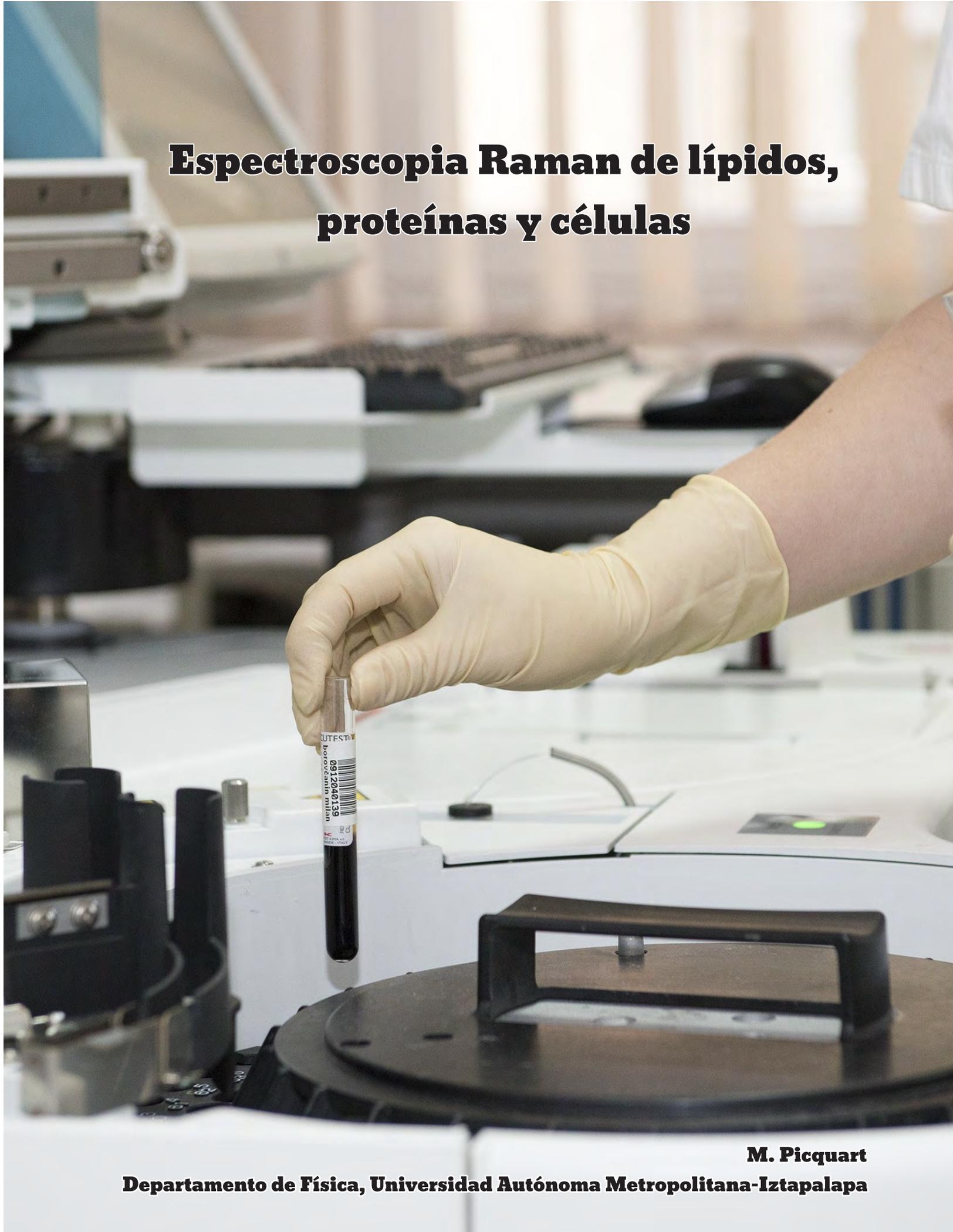


Espectroscopia Raman de lípidos, proteínas y células



M. Picquart

Departamento de Física, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

1. INTRODUCCIÓN

La espectroscopia Raman es una técnica óptica no destructiva que permite el estudio de numerosos tipos de moléculas y sistemas, sólidos, líquidos, por ejemplo semiconductores o moléculas biológicas. El efecto Raman fue descubierto en 1928 [1], pero el estudio de moléculas biológicas con esta técnica está actualmente en pleno desarrollo, en particular gracias al desarrollo del láser a principio de los años sesenta del siglo XX y últimamente a su acoplamiento con la microscopia confocal.

Esta técnica se ha beneficiado también de los progresos tecnológicos en los detectores y sobre todo en la disminución sustancial del tiempo de adquisición de los datos experimentales.

La dispersión Raman y sus variantes, son técnicas que involucran a los estados vibracionales de las moléculas. Es el punto común con la absorción infrarroja. Sin embargo, el mecanismo de interacción de una onda electromagnética con las moléculas es diferente y las reglas de selección también son diferentes. Por lo tanto, las dos técnicas pueden conducir a espectros diferentes pero complementarios [2].

2. LAS CÉLULAS

Los organismos vivos se componen de células. Es la unidad básica más pequeña e importante de todo organismo vivo, que trabaja de manera autónoma. Se dividen en dos grandes grupos: células eucariotas y procariotas. Las células procariotas no tienen núcleo. Su composición es más simple que la de las células eucariotas, y se supone son el primer tipo de organización celular que hubo en el planeta.

Las células eucariotas (animales y vegetales) tienen núcleo, son más grandes que las células procariotas y se encuentran en el cuerpo humano. Poseen una disposición interna más evolucionada y compleja; el material genético está dentro del núcleo, rodeado del nucleoplasma y protegido por su propia membrana.

Pueden realizar funciones específicas, como coordinar la química celular, es decir, las reacciones internas y el metabolismo a través de la acción de sus organelos celulares.

Un esquema de una célula eucariota se presenta en la Fig. 1.

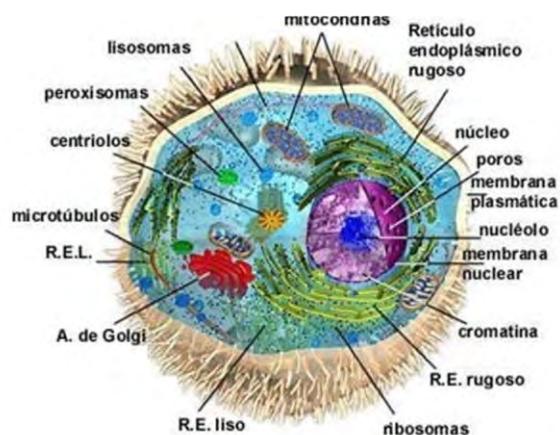


Figura 1. Esquema de una célula eucariota con los diferentes organelos celulares.

Aunque sean muy pequeñas (10 - 100 μm), las células eucariotas tienen una estructura básica y bien organizada. Todas poseen protoplasma, que es el citoplasma más el núcleo celular. El citoplasma, que comprende todo el volumen de la célula - salvo el núcleo -, es el medio donde se producen los cambios químicos y las reacciones metabólicas de la célula. Está compuesto por una solución acuosa denominada citosol, la cual engloba una gran cantidad de estructuras especializadas y organelos celulares.

El cuerpo humano es un sistema complejo formado por cincuenta billones de células, agrupadas en tejidos y organizadas en diferentes sistemas. Estas células poseen una membrana que separa el interior de la misma, donde se encuentra el núcleo, del medio externo; esencialmente, está compuesta de macromoléculas formadas por cadenas largas de átomos. La membrana celular es una estructura casi-fluida, en ella sus componentes pueden desplazarse. Esta fluidez implica que los componentes, en su mayoría, sólo están unidos por uniones no covalentes. La molécula primaria de la membrana celular es el fosfolípido; éste posee una "cabeza" polar (hidrofílica) y dos "colas" no polares (hidrofóbicas); esto es, los fosfolípidos son, por tanto, simultáneamente hidrofílicos e hidrofóbicos (anfipáticos). El nombre de fosfolípido de esta molécula proviene del hecho de que en la "cabeza" polar se encuentra un grupo fosfato que contiene fósforo en su estructura y la cola hidrofóbica corresponde, en su estructura, a la de una grasa.

Los lípidos son un grupo amplio y heterogéneo de compuestos insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos no polares como el éter, el cloroformo o el benceno. Contienen carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Los lípidos pueden tener de una a tres cadenas hidrocarbonadas. En la figura 2, se presenta un esquema de un fosfolípido insaturado.

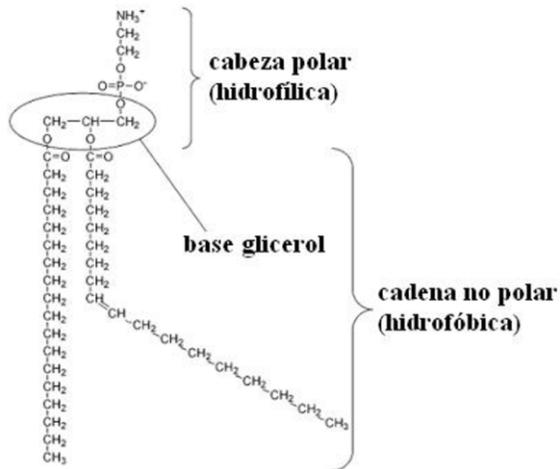


Figura 2. Esquema de un fosfolípido insaturado.

El actual modelo de membrana celular es el resultado de un largo proceso de investigación, mismo que comenzó con las observaciones indirectas que permitieron determinar que los compuestos liposolubles traspasaban fácilmente esta barrera. Este hallazgo llevó a Overton [3, 5], en 1902, a sostener que la composición de la membrana correspondía al de una delgada capa lipídica. Esta hipótesis fue probada por Görter y Grendel en 1925, en el glóbulo rojo [5]. Posteriormente, se agregó la propuesta que sostenía que en la composición de la membrana también intervenían proteínas. Hacia 1935, Danielli y Davson [6] sintetizaron los conocimientos proponiendo que la membrana celular estaba formada por una "bicapa lipídica" con proteínas adheridas a ambas caras de la misma. La integración de los datos químicos, físico-químicos y las diversas técnicas de microscopía llevó al actual modelo de "mosaico fluido" [7]. Según este modelo, que tiene gran aceptación, las membranas constan de una bicapa lipídica en la cual están inmersas diversas proteínas. El espesor de la membrana es, aproximadamente, de 7 nm. La bicapa lipídica ha sido establecida como la base universal de la

estructura de la membrana celular (Fig. 3).

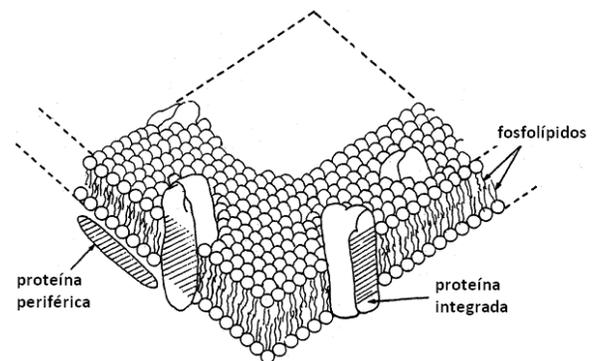


Figura 3. Modelo molecular de membrana en "mosaico fluido". El enlace entre lípidos y proteínas integradas es esencialmente de naturaleza hidrófobo, mientras que entre lípidos y proteínas periféricas es de tipo electrostático.

La estructura en bicapa permite que los grupos del extremo hidrofílico se asocien libremente con el medio acuoso, y que las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos permanezcan en el interior de la estructura, lejos de las moléculas de agua.

Las moléculas, lípidos, proteínas, etc. que conforman una célula viva están constituidas básicamente por cuatro elementos (C, H, O y N) que, combinados entre sí, dan origen a un gran número de compuestos. La sustancia más abundante en la célula viva es el agua y llega a representar más de 70% de su peso. Esta molécula es de gran importancia, pues la mayor parte de las reacciones intracelulares se llevan a cabo en ambiente acuoso y todos los organismos se han conformado alrededor de sus propiedades: su carácter polar, su capacidad para formar enlaces de hidrógeno y su alta tensión superficial, entre otras.

Las proteínas son las moléculas más diversas, complejas y de mayor tamaño presentes en la célula. Estas moléculas tienen formas tridimensionales, necesarias para su función específica. Las proteínas son polímeros constituidos por monómeros denominados aminoácidos. Cada aminoácido posee un grupo amino $-NH_2$ y un grupo carboxilo $-COOH$ unidos al mismo átomo de carbono, denominado carbono alfa. Los aminoácidos se diferencian entre sí por el tamaño de sus cadenas laterales y se agrupan en cuatro categorías, según las propiedades de estas cadenas: no polares, polares, catiónicos y aniónicos. La estructura de las proteínas puede jerarquizarse en

una serie de niveles, interdependientes. Estos niveles corresponden a: *i*) estructura primaria, que corresponde a la secuencia de aminoácidos; *ii*) estructura secundaria, que une los aminoácidos entre sí; *iii*) estructura terciaria, que define la estructura de las proteínas compuestas por un sólo polipéptido y, *iv*) estructura cuaternaria, si interviene más de un polipéptido.

Los péptidos y las proteínas están formados por un grupo que se repite a lo largo de toda la cadena, denominado enlace peptídico o grupo amida (Fig. 4). Una propiedad fundamental de este grupo es que, precisamente, establece puentes de hidrógeno con otros grupos idénticos de la misma cadena.

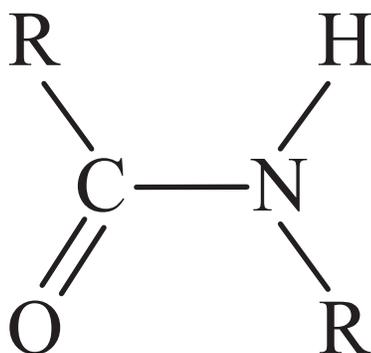


Figura 4. El enlace peptídico, base de la estructura primaria de las proteínas.

Esta propiedad condiciona el plegamiento de las proteínas en su estructura secundaria, en particular a la formación de hélices α o de láminas β , a la cual la dispersión Raman tiene acceso que es lo que veremos en la parte 3.2.2.

3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

3.1 Teoría

Cuando el campo eléctrico de la luz incide sobre un átomo o una molécula los electrones son desplazados por este y se induce un momento dipolar en el átomo o la molécula orientado aproximadamente en la misma dirección que la del campo eléctrico incidente [8-10]. El dipolo inducido es pequeño siempre y cuando la intensidad del campo incidente sea pequeña. En este caso el momento dipolar inducido en el átomo o molécula i está dado por:

$$\vec{\mu}_i = \alpha \vec{E} \quad (1)$$

la constante de proporcionalidad α es la polarizabilidad de la molécula y es distinta para

diferentes moléculas, representa la facilidad con que se puede orientar a la nube electrónica de estas. Si el campo incidente fluctúa con el tiempo, también lo hará el dipolo inducido; el campo eléctrico asociado a la luz hará que el dipolo del átomo o de la molécula oscile con esa frecuencia. El dipolo oscilante emitirá a su vez radiación electromagnética.

Sea \vec{E} el campo eléctrico incidente dado por $E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t$, donde E_0 es la amplitud del campo eléctrico incidente y ν_0 su frecuencia. Ahora consideremos una molécula biatómica que vibra con frecuencia ν_v con movimiento armónico simple. Sea q_v una coordenada a lo largo del eje de vibración, tendremos a un tiempo t ;

$$q_v = q_0 \cos 2\pi\nu_v t \quad (2)$$

Si la polarizabilidad varía durante la vibración entonces para una amplitud de vibración pequeña tendremos;

$$\alpha = \alpha_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right|_0 q_v \quad (3)$$

Sustituyendo la ecuación (2) en la ecuación (3) obtenemos:

$$\alpha = \alpha_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right|_0 q_0 \cos 2\pi\nu_v t \quad (4)$$

Si la radiación interacciona con la molécula entonces de (1) y (2) tenemos que:

$$\vec{\mu}_i = \alpha_0 \vec{E}_0 \left. \frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right|_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right|_0 \frac{E_0 q_0}{2} [\cos 2\pi(\nu_0 + \nu_v)t + \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \quad (5)$$

El primer término de la ecuación (5) describe la dispersión de Rayleigh (sin cambio de frecuencia), los restantes representan la dispersión Raman Stokes y anti-Stokes. Observamos además que se producirá dispersión Raman siempre y cuando $\left. \frac{\partial \alpha}{\partial q_v} \right|_0 \neq 0$, esto es la polarizabilidad de la molécula debe cambiar durante la vibración para que esta sea activa en la dispersión Raman.

3.2 Resultados

En las moléculas orgánicas, los átomos C, H, O y N están ligados entre sí por enlaces con una energía característica para cada tipo: C-H, C-OH, C=O, C=C, etc. En lo que sigue, vamos a estudiar los lípidos, posteriormente las proteínas y finalmente células ya que contienen estos dos componentes.

3.2.1 Cadenas hidrocarbonadas y fosfolípidos

La espectroscopia Raman es una herramienta eficaz en el estudio de la estructura molecular de la membrana celular; la fluidez en la membrana se debe, esencialmente, a la isomerización de conformación de las cadenas hidrocarbonadas, a lo cual esta espectroscopia es muy sensible.

El punto común de estas moléculas es poseer por lo menos una cadena hidrocarbonada. Las moléculas más sencillas de este tipo son el polietileno (PE) y los alcanos, conformados por una cadena lineal de grupos metilenos, terminada en sus dos extremos por un grupo metilo. Veamos algunos de los resultados conocidos sobre la espectroscopia Raman de estos sistemas. La cadena de PE está constituida sólo por grupos metilenos CH₂. Para un estudio detallado, el lector puede consultar las referencias [11-15].

El PE presenta 8 modos de vibración activos en Raman: cuatro modos de deformación de los grupos CH₂ con las bandas 1174 cm⁻¹, 1295 cm⁻¹, 1382 cm⁻¹ y 1440 cm⁻¹, respectivamente denominados *rocking*, *twisting*, *wagging* y *scissors*; dos modos de elongación, simétrico y anti simétrico, de los CH₂ con bandas en 2845 cm⁻¹ y 2880 cm⁻¹; dos modos de elongación, anti simétrico y simétrico de la cadena de carbonos C-C-C, respectivamente en 1065 cm⁻¹ y 1133 cm⁻¹.

En los fosfolípidos se encuentran los mismos modos de vibración mencionados anteriormente; sin embargo, debido a la cabeza polar de la molécula, aparecen algunos modos adicionales. En el caso de cadenas insaturadas también aparecen nuevos modos de vibración. En la Tabla 1, se encuentran frecuencias características de los modos de estas moléculas.

Tabla 1. Atribuciones de las principales vibraciones de los fosfolípidos.

Modo de vibración	Número de onda (cm ⁻¹)
-C-H insaturado	3010
-CH ₃ anti simétrico	2950
-CH ₃ simétrico	2880
-CH ₂ anti simétrico	2920
-CH ₂ simétrico	2850
C=O éster	1730
-CH ₂ deformación	1460
PO ₂ ⁻ anti simétrico	1230
PO ₂ ⁻ simétrico	1085
OC-O-C éster	1170
C-O-P elongación	1045
CN elongación (CH ₃) ₃ N*	970

Las vibraciones C-H contribuyen con varias bandas de vibración en la región 2800-3000 cm⁻¹. La banda Raman cerca de 2890 cm⁻¹ es muy sensible al arreglo lateral de las cadenas; su intensidad disminuye cuando aumenta el desorden intramolecular de las cadenas (isomerización trans-izquierda). La banda situada a 2850 cm⁻¹ se debe a las vibraciones de elongación (ν_{CH}) simétricas; conforme aumenta el desorden, su intensidad permanece relativamente constante. Por lo tanto, el cociente I_{2890}/I_{2850} es un indicador en el estudio de las transiciones de fase de los fosfolípidos. En la Fig. 5 se presentan los cambios en la región de elongación de los CH y de los modos de la cadena hidrocarbonada, entre 10°C y 45°C para la 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocholina o dipalmitoil-fosfatidilcholina (DPPC).

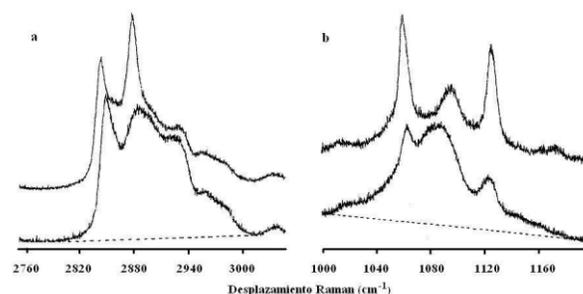


Figura 5. Espectro Raman de una solución acuosa de DPPC a pH 6. a) Modos de elongación de los CH, b) Modos del esqueleto C-C, a 10°C (abajo) y a 45°C (arriba). Reproducido de [16].

3.2.2 Proteínas

EL grupo peptídico está compuesto por dos grupos funcionales: N-H y C=O. En el espectro Raman se pueden observar hasta 9 bandas características de este grupo, denominadas amida A, B, I, ..., VII. Las bandas amida I y amida II son las más importantes del espectro ya que son muy sensibles a la estructura secundaria de la proteína. En la Tabla 2, se encuentran las principales bandas de vibración del grupo peptídico.

Tabla 2. Vibraciones del grupo peptídico: ν : elongación, δ : deformación, RF: resonancia de Fermi, las vibraciones amida V, VI y VII son vibraciones fuera del plano [17, 18]; RF: resonancia de Fermi.

Región (cm ⁻¹)	Nombre	Atribución
~3300	amida A	δ_{N-H}
~3080	amida B	armónico amida II + RF ν_{N-H}
1600 – 1700	amida I	$\nu_{C=O}$ (80%) + ν_{C-N} (10%) + δ_{N-H} (10%)
1520 – 1580	amida II	δ_{N-H} (60%) + ν_{C-N} (40%)
1240 – 1310	amida III	ν_{C-N} (30%) + δ_{N-H} (30%) + ν_{C-O} (10%) + δ_{O-C-N} (10%)
625 – 770	amida IV	δ_{O-C-N} (40%)
640 – 800	amida V	fuera del plano δ_{N-H}
530–610	amida VI	fuera del plano δ_{C-O}
~200R	amida VII	fuera del plano ν_{C-N}

Además del grupo amida, los residuos son identificados por la presencia de vibraciones de grupos CH que aparecen cerca de 2900 cm⁻¹ para las vibraciones de elongación y cerca de 1450 cm⁻¹ para las vibraciones de deformación. Algunos aminoácidos pueden presentar una banda característica que permite identificarlos, como es el caso del triptófano que presenta una banda fina y generalmente intensa en 1002 cm⁻¹.

Las principales vibraciones que contribuyen al espectro Raman de proteínas se deben a los diferentes enlaces del grupo peptídico; éstos producen varias contribuciones en diferentes regiones del espectro. Las frecuencias más intensas en Raman corresponden a los modos amida I y amida III, cuyas frecuencias se relacionan con la estructura secundaria de las proteínas. El modo amida I se encuentra entre 1600 y 1700 cm⁻¹ y se debe principalmente a la vibración de elongación C=O del grupo peptídico. El modo amida III se encuentra entre 1200 y 1300 cm⁻¹ y se debe principalmente a un acoplamiento entre la vibración de deformación del grupo N-H y la de elongación del grupo C-N. La vibración amida II que se observa en absorción infrarroja no es activa en Raman. Por otra parte, algunos residuos poseen un espectro Raman intenso y muy característico, el cual conviene considerar para determinar entornos particulares.

Tabla 3. Regiones de los modos de vibración amida I y amida III de los diferentes tipos de estructura secundaria de proteínas.

Estructura secundaria	Amida I (cm ⁻¹)	Amida III (cm ⁻¹)
Hélice α	1645 – 1660	1270 – 1300
Lámina β	1665 – 1680	1230 – 1240
Vueltas β	1662 – 1677	1255 – 1300
Desordenada	1660 – 1665	1240 – 1260

Un aspecto importante en espectroscopia Raman de proteínas es saber cómo su estructura modifica los modos de vibración. Como ya lo señalamos, las frecuencias de los modos amida I y amida III se

relacionan con la estructura secundaria de la proteína (Tabla 3).

Como ya fue mencionado anteriormente, algunos aminoácidos poseen señales intensas y características: *i*) dos cisteínas pueden formar un puente de sulfuro S-S (500 - 550 cm⁻¹) por oxidación del grupo sulfhídrico -S-H (2550-2600 cm⁻¹); *ii*) la tirosina tiene un espectro Raman complejo, no obstante, las bandas (doblete) a 830 cm⁻¹ y 850 cm⁻¹ son útiles para determinar el entorno local de este residuo; *iii*) la histidina se caracteriza por la vibración de su núcleo imidazol hacia 1490 cm⁻¹, pero sus bandas Raman no son sensibles a las modificaciones estructurales; *iv*) la fenilalanina posee varias bandas debido al núcleo aromático, tiene una banda muy intensa hacia 1005 cm⁻¹; *v*) el triptófano posee varias bandas, en particular el doblete a 1340 cm⁻¹ y 1360 cm⁻¹ es sensible al entorno, un cociente I_{1360}/I_{1340} superior a 1 indica un entorno hidrófobo (no polar).

3.2.3 Tejidos y células

En los últimos años, por su capacidad para aportar información detallada sobre la composición química, la dispersión Raman se ha orientado hacia el estudio de tejidos biológicos y células. Generalmente, este estudio se acompaña del uso de métodos estadísticos para la determinación de las diferencias espectrales.

En la Fig. 6 se presenta el espectro Raman de una célula HeLa (célula cancerosa de cultivo derivada de una muestra de cáncer cérvico-uterino) con las principales atribuciones de las bandas.

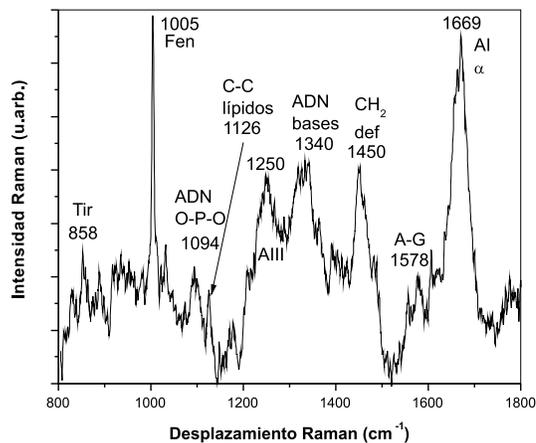


Figura 6. Espectro Raman de una célula HeLa.

En esta figura podemos observar bandas que corresponden a lípidos (C-C, CH₂, O-P-O) y a proteínas (Amida I, Amida III, Fen, Tir) pero también algunas bandas que provienen de las vibraciones del ADN en el núcleo de la célula.

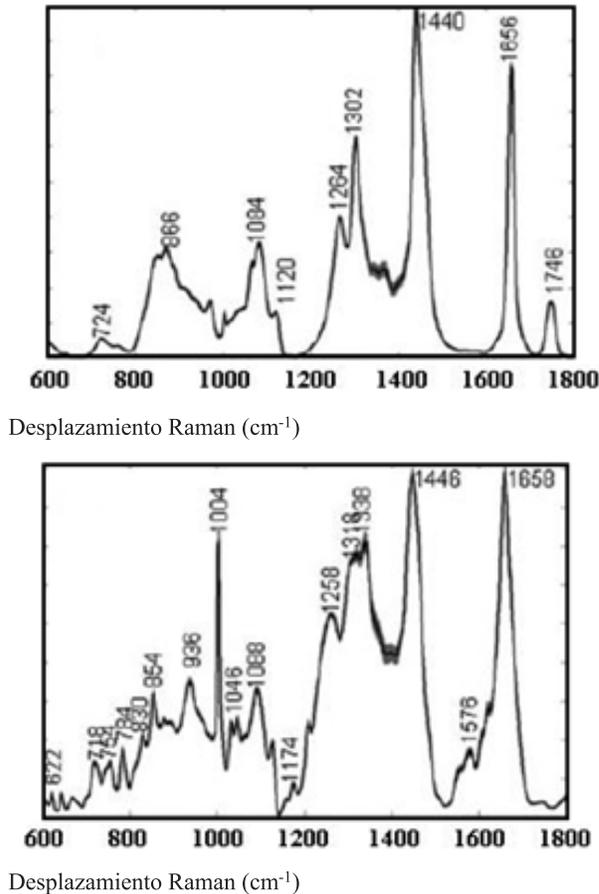
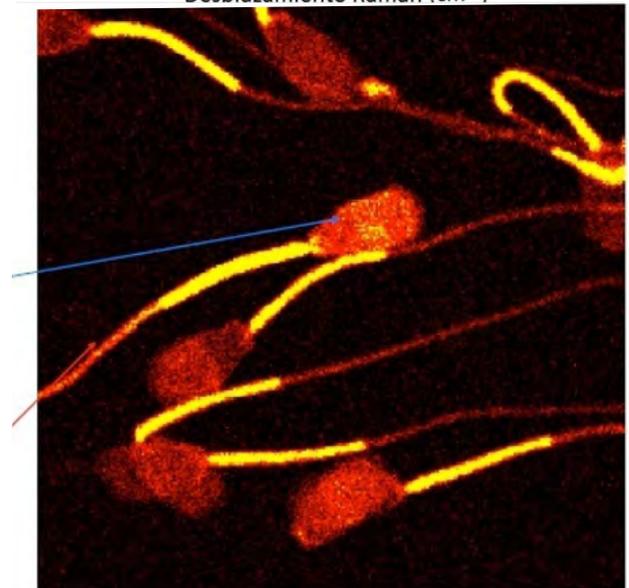
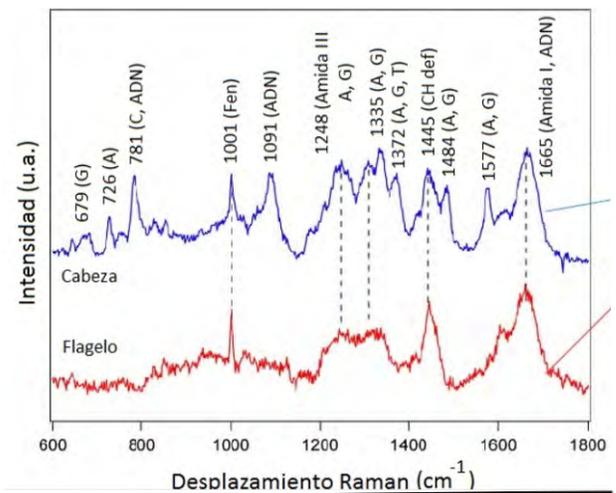


Figura 7. Espectro Raman promedio de un tejido mamario sano con nódulos linfáticos (arriba) y de un tumor (abajo). Adaptada de [19].

En un trabajo reciente [19], se utilizó la espectroscopia Raman para analizar muestras de tejido de glándula mamaria de ratones, correspondiente a tejido sano, con tumor maligno y con mastitis. El espectro Raman de glándulas mamarias normales con nódulos linfáticos es dominado por la contribución de los lípidos y algunas bandas a 762 cm⁻¹, 868 cm⁻¹ y 1004 cm⁻¹, que reflejan la composición proteica del tejido. El espectro Raman de los tumores mamarios es sensible al incremento en proteína y, por lo tanto, se refleja la disminución relativa de las bandas de lípidos. Se

observa una fuerte disminución en la intensidad de la banda a 1746 cm⁻¹, atribuida a la vibración de elongación de los C=O lipídicos, la banda a 1440 cm⁻¹ (δ_{CH}) disminuye y aparecen nuevas e intensas bandas de proteínas en 622, 642, 830, 854, 936, 1004, 1174, 1258, 1318, 1338, 1446 y 1576 cm⁻¹ (Fig. 7). Sobre este tema existe una bibliografía considerable; como ejemplo, pueden consultarse algunos de los trabajos desarrollados por diferentes grupos [20-30].

En la figura 8, se presenta el espectro Raman obtenido en la cabeza y en el flagelo de un espermatozoide bovino.



Espermatozoides bovinos

Figura 8. Espectro Raman de la cabeza y el flagelo de un espermatozoide bovino.

Comparando los dos espectros, se puede observar que el espectro de la cabeza es idéntico al del flagelo con la adición de las bandas correspondiendo al ADN del núcleo que se encuentra en la cabeza del espermatozoide.

4. CONCLUSIÓN

En los últimos años, la dispersión Raman está muy asociada a aplicaciones biológicas y médicas, entre otras. El aumento de la sensibilidad de los detectores ha sido un factor importante en este desarrollo por el ahorro en tiempo de acumulación de espectros. La dificultad mayor de estos estudios está en la complejidad de las moléculas o sistemas investigados que pueden necesitar métodos estadísticos de análisis de los espectros. El porvenir está en la utilización de la dispersión Raman como método diagnóstico.

Referencias

- [1] C.V. Raman, K.S. Krishnan, A new type of secondary radiation, *Nature* 121: 501-502 (1928).
- [2] P. Lasch y J. Kneipp, eds. *Biomedical vibrational spectroscopy*. Hoboken: John Wiley & sons (2008).
- [3] E. Overton. Beitrage zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. *Pflug. Arch. ges. Physiol.* 92, 115-280 (1902)
- [4] E. Overton. Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie II. Mittheilung. Ueber die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels *Pflug. Arch. ges. Physiol.* 92, 346-386 (1902)
- [5] E. Görter and F. Grendel. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41, 439-443 (1925)
- [6] J.F. Danielli, H. Davson. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Comp. Phys.* 5, 495-508 (1935)
- [7] S.J. Singer, G.L. Nicolson. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720-731 (1972)
- [8] D.C. Harris, M.D. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy: An introduction to vibrational and electronic spectroscopy*, New York, EUA: Dover Publications, (1989)
- [9] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, New York, EUA: Wiley-Interscience Publication (1997)
- [10] A. Anderson (Ed.), *The Raman Effect*, Marcel Dekker Inc., New York (1971)
- [11] G. Socrates. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. New York: John Wiley & Sons (2004)
- [12] T.P. Lin and J.L. Koenig. A method for the complete vibrational analysis of the isolated polyethylene chain. *J. Mol. Spectrosc.* 9, 228-243 (1962)
- [13] R.G. Snyder. A revised assignment of the B_{2g} methylene wagging fundamental of the planar polyethylene chain. *J. Mol. Spectrosc.* 23, 224-228 (1967)
- [14] M. Tasumi and S. Krimm. Crystal vibrations of polyethylene. *J. Chem. Phys.* 46, 755-766 (1967)
- [15] M. Tasumi, S. Krimm. Vibrational analysis of chain folding in polyethylene crystals. *J. Polymer Sci. Part A-2: Polymer Phys.* 6, 995-1010 (1968)
- [16] M. Picquart. Interaction of antibiotics Lasalocid and Monensin with model membranes evidenced by Raman spectroscopy and FT-IR. *Rev. Mex. Fis.* 46, 166-173 (2000)
- [17] J. Bandekar, S. Krimm. Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins: Characteristic amides bands of beta-turns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 774-777 (1979)
- [18] S. Krimm, J. Bandekar. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38, 181-364 (1986)
- [19] R.E. Kast, G.K. Serhatkulu, A. Cao, A.K. Pandya, H. Dai, J.S. Thakur, V.M. Naik, R. Naik, M.D. Klein, G.W. Auner, R. Rabah. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic

- changes in a mouse model. *Biopolymers*. 89, 235-241 (2007)
- [20] L.P. Choo-Smith, H.G. Edwards, H.P. Endtz, J.M. Kros, F. Heule, H. Barr, J.S. Jr. Robinson, H.A. Bruining, G.J. Puppels. Medical applications of Raman spectroscopy: from proof of principle to clinical implementation. *Biopolymers*. 67, 1-9 (2002)
- [21] J.R. Baena, B. Lendl, Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 534-539 (2004)
- [22] A.P. Esposito, C.E. Talley, T. Huser, C.W. Hollars, C.M. Schaldach, S.M. Lane, Analysis of single bacterial spores by micro-Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 57, 868-871 (2003)
- [23] N.S. Eikje, K. Aizawa, Y. Ozaki, Vibrational spectroscopy for molecular characterisation and diagnosis of benign, premalignant and malignant skin tumours. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 191-225 (2005)
- [24] A.S. Haka, K.E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R.R. Dasari, M.S. Feld, Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102, 12371-12376 (2005)
- [25] J.R. Mourant, K.W. Short, S. Carpenter, N. Kunapareddy, L. Coburn, T.M. Powers, J.P. Freyer, Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* 10, 031106 (2005)
- [26] R. Malini, K. Venkatakrishna, J. Kurien, M.P. K. L. Rao, V.B. Kartha, C.M. Krishna, Discrimination of normal, inflammatory, premalignant, and malignant oral tissue: A Raman spectroscopy study. *Biopolymers*. 81, 179-193 (2005)
- [27] M.S. Ibelings, K. Maquelin, H.P. Endtz, H.A. Bruining, G.J. Puppels. Rapid identification of *Candida* spp. in peritonitis patients by Raman spectroscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 353-358 (2005)
- [28] C. Mello, D. Ribeiro, F. Novaes, R.J. Poppi. Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 701-706 (2005)
- [29] C. Medina-Gutiérrez, J. Luis Quintanar, C. Frausto-Reyes and R. Sato-Berrú. The application of NIR Raman spectroscopy in the assessment of serum thyroid-stimulating hormone in rats. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 61, 87-91 (2005)
- [30] P.R.T. Jess, D.D.W. Smith, M. Mazilu, K. Dholokia, A.C. Riches y C.S. Herrington. Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *Int. J. Cancer* 121, 2723-2728 (2007)