

Recibido: 16 de enero de 2024
Aceptado: 19 de junio de 2024
Publicado: 9 de agosto de 2024

Cómo citar:

Bruzual-Roa, R., Castro-Ramos, J., Narea-Jiménez, F. & Chavarría-Lizárraga, H. N. "Caracterización del biomarcador cortisol con espectroscopía Raman". *Artificial Intelligence on Electronics and Photonics* 1(1) pp. 1-16. (2024).

CARACTERIZACIÓN DEL BIOMARCADOR CORTISOL CON ESPECTROSCOPIA RAMAN

Characterization of the cortisol biomarker with Raman spectroscopy

R. Bruzual-Roa¹, J. Castro-Ramos¹, F. Narea-Jiménez², H.N. Chavarría-Lizárraga¹

¹ Instituto Nacional de Astrofísica Óptica y Electrónica, Puebla, C.P. 72840, Tonantzintla, Puebla, México.

² Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio, C.P. 74949, Acatlán de Osorio, Puebla, México.

* Autor de correspondencia: maria.bruzual@inaoe.mx

PALABRAS CLAVE:

Espectroscopía Raman; Cortisol; Análisis de Componentes Principales (ACP).

KEYWORDS:

Raman Spectroscopy; Cortisol; Principal Component Analysis (PCA).

Resumen

En esta investigación se caracterizó el biomarcador cortisol utilizando espectroscopía Raman normal en concentraciones de 100%, 50%, 10%, 5% y 1%. Las disoluciones de cortisol fueron realizadas en alcohol etílico (etanol). Los espectros Raman normales fueron obtenidos variando el tiempo de integración, fotoblanqueo, un preprocesamiento de la señal mediante un suavizado con el filtro de Whitaker-Henderson y la extracción de fluorescencia. Las herramientas computacionales para hacer el análisis espectral consistieron en la recuperación del espectro Raman del cortisol en presencia del alcohol etanol mediante el uso de la deconvolución espectral y con la técnica de *machine learning* no supervisado de Análisis de Componentes Principales (ACP) se identificaron patrones y se agruparon los espectros de las diferentes concentraciones en términos de sus características (intensidad, forma espectral y bandas Raman). Como principales resultados se recuperaron los espectros del cortisol con coeficientes de correlación superiores a 95% para las concentraciones de 100%, 50%, 10%, 5%; mediante ACP se agruparon y diferenciaron cada concentración de los espectros del cortisol sin traslaparse en los rangos espectrales de 200 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , así como en la región de 1550 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} .

Abstract

In this research, the biomarker cortisol was characterized using normal Raman spectroscopy at concentrations of 100%, 50%, 10%, 5%, and 1%. Cortisol solutions were prepared in ethyl alcohol (ethanol). Normal Raman spectra were obtained by varying integration time, photobleaching, signal preprocessing with Whitaker-Henderson smoothing, and fluorescence extraction. Computational tools for spectral analysis included the recovery of the Raman spectrum of cortisol in the presence of ethanol using spectral deconvolution. Additionally, unsupervised machine learning techniques, specifically Principal Component Analysis (PCA), were employed to identify patterns and group spectra of different concentrations based on their characteristics (intensity, spectral shape, and Raman bands). Key results showed the recovery of cortisol spectra with correlation coefficients above 95% for concentrations of 100%, 50%, 10%, and 5%. PCA effectively grouped and differentiated each concentration of cortisol spectra without overlap in the spectral ranges of 200 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} , as well as in the region of 1550 cm^{-1} to 1650 cm^{-1} .

1. Introducción

La espectroscopía Raman es una técnica óptica basada en el efecto Raman [1], un fenómeno de esparcimiento inelástico generado al interactuar la radiación electromagnética con la materia. El efecto Raman ocurre cuando los fotones de una fuente de luz monocromática inciden sobre una muestra y una vez absorbidos cambian su frecuencia al ser reemitidos [2,3]. Entre sus múltiples áreas de aplicación se encuentran la química, la biología, la arqueología y la medicina [4,5], resultando una importante herramienta científica debido a que proporciona resultados sobre la composición molecular y estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos, permitiendo así identificar características químicas y físicas para su cuantificación [3]. Dos de las características importantes que hacen práctica a la espectroscopía Raman es la parte no invasiva y no destructiva de la muestra en estudio, ya sea *in vitro* o *in vivo*, aparte de que es prescindible prepararla antes de medirla [6].

El cortisol, también llamado hidrocortisona, es un biomarcador asociado a diversas enfermedades psicosomáticas, causadas por fuertes procesos emocionales como la depresión, la ansiedad o el estrés [7,8], con el tiempo se transforman en una depresión del sistema inmunológico y, por tanto, el ser humano se hace más vulnerable ante agentes externos [9]. El cortisol es una hormona esteroidea producida por las glándulas suprarrenales en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal y su liberación, siendo pulsátil, regulada por la genética y por factores ambientales [10,11], influye en el ciclo de sueño vigilia y resulta en la percepción del propio estrés [12]. En condiciones fisiológicas estables se ha observado que el cortisol salival está en equilibrio con el cortisol libre plasmático y es independiente del flujo salival, por lo que puede utilizarse para la detección y el seguimiento de ciertas patologías [13].

El uso de herramientas de *machine learning* para análisis de señales [14] como el análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*, PCA) [15], es una herramienta computacional implementada en muchas aplicaciones con el propósito de identificar patrones en un conjunto de señales por su intensidad, frecuencia o morfología [16]. El PCA, aplicado a espectroscopía Raman, es ampliamente usado para identificar y agrupar compuestos químicos en espectros Raman, así como en la agrupación de espectros Raman de concentraciones de alguna disolución [17,18]. Entre sus muchas aplicaciones del PCA con espectroscopía Raman se pueden destacar la implementación en medicina para diagnóstico de enfermedades [19,20,21], en geología para distinguir minerales materiales sólidos [22] y en bioquímica en análisis toxicológicos [23].

En 2017, K. Gracie, S. Pang *et al.* [24], identificaron en el suero la presencia del biomarcador cortisol con espectroscopía Raman, esta investigación se considera de gran relevancia, encontrar bandas Raman del cortisol en este medio biológico abrió un campo de estudio para seguir investigado sobre su identificación en otros medios.

En 2020, T. J. Moore *et al.* [25], detectaron mediante Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada (SERS, por sus siglas en inglés) el cortisol en concentraciones fisiológicas, cabe mencionar que en su investigación muestran la caracterización del espectro Raman del cortisol con sus respectivas bandas Raman, así como la medición en diferentes concentraciones molares, demostrando que es posible medir cortisol e identificarlo con éxito en bajas concentraciones.

En 2023, J. Depciuch *et al.* [26], investigaron sobre los niveles de estrés en atletas empleando los métodos de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y espectroscopía Raman, con esto una vez habiendo investigaciones sobre la caracterización espectral del cortisol y la detección en diferentes concentraciones, presentan una aplicación para medir el estrés en humanos con la presencia del cortisol en sangre.

Dada la importancia de encontrar la presencia del cortisol en fluidos biológicos en pequeñas concentraciones, en este artículo se analiza la obtención de espectros Raman normales variando tiempo de integración, fotoblanqueo en cortisol a diferentes concentraciones en etanol, con el propósito de demostrar que con la técnica de espectroscopía Raman y el análisis de componentes principales, es posible agrupar cada conjunto de datos sin la existencia de espectros traslapados de cada una de las diferentes concentraciones de cortisol. La primera parte consistirá en describir el arreglo experimental que se usó, así como de los materiales empleados para el experimento. Posteriormente, se especificarán las herramientas de preprocesamiento y el análisis de la señal que se aplicó a los espectros Raman. Finalmente, se presentarán las discusiones y conclusiones de esta investigación.

2. Metodología

2.1. Arreglo experimental

El arreglo experimental (Figura 1) para la medición del biomarcador cortisol (Hydrocortisone H0888-5G, Sigma Aldrich) consta de un espectrómetro Raman QE65000 de Ocean Optics®, una punta de prueba *Raman insertion probe* – *Raman probe* (RIP-RPB), una fibra especializada para espectroscopía Raman, esta consta de dos fibras ópticas, una para emitir la fuente de luz láser de longitud de onda de 785 nm y otra para coleccionar la luz esparcida por el efecto Raman, y por último una computadora con el *software* SpectraSuite® para obtener los espectros Raman. La fibra Raman se colocó a una distancia de 7 mm de la muestra, se reguló la fuente laser a una potencia de 480 mW y el tiempo de exposición fue de 1 min por cada espectro con 5 exploraciones promedio. Se realizaron 10 mediciones de espectros Raman del cortisol tanto al 100% como para disoluciones de cortisol en etanol en concentraciones de 50%, 10%, 5% y 1%.

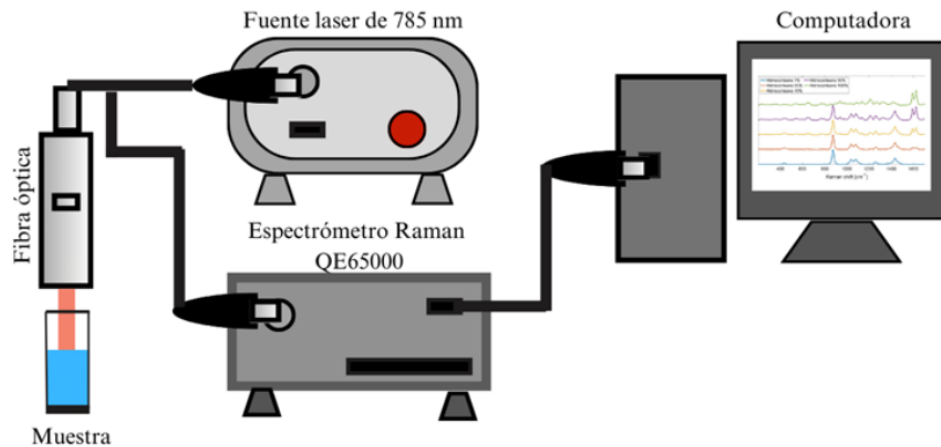


Figura 1.

Diagrama del arreglo experimental.

2.2. Procesamiento de los espectros Raman

Con la obtención de los espectros Raman del cortisol, aplicamos el filtro Whittaker-Henderson [27] a los datos espectrales. Este filtro se emplea principalmente para reducir y/o eliminar ruidos en la señal Raman [28], como el provocado por naturaleza ambiental, electrónica o por la muestra [29], logrando así suavizar la señal como parte del procesamiento. Las ventajas asociadas con el uso de este filtro incluyen su flexibilidad en la implementación y la eficacia de los resultados obtenidos. Además del suavizado de la señal, se abordó la eliminación de la fluorescencia mediante el método *A small-window moving average-based fully automated baseline estimation* [30].

2.3. Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una de las técnicas de aprendizaje no supervisado propuesto por Karl Pearson [31] en 1901. Este método multivariable consiste en reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos que consta de un gran número de variables interrelacionadas, manteniendo al mismo tiempo la mayor cantidad posible de la varianza presente en el conjunto de datos [32,33].

En la [Figura 2](#) se muestra un diagrama de cómo se transfiere de un conjunto de datos a una gráfica representativa, con los dos primeros Componentes

Principales (CP). Matemáticamente se puede definir el CP como una transformación lineal que convierte los datos a un nuevo sistema de coordenadas [34], cada nueva coordenada o CP es una combinación lineal de las variables originales que explican al máximo la varianza de todas las variables [32]. El proceso para calcular un CP es el siguiente [34]:

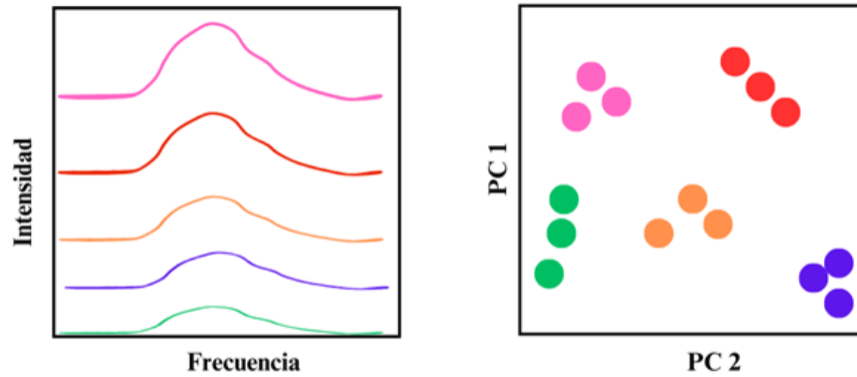


Figura 2.

Diagrama de ACP de dos dimensiones o dos PC (derecha) de un conjunto de datos espectrales (izquierda).

- (1) Calcular la matriz de covarianza o correlación (multivariada) a partir de los datos de muestra,
- (2) Calcular valores y vectores propios de la matriz de covarianza o correlación, y
- (3) Generar las CP; cada CP es una combinación lineal de variables originales X_i ponderadas óptimamente, como se muestra en la [ecuación 1](#):

$$P_i = b_{i1} X_1 + b_{i2} X_2 + \dots + b_{ik} X_k \quad (1)$$

donde P_i es la i ésima PC, b_{ik} es el peso (algunos lo llaman coeficiente de regresión) de la variable, X_k .

2.4. Deconvolución de espectros Raman

La *deconvolución* es el método que implica el proceso de descomposición de los picos que se superponen entre sí [35]. El número de bandas Raman observados experimentalmente son significativamente menores, ya que una gran

cantidad de modos de vibración no pueden ser separados dentro de la resolución del espectrómetro Raman [36]. Los diversos modos intensos débiles generalmente se superponen con los modos prominentes vecinos y causan ensanchamiento [3,6].

En la práctica cuando se miden en espectroscopía Raman dos o más sustancias interactuando en un medio homogéneo o inhomogéneo, es común analizar el espectro Raman obtenido de las mediciones promedio o de la superposición de espectros que varían en intensidad, modificando ciertas regiones espectrales morfológicamente respecto a los espectros individuales de las sustancias puras.

La forma en que se aplica la deconvolución espectral resulta en tener una librería de espectros de sustancias puras o de bandas Raman y al momento compararlo con un espectro Raman de múltiples sustancias, se aplica el método y se extrae la señal deseada seleccionada de la librería. A. Porporati *et al.* [37], A. L. Wilson *et al.* [38] y K. Chen *et al.* [39] son algunos autores que utilizaron este método para sus trabajos de investigación.

El método de deconvolución usado en esta investigación fue *Simultaneous Overconstrained Library-based Decomposition* (SOLD), reportado por el autor J. R. Maher *et al.* [40], el programa fue desarrollado en Matlab® [44] y cuenta con una función llamada “SOLD”. Un ejemplo del uso y efectividad de este método fue aplicado en el trabajo de K. Chen *et al.* [41].

2.5. Coeficiente de correlación de Pearson

El coeficiente de correlación de Pearson es una medida de la asociación lineal de dos variables. El análisis de correlación suele comenzar con una representación gráfica de la relación de pares de datos mediante un diagrama de dispersión. Los valores del coeficiente de correlación varían en ± 1 . Una correlación igual a 0 significa ausencia de relación [42,43]. La función para calcular el coeficiente de correlación fue “corrcoef” [45] de la paquetería de Matlab®.

3. Resultados y discusiones

3.1. Espectro Raman del Cortisol

Con la obtención del espectro Raman del cortisol en su estado puro mediante el espectrómetro Raman, los resultados revelaron un conjunto de bandas características que han sido corroboradas con la información previamente documentada en la literatura científica [25]. La Figura 3 presenta de manera gráfica el espectro Raman del cortisol, destacando las mencionadas bandas del cortisol. Para la identificación de las bandas características, se estableció un criterio consistente, considerando un rango de $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$ para cada pico

Raman, debido los desplazamientos provocados por la pureza de la sustancia, resolución del espectrómetro y otros factores externos ambientales [36]. Este enfoque proporciona una base robusta para la identificación de características vibracionales específicas asociadas con el cortisol.

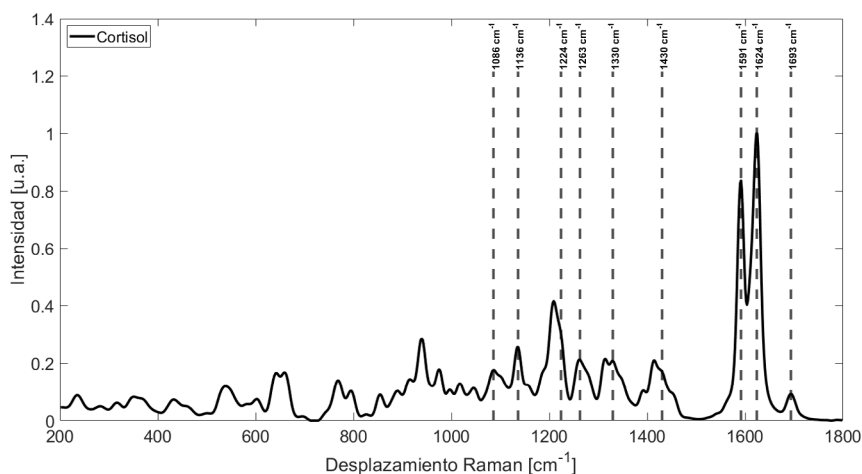


Figura 3.

Espectro Raman del cortisol al 100% con sus bandas características indicadas por las líneas punteadas verticales.

La [Tabla 1](#) complementa la [Figura 3](#), detallando las bandas características identificadas en el espectro Raman junto con sus correspondientes enlaces moleculares. Es fundamental resaltar la concordancia entre las observaciones experimentales y los datos conocidos en la literatura, fortaleciendo así la validez de los resultados obtenidos.

Tabla 1. Bandas Características del Cortisol, con sus respectivos enlaces moleculares.

Banda Raman Experimental (cm ⁻¹)	Referencia en la literatura (cm ⁻¹) [25]	Enlace molecular
1086	1073	Modo de respiración en anillo asimétrico del anillo C del cortisol.
1136	1146	CH ₂ twist + CH bend + OH bend
1224	1224	Estiramiento asimétrico C-C-C

Tabla 1. Continuación.

Banda Raman Experimental (cm ⁻¹)	Referencia en la literatura (cm ⁻¹) [25]	Enlace molecular
1263	1269	CH curva + CH ₂ curva+OH curva
1330	1330	Estiramiento simétrico C-C-C en el anillo A
1430	1435	CH ₂ tijera en los anillos A y B
1591	1609	Estiramiento C=C
1624	1641	C=O en el anillo A de la molécula de cortisol
1693	1704	Estiramiento C=O

3.2. Disoluciones

Después de completar la caracterización del cortisol en su estado puro, se llevó a cabo la preparación de disoluciones en etanol. Los porcentajes de cortisol (masa) y alcohol (volumen) para las diferentes concentraciones se pueden ver en la [Tabla 2](#). La [Figura 4](#) presenta de manera gráfica los espectros Raman correspondientes a cada una de estas concentraciones, con un énfasis particular en la zona de los 1550 cm⁻¹ a 1650 cm⁻¹, ya que estas bandas Raman son las más intensas del espectro de cortisol puro.

Tabla 2. Concentraciones de cortisol en su relación masa/volumen.

Porcentaje	Masa (g)	Volumen (ml)
50%	0.01	0.02
10%	0.01	0.1
05%	0.01	0.2
01%	0.01	1

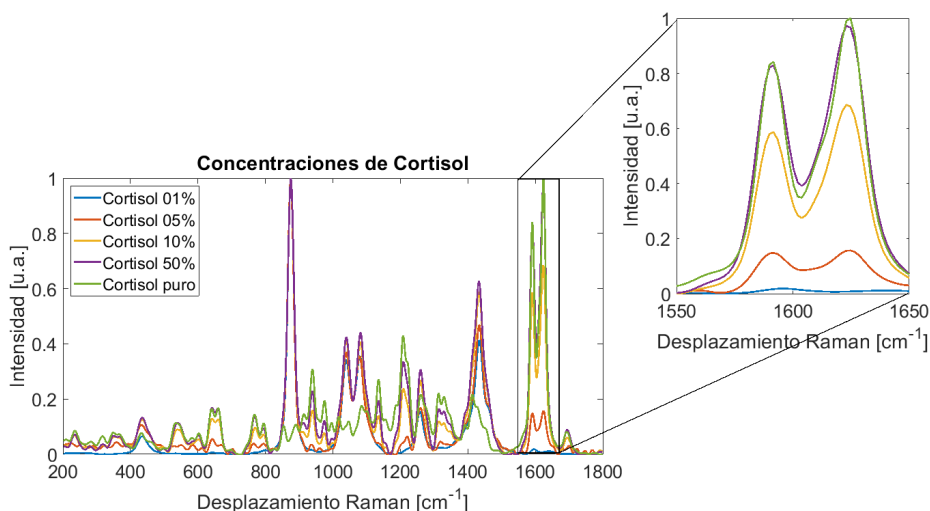


Figura 4.

Espectros Raman de las diferentes concentraciones de cortisol en etanol. Todos los espectros fueron normalizados respecto a su banda Raman de mayor intensidad.

La elección de resaltar la región de 1550 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} se debe a su importancia en la identificación de cambios en las propiedades vibracionales de las moléculas de cortisol en respuesta a variaciones en la concentración y entorno del solvente. Este enfoque facilita la observación y análisis de posibles desplazamientos o modificaciones en las bandas características, lo que puede proporcionar valiosa información sobre las interacciones moleculares y la estructura del cortisol en solución.

3.3. Deconvolución espectral

En la [Figura 5](#) se muestran los espectros puros de etanol, cortisol y el de concentración de cortisol al 50% en Etanol. Es importante resaltar que el residuo es resultado de aplicar el algoritmo de deconvolución SOLD. El espectro deconvolucionado del cortisol al 50% correlacionado con el espectro de cortisol puro se obtuvo un coeficiente de correlación de 98.2%. Se aplicó el mismo algoritmo a las concentraciones de 10% y 5% con resultados en el coeficiente de correlación de 97.6% y 97.1% respectivamente.

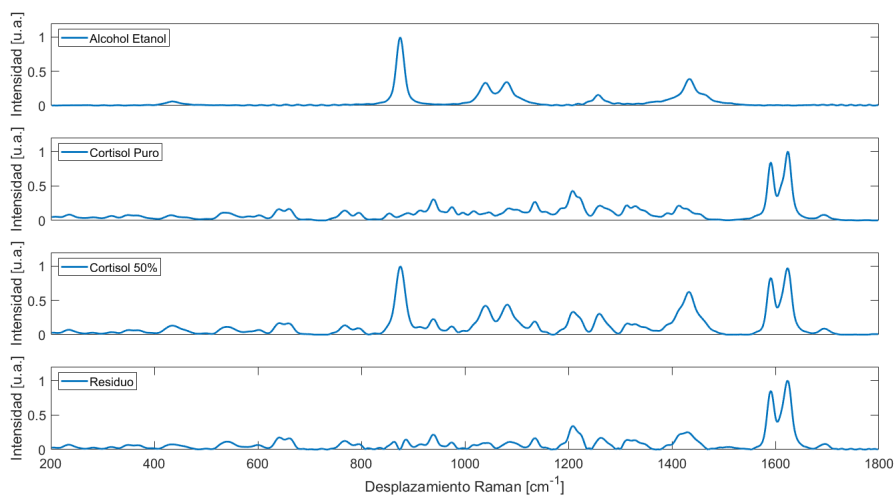


Figura 5.

Espectros Raman del alcohol Etanol puro, Cortisol puro y cortisol al 50% y el residuo después de aplicar la deconvolución.

Para el caso del 1% el valor del coeficiente de correlación fue muy bajo, dando como resultado un valor de 40%, esto tiene una explicación respecto a la intensidad de los espectros de alcohol y cortisol, el cortisol al estar al 1%, disminuye su espectro en intensidad significativamente en comparación a la del alcohol, por lo que resulta difícil distinguir las regiones del espectro del cortisol en el alcohol al solaparse. Solo la región de 1550 cm⁻¹ a 1650 cm⁻¹ es distinguible en todos los casos.

3.4. Análisis de componentes principales (PCA)

Al aplicar la metodología descrita en la sección 2.3 al conjunto de espectro Raman de las concentraciones de cortisol diluidas en etanol (100%, 50%, 10%, 5% y 1%) en la región espectral de 200 cm⁻¹ a 1800 cm⁻¹, se obtienen los resultados mostrados en la [Figura 6](#). Donde se observa que al aplicar las PCA se logra realizar una reducción de la dimensionalidad de las variables Raman observadas a tres componentes principales CP1(77.10%), CP2(22.43%) y CP3(0.36%), esto debido a que la proporción de variancia acumulada (99.89%) ya no presenta un incremento sustancial al considerar más de tres CP. Cabe destacar que la primera CP representa la morfología espectral de las principales bandas presentes en la señal Raman medida, en este sentido con las tres CP empleadas en este trabajo se puede reconstruir todo el espectro Raman con un factor

residual de ajuste promedio de 10^{-9} unidades arbitrarias de intensidad y un error cuadrático medio (RMSE, por sus siglas en inglés) de $6.16 \cdot 10^{-10}$, lo cual indica un buen ajuste y por tanto una correcta interpretación de cada CP.

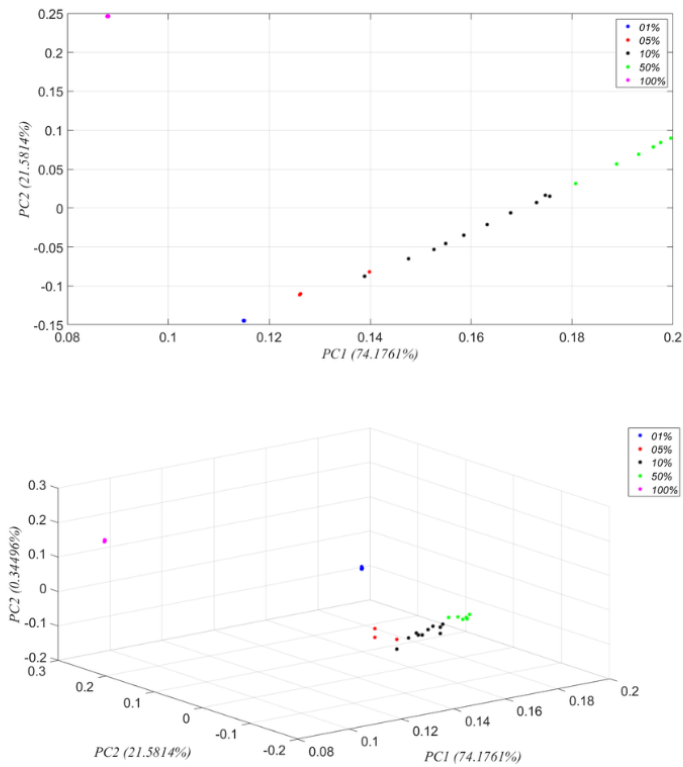


Figura 6.

Aplicación de ACP a los espectros de las diferentes concentraciones de cortisol de la región espectral de 200 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} , siendo la gráfica de las primeras 2 CP (arriba) y las 3 primeras CP (abajo).

Asimismo, en la [Figura 6a](#) con 2 CP podemos observar la separación del conjunto de datos, sin embargo, un solo punto de color rojo correspondiente al 5% de concentración está muy cercano a los puntos de color negro que representan la concentración al 10%. Ahora bien, cuando se grafican las 3 CP ([Figura 6b](#)), ya todos los conjuntos de datos se encuentran separados en un espacio de tres dimensiones.

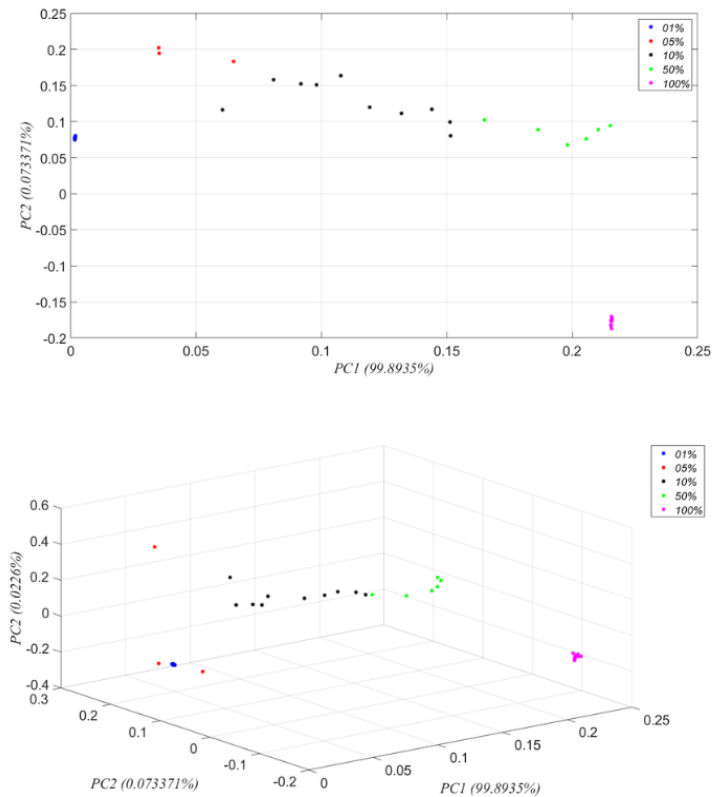


Figura 7.

Aplicación de ACP a los espectros de las diferentes concentraciones de cortisol de la región espectral de 1550 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} , siendo la gráfica de las primeras 2 CP (arriba) y las 3 primeras CP (abajo).

En la búsqueda de emplear la menor cantidad de variables para lograr identificar las concentraciones de cortisol con espectroscopia Raman, se realizó un ACP solamente a la región espectral del cortisol diluido en etanol (1550 cm^{-1} a 1650 cm^{-1}), donde la mayor proporción de variancia acumulada se da en la primera CP. Se puede observar en la [Figura 7](#) que a diferencia de la [Figura 6](#) el conjunto de datos presenta una mejor separación tanto en el plano como en el espacio 2 y 3 CP respectivamente. Esto es debido a que la región de 1550 cm^{-1} a 1650 cm^{-1} se tienen bandas Raman exclusivamente de cortisol donde no afecta el espectro Raman del alcohol, y se evidencia la separación de las intensidades de los picos de cortisol entre concentraciones ([Figura 4](#)).

4. Conclusiones

Este estudio subraya la importancia de la espectroscopia Raman como una herramienta poderosa para caracterizar molecularmente sustancias como el cortisol. La validación de los resultados a través de la comparación con la literatura y la implementación de criterios específicos para la identificación de bandas características, fortalecen la confiabilidad de los hallazgos. La consistencia en la repetibilidad de las mediciones respalda la robustez de la metodología utilizada.

Se identificaron los enlaces moleculares correspondientes a cada banda Raman, computacionalmente se obtuvo la recuperación del espectro del cortisol en presencia del alcohol etílico (Etanol) en diferentes concentraciones y mediante ACP se logró agrupar y diferenciar cada concentración sin traslaparse en dos diferentes regiones espectrales, permitiendo así de manera eficiente para un trabajo futuro cuantificar este biomarcador.

5. Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHACYT), al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE), al Grupo de Instrumentación en Óptica Biomédica (GIOB) y al Instituto Tecnológico Superior de Acatlán de Osorio (ITSAO).

Referencias

- 1 C. V. Raman and K. S. Krishnan, "A New Type of Secondary Radiation," *Nature* **121**(3048), Art. no. 3048, (1928). doi: [10.1038/121501c0](https://doi.org/10.1038/121501c0).
- 2 C. V. Raman and G. T. Walker, "On the molecular scattering of light in water and the colour of the sea," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **101**(708), pp. 64–80, (1997). doi: [10.1098/rspa.1922.0025](https://doi.org/10.1098/rspa.1922.0025).
- 3 "Introduction, Basic Theory and Principles," in *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Ltd. (2004), pp. 1–21. doi: [10.1002/0470011831.ch1](https://doi.org/10.1002/0470011831.ch1).
- 4 P. Rostron and D. Gerber, "Raman Spectroscopy, a review", *International Journal of Engineering and Technical Research* **6**, pp. 50–64, (2016).
- 5 R. S. Das and Y. K. Agrawal, "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications," *Vibrational Spectroscopy* **57**(2), pp. 163–176, (2011). doi: [10.1016/j.vibspec.2011.08.003](https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003).
- 6 "The Raman Experiment - Raman Instrumentation, Sample Presentation, Data Handling and Practical Aspects of Interpretation", in *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Ltd. (2004), pp. 23–70. doi: [10.1002/0470011831.ch2](https://doi.org/10.1002/0470011831.ch2).

- 7 D. Y. Lee, E. Kim, and M. H. Choi, "Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress", *BMB Rep* (4), pp. 209–216, (2015), doi: [10.5483/BMBRep.2015.48.4.275](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.275).
- 8 N. Musiało, I. Hołyńska-Iwan, and D. Olszewska-Słonina, "Cortisol – inspection in the physiology and stress", *Diagn Lab* **54**(1), pp. 29–36, (2018), doi: [10.5604/01.3001.0013.7553](https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.7553).
- 9 C. Navas and D. Zapata, "Aspectos inmunológicos en la depresión", *Revista Venezolana de Oncología* **21**(4), pp. 244–252, (2009).
- 10 S. Ramamoorthy and J. A. Cidlowski, "Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease", *Rheum Dis Clin North Am* **42**(1), pp. 15–31, (2016). doi: [10.1016/j.rdc.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.rdc.2015.08.002).
- 11 R. H. Oakley and J. A. Cidlowski, "The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease", *J Allergy Clin Immunol* **132**(5), pp. 1033–1044, (2013). doi: [10.1016/j.jaci.2013.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007).
- 12 C. Hirotsu, S. Tufik, and M. L. Andersen, "Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions", *Sleep Sci* **8**(3), pp. 143–152, (2015). doi: [10.1016/j.slsci.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.slsci.2015.09.002).
- 13 D. H. Hellhammer, S. Wüst, and B. M. Kudielka, "Salivary cortisol as a biomarker in stress research", *Psychoneuroendocrinology* **34**(2), pp. 163–171, (2009). doi: [10.1016/j.psychneuen.2008.10.026](https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2008.10.026).
- 14 S. Sehgal, H. Singh, M. Agarwal, V. Bhasker, and Shantanu, "Data analysis using principal component analysis", in 2014 International Conference on Medical Imaging, m-Health and Emerging Communication Systems (MedCom), (2014), pp. 45–48. doi: [10.1109/MedCom.2014.7005973](https://doi.org/10.1109/MedCom.2014.7005973).
- 15 Principal Component Analysis, in Springer Series in Statistics. New York: Springer-Verlag, 2002. doi: [10.1007/b98835](https://doi.org/10.1007/b98835).
- 16 S. Karamizadeh, S. M. Abdullah, A. A. Manaf, M. Zamani, and A. Hooman, "An Overview of Principal Component Analysis", *JSIP* **04**(03), pp. 173–175, (2013). doi: [10.4236/jsip.2013.43B031](https://doi.org/10.4236/jsip.2013.43B031).
- 17 J. F. Villa-Manríquez, R. Y. Sato-Berrú, J. Castro-Ramos, and J. L. Flores-Guerrero, "Classification of trimethylamine-N-oxide, a cardiometabolic disease biomarker, by Raman spectroscopy and support vector machines", *J. Phys. D: Appl. Phys.* **55**(36), p. 365401, (2022). doi: [10.1088/1361-6463/ac79dc](https://doi.org/10.1088/1361-6463/ac79dc).
- 18 S. Guo, P. Rösch, J. Popp, and T. Bocklitz, "Modified PCA and PLS: Towards a better classification in Raman spectroscopy-based biological applications", *Journal of Chemometrics* **34**(4), p. e3202, 2020. doi: [10.1002/cem.3202](https://doi.org/10.1002/cem.3202).
- 19 A. Ditta et al., "Principal components analysis of Raman spectral data for screening of Hepatitis C infection", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **221**, p. 117173, (2019). doi: [10.1016/j.saa.2019.117173](https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117173).
- 20 S. Khan et al., "Raman Spectroscopy Combined with Principal Component Analysis for Screening Nasopharyngeal Cancer in Human Blood Sera", *Appl Spectrosc* **71**(11), pp. 2497–2503, (2017). doi: [10.1177/0003702817723928](https://doi.org/10.1177/0003702817723928).
- 21 A. S. Melitto, V. E. A. Arias, J. Y. Shida, L. H. Gebrim, and L. Silveira, "Diagnosing molecular subtypes of breast cancer by means of Raman spectroscopy", *Lasers Surg Med* **54**(8), pp. 1143–1156, (2022). doi: [10.1002/lsm.23580](https://doi.org/10.1002/lsm.23580).
- 22 X. Yao, H. Hou, H. Liang, K. Chen, and X. Chen, "Raman Spectroscopy Study of Phosphorites Combined with PCA-HCA and OPLS-DA Models", *Minerals* **9**(10), Art. no. 10, (2019). doi: [10.3390/min9100578](https://doi.org/10.3390/min9100578).
- 23 Y. Luo, X. Zhang, Z. Zhang, R. Naidu, and C. Fang, "Dual-Principal Component Analysis of the Raman Spectrum Matrix to Automatically Identify and Visualize Microplastics and Nanoplastics", *Anal. Chem.* **94**(7), pp. 3150–3157, (2022). doi: [10.1021/acs.analchem.1c04498](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04498).
- 24 K. Gracie, S. Pang, G. M. Jones, K. Faulds, J. Braybrook, and D. Graham, "Detection of cortisol in serum using quantitative resonance Raman spectroscopy", *Anal. Methods* **9**(10), pp. 1589–1594, Mar. (2017). doi: [10.1039/C6AY03296F](https://doi.org/10.1039/C6AY03296F).
- 25 T. J. Moore and B. Sharma, "Direct Surface Enhanced Raman Spectroscopic Detection of Cortisol at Physiological Concentrations", *Anal. Chem.* **92**(2), pp. 2052–2057, (2020). doi: [10.1021/acs.analchem.9b04532](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04532).

- 26 J. Depciuch, W. Czarny, A. Płonka, R. Podgórski, W. Bajorek, B. Dziadek, M. Kula-Maximenko, mą Sznajder, W. Paja, Y. Shpotyuk, J. Cebulski, and P. Król, "Investigation of novel methods for stress level measurements in athletes employing FTIR and Raman spectroscopy techniques", *Measurement* **220**, p. 113316, (2023). doi: [10.1016/j.measurement.2023.113316](https://doi.org/10.1016/j.measurement.2023.113316).
- 27 P. H. C. Eilers, "A Perfect Smoother," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 14, pp. 3631–3636, Jul. 2003, doi: [10.1021/ac034173t](https://doi.org/10.1021/ac034173t).
- 28 M. J. Pelletier, "Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry", *Appl Spectrosc* **57**(1), pp. 20A-42A, (2003). doi: [10.1366/000370203321165133](https://doi.org/10.1366/000370203321165133).
- 29 J. Smulko, M. S. Wróbel, and I. Barman, "Noise in biological Raman spectroscopy", in 2015 International Conference on Noise and Fluctuations (ICNF), (2015), pp. 1–6. doi: [10.1109/ICNF.2015.7288562](https://doi.org/10.1109/ICNF.2015.7288562).
- 30 H. G. Schulze, R. B. Foist, K. Okuda, A. Ivanov, and R. F. B. Turner, "A small-window moving average-based fully automated baseline estimation method for Raman spectra", *Appl Spectrosc* **66**(7), pp. 757–764, (2012). doi: [10.1366/11-06550](https://doi.org/10.1366/11-06550).
- 31 K. Pearson, "LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space", *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Scienc* **2**(11), pp. 559–572, (1901). doi: [10.1080/14786440109462720](https://doi.org/10.1080/14786440109462720).
- 32 S. Mishra, U. Sarkar, S. Taraphder, S. Datta, D. Swain, R. Saikhom, S. Panda, and M. Laishram, "Principal Component Analysis", *International Journal of Livestock Research*, p. 1, (2017). doi: [10.5455/ijlr.20170415115235](https://doi.org/10.5455/ijlr.20170415115235).
- 33 O. Sugakova and R. Maiboroda, "Principal components analysis for mixtures with varying concentrations", *Modern Stochastics: Theory and Applications* **8**(4), pp. 509–523, (2021). doi: [10.15559/21-VMSTA191](https://doi.org/10.15559/21-VMSTA191).
- 34 Y. Z. Ma, A Tutorial on Principal Component Analysis. 2014. doi:10.13140/2.1.1593.1684
- 35 J. Harynuk, A. P. de la Mata, and N. Sinkov, "Application of Chemometrics to the Interpretation of Analytical Separations Data", (2012). doi: [10.5772/33960](https://doi.org/10.5772/33960).
- 36 C. B. Saltonstall, T. E. Beechem, J. Amatya, J. Floro, P. M. Norris, and P. E. Hopkins, "Uncertainty in linewidth quantification of overlapping Raman bands", *Review of Scientific Instruments* **90**(1), p. 013111, (2019). doi: [10.1063/1.5064804](https://doi.org/10.1063/1.5064804).
- 37 A. Porporati, K. Tsuji, M. Valant, A.-K. Axelsson, and G. Pezzotti, "Raman tensor elements for multiferroic BiFeO₃ with rhombohedral R3c symmetry", *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, pp. 84–87, (2010). doi: [10.1002/jrs.2394](https://doi.org/10.1002/jrs.2394).
- 38 A. L. Wilson, C. Outeiral, S. E. Dowd, A. J. Doig, P. L. A. Popelier, J. P. Waltho, A. Almond, "Deconvolution of conformational exchange from Raman spectra of aqueous RNA nucleosides", *Commun Chem* **3**(1), Art. no. 1, (2020). doi: [10.1038/s42004-020-0298-x](https://doi.org/10.1038/s42004-020-0298-x).
- 39 K. Chen, C. Massie, H. A. Awad, and A. J. Berger, "Determination of best Raman spectroscopy spatial offsets for transcutaneous bone quality assessments in human hands", *bioRxiv*, p. 2021.07.26.453893, (2021). doi: [10.1101/2021.07.26.453893](https://doi.org/10.1101/2021.07.26.453893).
- 40 J. R. Maher, J. A. Inzana, H. A. Awad, and A. J. Berger, "Overconstrained library-based fitting method reveals age- and disease-related differences in transcutaneous Raman spectra of murine bones", *Journal of Biomedical Optics* **18**(7), (2013). doi: [10.1117/1.JBO.18.7.077001](https://doi.org/10.1117/1.JBO.18.7.077001).
- 41 K. Chen, C. Massie, and A. J. Berger, "Soft-tissue spectral subtraction improves transcutaneous Raman estimates of murine bone strength in vivo". *J Biophotonics* **13**(11), p. e202000256, (2020). doi: [10.1002/jbio.202000256](https://doi.org/10.1002/jbio.202000256).
- 42 W. Kirch, Ed., "Pearson's Correlation Coefficient", in *Encyclopedia of Public Health*, Dordrecht: Springer Netherlands, (2008). pp. 1090–1091. doi: [10.1007/978-1-4020-5614-7_2569](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5614-7_2569).
- 43 R. A. Fisher, "Statistical Methods for Research Workers", in *Breakthroughs in Statistics: Methodology and Distribution*, S. Kotz and N. L. Johnson, Eds., in *Springer Series in Statistics*, New York, NY: Springer, (1992), pp. 66–70. doi: [10.1007/978-1-4612-4380-9_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_6).

- 44 The MathWorks, Inc. (2022). MATLAB version: 9.12.0.2039608 (R2022a). Accessed: January 10, 2024. Available: <https://www.mathworks.com>.
- 45 The MathWorks, Inc. "Statistics and Machine Learning Toolbox Documentation" mathworks.com. Accessed: January 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.mathworks.com/help/stats/index.html>.