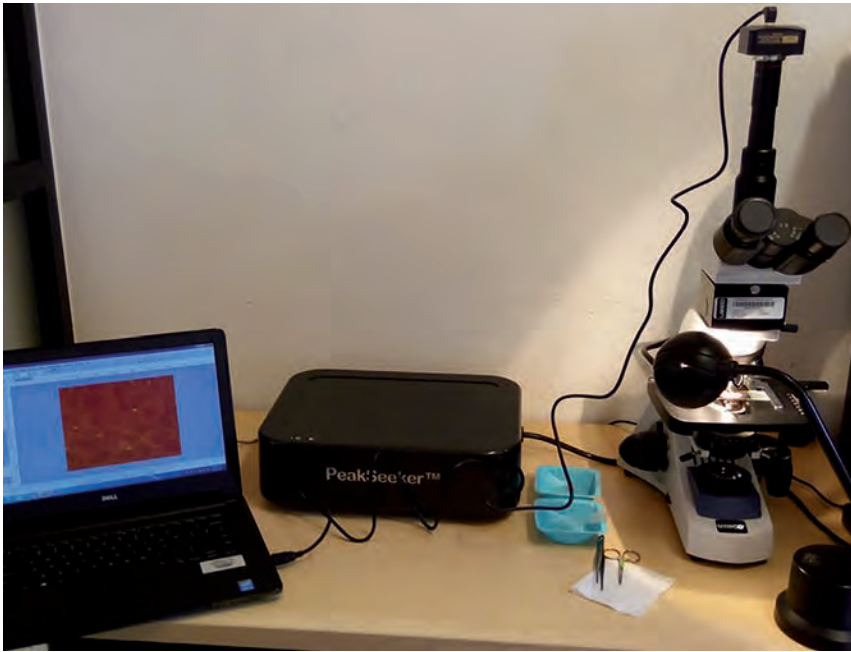


Imagen 2.
Sistema Raman portátil

¿En qué se aplica la espectroscopía Raman?

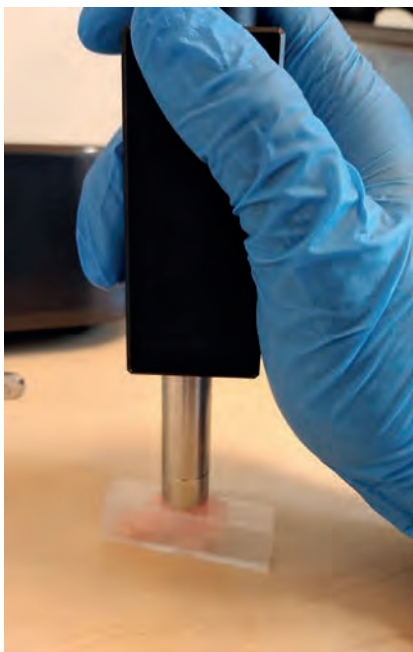
La espectroscopía Raman ha sido adoptada por la química, biología y ciencias de la salud, su principal objetivo es el diagnóstico y la detección de biomarcadores tempranos de enfermedad, debido a la posibilidad de realizar mediciones de manera mínimamente invasiva, *in vivo* y sin preparación previa de la muestra. Por ejemplo, se han identificado lesiones precancerosas gástricas y clasificado la displasia en el esófago de Barrett con alta sensibilidad y especificidad (Bergholt, 2014). También se han detectado lesiones benignas y malignas con una especificidad de 100 por ciento de manera temprana en la mucosa oral (Singh, 2013). En el 2015 un grupo de científicos del Departamento de Neurología y Neurocirugía de la Universidad de McGill de Montreal, Canadá, pudieron detectar glioma cerebral *in situ* en tiempo real durante la cirugía, al identificar diferencias entre el tejido cerebral inva-

dido por células cancerosas y el tejido cerebral normal, con una sensibilidad y especificidad superiores a 90 por ciento; posicionando a la espectroscopía Raman como una potencial herramienta invaluable para la toma de decisiones durante un procedimiento quirúrgico (Jermyn, 2015). Recientemente, científicos del Instituto Tecnológico de Massachusetts han observado *in vivo* la señal Raman de la glucosa y han asociado la intensidad Raman con la concentración de esta molécula en piel, demostrando el potencial de Raman para mediciones de glucosa de manera no invasiva (Kang, 2020). En la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), los autores de este artículo en colaboración con investigadores de las facultades de Ciencias, Ciencias Químicas, Medicina, CIACYT y el Hospital Central, han trabajado durante los últimos 10 años en aplicaciones biomédicas de la espectroscopía Raman, principalmente enfocadas en el diagnóstico temprano de enfermedades. Por

ejemplo, se ha utilizado esta técnica de manera no invasiva en piel, en pacientes con dermatitis atópica (DA); la espectroscopía Raman permitió la detección de la proteína filagrina asociada al desarrollo de la DA de manera temprana, antes de que se manifestaran los signos de la enfermedad (González, 2011). En pacientes con melasma (hiperpigmentación facial), se encontró una asociación entre la respuesta del paciente al tratamiento y la degradación de la melanina, la molécula que genera la pigmentación de la piel (Moncada, 2016). Adicionalmente, se han podido analizar cambios en el colágeno, una proteína que ayuda a dar estructura a la piel, y monitorear su regeneración en pacientes sometidos a una cirugía laser para tratar el acné (Chiwo, 2019). Mediante Raman, ha sido posible detectar *in vivo* y de manera no invasiva, moléculas conocidas como productos avanzados de la glucosilación, el cual es un proceso bioquímico en el que se adiciona un glúcido a otra molécula, estos productos de la glucosilación cumplen con varias funciones, y tienen importancia como marcadores diagnósticos presentes en la piel de pacientes diabéticos (Guevara, 2018). Actualmente, se encuentran en desarrollo otras aplicaciones relacionadas con el diagnóstico médico no invasivo, entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson, asma y el síndrome metabólico (imagen 3).

Para finalizar

Entre las desventajas de la espectroscopía Raman para aplicaciones biomédicas está la debilidad del efecto Raman, dado que únicamente la diezmilésima parte de la luz exhibe este efecto; la mayoría de las veces, la señal Raman se acompaña de una señal de fondo de mayor intensidad, llamada autofluorescencia, provocada por algunas de las moléculas




**GUADALUPE
ELENA
DONJUÁN
LOREDO**

Estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas en la Facultad de Medicina de la UASLP, realiza la tesis "Evaluación por Espectroscopia Raman de las FABP4 y 5 en la piel de ratas con Síndrome Metabólico. Proyecto: C20-FAI-10-60.60:"



Imagen 3.
Aplicaciones de espectroscopia Raman en muestras biológicas

presentes en una muestra biológica. A pesar de las limitantes, está claro que la espectroscopia Raman tiene un gran potencial para mediciones *in vivo* e identificación de marcadores de enfermedad, lo que haría de esta técnica una opción viable para el diagnóstico médico. Es probable que la espectroscopia Raman se convierta en una herramienta útil para el diagnóstico médico no invasivo; sin embargo, para lograrlo es importante combinarla con técnicas de procesamiento de señales y quimiometría para aumentar la confiabilidad en las mediciones, en la identificación de las moléculas de interés, y adicionalmente automatizar el método. La combinación de instrumentación optimizada, procedimientos de medición estandarizados, técnicas de preprocesamiento y de análisis de datos permitirá que la espectroscopia Raman se convierta en una herramienta poderosa para el diagnóstico de enfermedades y una herramienta clínica en un entorno hospitalario. 

Referencias bibliográficas:

Kang, J. W., Park, Y. S., Chang, H., Lee, W., Singh, S. P., Choi, W., ... So, P. T. (2020). Direct observation of glucose fingerprint using *in vivo* Raman spectroscopy. *Science advances*, 6(4), eaay5206.

Krishnan, R. S. y Shankar, R. K. (1981). Raman effect: History of the discovery. *Journal of Raman Spectroscopy*, 10(1), pp. 1-8.

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

Ramírez-Ellías, M. G. y González, F. J. (2018). Raman spectroscopy for *in vivo* medical diagnosis. En Gustavo Morari do Nascimento (Ed.) *Raman Spectroscopy*. *IntechOpen*, DOI: 10.5772 / intechopen.68928.

Singh, R. (2018). Celebrating the 90th Anniversary of the Raman Effect. *Indian Journal of History of Science*, 53, pp. 50-58.