Principios y aplicaciones de la **espectroscopia de infrarrojo** en el análisis de alimentos y bebidas

Pedro Mondragón Cortez





Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas

Zapopan, Jalisco, México 2020





Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas.

Primera edición, septiembre de 2020.

D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. <u>www.ciatej.mx</u>

Av. Normalistas 800, Colonia, Colinas de la Normal, C. P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México.

ISBN 978-607-8734-12-2

Diseño de portada: P. Mondragón Cortez.

Se prohíbe la reproducción total o parcial de esta obra, incluido diseño tipográfico y portada, sea cual fuere el medio, sin consentimiento por escrito del autor.

Contenido

Pr	Prefacio	
Agradecimientos		
1.	La química analítica	11
	1.1. La importancia de medir las propiedades en los alimentos	11
	1.2. La definición de química analítica	11
	1.3. El tratamiento de las muestras	13
	1.4. El resultado del análisis químico	14
	1.5. La selección de la técnica de análisis	16
	Lecturas recomendadas	17
2.	Las técnicas de análisis y la actualidad ambiental verde	18
	2.1. Introducción	18
	2.2. Los tiempos verdes	18
	2.3. El concepto de la química verde	20
	2.3.1 Los doce principios de la química verde	21
	2.4. La química analítica verde	22
	2.4.1. Los principios de la química analítica verde	22
	2.4.2. Las técnicas analíticas verdes	23
	Referencias	24
3.	Los principios de la espectroscopia de infrarrojo	25
	3.1. La naturaleza de la luz	25
	3.2. La radiación electromagnética	26
	3.3. La espectroscopia	28
	3.4. Breve historia de las técnicas espectroscópicas	30
	3.4.1. El inicio	30
	3.4.2. El descubrimiento de la radiación infrarroja	31
	3.4.3. Génesis de espectroscopia de infrarrojo	31
	3.5. La absorción de la radiación infrarroja	32
	3.5.1 El momento dipolar	32
	3.5.2 El fenómeno de resonancia	34
	3.6. El principio fundamental de la espectroscopia de infrarrojo	35
	3.7. Los modos normales de vibración	37
	Referencias	39
4.	El espectrómetro de infrarrojo	41
	4.1. Una breve historia	41
	4.2. La evolución de los espectrómetros	42
	4.3. Los espectrómetros dispersivos	44
	4.4. El espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier	45
	4.5. El espectro de infrarrojo	47

	4.6. Consejos generales para la obtención de un espectro	48
	Referencias	50
5.	El accesorio de reflexión total atenuada (ATR)	51
	5.1. Introducción	51
	5.2. Los accesorios de interacción	52
	5.3. Principios básicos de refracción y reflexión de la luz	53
	5.3.1 El índice de refracción	53
	5.3.2 El índice de refracción de los alimentos	53
	5.3.3 La ley de Snell	54
	5.4 El fundamento del accesorio de ATR	56
	5.4.1 El fenómeno de la onda evanescente	57
	5.5 Geometrías de los accesorios de ATR	58
	5.6 Tipos de cristales de los accesorios de ATR	61
	5.7 Ventajas del accesorio de ATR con relación a los modos de transmisión	
	y reflexión difusa	63
	Referencias	64
6	Análisis de los espectros de infrarrojo	66
	6.1 Introducción	66
	6.2 El espectro de infrarrojo y sus zonas características	66
	6.3 Guía general para la interpretación de un espectro	67
	6.3.1 La región de los grupos funcionales	67
	6.3.1.1 La región de 4000-2500 cm ⁻¹	68
	6.3.1.2 La región de 2500-2000 cm^{-1}	68
	6.3.1.3 La región de 2000-1500 cm ⁻¹	68
	6.3.2 La región de huella digital $(1500-600 \text{ cm}^{-1})$	68
	6.4 Análisis de espectros FTIR-ATR de muestras alimenticias	70
	6.5 Factores que afectan la calidad de los espectros	71
	6.5.1 Calidad de contacto muestra-cristal del ATR	71
	6.5.2 Influencia de la forma física de la muestra	73
	6.5.3 Señal residual del <i>background</i> en el espectro	74
	6.5.4 La interferencia del solvente en un espectro	75
	6.6 Tratamiento de los espectros obtenidos	76
	6.6.1 Suavizado (<i>Smoothing</i>)	76
	6.6.2 Sustracción de espectros	78
	6.6.3 Transformación por derivadas	79
	6.6.4 Transformación por curvas gaussianas	80
	6.7 Identificación de los grupos funcionales	80
_	Referencias	82
7	La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas	83
	/.1 Introducción	83
	7.2 El espectro de FTIR-ATR del agua	83

	7.3 El esp	ectro FTIR-ATR del agua contenida en los alimentos	86
	7.4 El aná	ílisis de los carbohidratos por FTIR-ATR	90
	7.4.1	Introducción	90
	7.4.2	El espectro de los carbohidratos	90
	7.4.3	El espectro de mezclas de carbohidratos	93
	7.5 El aná	álisis de los lípidos por FTIR-ATR	97
	7.5.1	Introducción	97
	7.5.2	El espectro de los lípidos y sus principales picos	97
	7.5.3	La identificación de los lípidos en muestras ricas en otros compuestos	99
	7.5.4	Obtención de espectros utilizando poca cantidad de muestra	99
	7.5.5	Determinación de grasas trans	102
	7.6 El aná	álisis de las proteínas por FTIR-ATR	103
	7.6.1	Introducción	103
	7.6.2	El espectro de las proteínas	103
	7.6.3	Espectros de muestras ricas en proteínas	105
	7.6.4	El grupo amida I y la deconvolución gaussiana	106
	7.6.5	Espectros de FTIR-ATR de muestras de proteína con agua	111
	7.6.6	Identificación de la desnaturalización de las proteínas	113
	Referenci	as	116
8	Aplicacion	nes selectas de la espectroscopia FTIR-ATR	117
	8.1 Introdu	ucción	117
	8.2 Anális	is cuantitativo en muestras líquidas	117
	8.3 Aplica	ción de métodos de análisis estadístico	121
	8.4 Seguir	nientos a reacciones de proceso: caso tequila	125
	8.4.1	Caracterización FTIR-ATR de los jugos primarios del agave	125
	8.4.2	Caracterización FTIR-ATR del cocimiento de los jugos del agave	127
	8.4.3	Caracterización FTIR-ATR de la fermentación de los jugos cocidos	128
	8.5 Evolue	ción espectral de una muestra por evaporación	129
	8.5.1	Ejemplo de evolución espectral por evaporación de una muestra	131
	8.6 Introdu	ucción al estudio de las interacciones moleculares por FTIR-ATR	133
	8.6.1	Identificación del enlace por puentes de hidrógeno	133
	8.6.2	Efecto de los puentes de hidrógeno en una solución	137
	8.6.3	La influencia de la sal (NaCl) en los enlaces puentes de hidrógeno	138
	8.6.4	Observación de la pérdida de puentes de hidrógeno en una proteína	140
	8.6.5	Interacciones moleculares en una muestra sólida	141
	8.6.6	La interacción carga-carga	142
	8.7 Espec	tros FTIR-ATR de compuestos minoritarios en alimentos	145
	Referencia	as	148
	Glosario d	le términos	150
	Anexos		153
	Anexo A.	Cartas de asignación de picos en espectros de infrarrojo	153

Anexo B. Posición y asignación de picos en un espectro de infrarrojo		
de los componentes mayoritarios en alimentos o bebidas.	155	
Anexo C. Momentos dipolares, enlaces de vibración y grupos funcionales		
de algunas moléculas.		

Prefacio



Este libro, en buena medida, está cimentado en la experiencia de trabajo y estudio que he tenido respecto al análisis de alimentos y bebidas utilizando la técnica de espectroscopia de infrarrojo en las instalaciones de la unidad de tecnología alimentaria (TECALIM) del CIATEJ. Está herramienta de análisis ha sido utilizada para estudiar muestras de un buen número de proyectos externos, tesis o servicios especializados.

El objetivo de este libro fue plasmar una visión didáctica formal, pero al mismo tiempo, amena y clara sobre los principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el ámbito del análisis de alimentos y bebidas. Dejo a juicio del lector la eficiencia del objetivo perseguido. Este libro puede ser utilizado por investigadores y estudiantes que están involucrándose por primera vez en este campo de estudio, pero también puede ser utilizado, por personas que ya tienen conocimiento o experiencia previa en el uso de la técnica de espectroscopia de infrarrojo y que, de alguna forma, buscan reforzar su conocimiento con relación a la misma. Este libro consta de ocho capítulos. Seis capítulos están dedicados al tema de espectroscopia de infrarrojo y dos tratan sobre aspectos introductorios, relacionados con el tema principal.

En el **capítulo uno** se hace énfasis de la importancia que tiene en la actualidad la química analítica, mencionándose algunos ejemplos de herramientas de análisis modernas y, además, se proporcionan algunos consejos útiles para realizar un análisis químico de calidad, independientemente de la técnica seleccionada.

El **capítulo dos** trata sobre la química analítica verde. El motivo de insertar este capítulo fue debido a que hoy en día el cuidado al medio ambiente es de suma importancia, y la química analítica verde busca la reducción o eliminación de sustancias químicas usadas en sus metodologías. Aquí, se hace una breve recopilación sobre los conceptos de la química verde. Además, la espectroscopia de infrarrojo *per se* puede ser considerada como una técnica amigable o verde con el medio ambiente, ya que generalmente no consume productos o solventes químicos agresivos.

El **capítulo tres** habla sobre los conceptos básicos en los que está basada la espectroscopia de infrarrojo. Se hace un recorrido desde la definición de la luz hasta llegar a la organización energética de la luz: el espectro electromagnético, donde se encuentra el intervalo de longitud de onda asociado con las características energéticas de la radiación infrarroja. Se habla sobre la interacción luz-materia (espectroscopia) y sus diferentes tipos. Además, en este capítulo se hace un viaje a la historia de la espectroscopia infrarroja, desde sus inicios formales, hechos por el científico Herschel, hasta llegar a las aplicaciones actuales usando modernos espectrómetros de infrarrojo.

El **capítulo cuatro** trata sobre los espectrómetros de infrarrojo. Se habla con relación a sus principios de operación y al resultado obtenido: el espectro de infrarrojo. Además, se hace un recorrido histórico sobre la evolución física y operativa de los espectrómetros de infrarrojo

hasta llegar a los espectrómetros modernos, los cuales son cada vez más pequeños y ofrecen una mejor resolución espectral.

En el **capítulo cinco** se habla sobre el accesorio de reflexión total atenuada (ATR, de sus siglas en inglés). El accesorio de ATR es de vital importancia en la espectroscopia de infrarroja, ya que es un dispositivo de cristal de alto índice de refracción donde se coloca la muestra a ser analizada y tiene lugar la interacción con la radiación infrarroja generada por el espectrómetro, además, actualmente el accesorio de ATR es ampliamente usado en el análisis de toda clase de alimentos y bebidas. En este apartado se muestran los principios básicos de la reflexión total atenuada del haz de infrarrojo que tienen lugar en la interfase muestra-cristal donde sucede la interacción. Además, se mencionan las propiedades de los diferentes tipos de cristales de ATR más comúnmente utilizados y se indican algunas recomendaciones para obtener espectros de infrarrojo de calidad utilizando el accesorio de ATR.

El **capítulo seis** comprende de manera general el análisis de los espectros de infrarrojo de alimentos y bebidas. Son dados a conocer los pasos a seguir para interpretar un espectro FTIR-ATR, mediante la identificación de los picos en un espectro, es decir la asociación especifica con los enlaces atómicos provenientes de la muestra estudiada. También, son mencionados algunos aspectos que podrían afectar la calidad de los espectros obtenidos, por ejemplo, la aparición de la señal espectral del agua en los espectros o la forma física de la muestra por analizar (polvos). Además, se mencionan algunas opciones de software para ayudar a mejorar la resolución gráfica de los espectros, por ejemplo, el suavizado, la obtención de primera o segunda derivada, la transformación gaussiana, entre otras opciones. Finalmente, se muestran ejemplos de la identificación de grupos funcionales en espectros generados a partir de diferentes muestras alimenticias.

En el **capítulo siete** se expone de forma específica la caracterización espectral de alimentos ricos en agua, carbohidratos, lípidos y proteínas. En cada uno de espectros obtenidos de los anteriores alimentos se detallan los aspectos más trascendentes con relación a la identificación de los picos identificados en sus respectivos espectros FTIR-ATR obtenidos. Para los espectros de los alimentos ricos en proteínas se hace un extenso análisis de sus picos principales (amida I y II) y se muestra el uso de la transformación espectral por gaussianas para la determinación de la estructura secundaria en una proteína, así como, se muestra un ejemplo de la trasformación de la estructura de la proteína (desnaturalización), vía al cambio espectral relacionado con la destrucción de la interacción por puentes de hidrógeno en la estructura de la proteína, también, utilizando para ello a la trasformación gaussiana.

El **capítulo ocho** trata sobre algunas de las aplicaciones selectas más importantes de la técnica FTIR-ATR usadas en la caracterización de alimentos y bebidas, las cuales se han venido utilizando en los últimos años. Por ejemplo, se muestra el análisis cuantitativo de compuestos en muestras líquidas, la aplicación métodos estadísticos de manejo de datos espectrales provenientes de alimentos con diferentes propiedades, el seguimiento a reacciones de proceso, el seguimiento a reacciones *in situ* (sobre el cristal del ATR), el estudio de interacciones moleculares, poniendo énfasis en la interacción por puentes de

hidrógeno y en la interacción carga-carga. Por último, son mostrados ejemplos de espectros FTIR-ATR de compuestos minoritarios extraídos de distintos tipos de alimentos.

Finalmente, tengo la confianza que este libro sirva para expandir entre estudiantes, profesionales y público en general, involucrados en el análisis de alimentos, la difusión del conocimiento en el campo de la espectrometría de infrarrojo y que cuando se tenga la oportunidad de utilizar está técnica, el libro pueda ser de utilidad o apoyo para culminar de buena manera el trabajo de investigación llevado a cabo.

Pedro Mondragón Cortez

Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del Estado de Jalisco A. C. (CIATEJ), Zapopan, Jalisco, México. Agosto, 2020.

Agradecimientos

Parte de la experiencia adquirida, y reflejada en este libro, por este autor con relación a la técnica de FTIR-ATR y su aplicación en el estudio de alimentos y bebidas fue en mi lugar de trabajo en los más recientes años: el CIATEJ, A.C. Lo anterior aprendido, fue posible gracias a mi participación en proyectos de investigación, servicios tecnológicos y en la colaboración o dirección de tesis de pregrado o posgrado. Al Centro mi agradecimiento por su confianza en mi desarrollo profesional y personal.

También, a los colegas y estudiantes su confianza depositada en mi persona, son tantos los nombres que no quisiera omitir alguno, pero reitero mi más sincero reconocimiento por permitirme acompañarlos en sus trabajos de investigación y desarrollos tecnológicos relacionados con la espectroscopia de infrarrojo.

Además, quiero expresar sinceramente, qué en cada una de mis colaboraciones aprendí un poco más sobre la técnica de FTIR-ATR, ya que nuevos materiales estaban siendo involucrados o nuevos retos de análisis fue necesario desarrollar para cumplir con los objetivos planteados por el trabajo llevado a cabo.

Finalmente, quiero agradecer especialmente, a la amiga y compañera de trabajo, a la M. C. Julisa López Ramírez por su amable y desinteresada ayuda en la revisión de este manuscrito. Sus comentarios y sugerencias técnicas y de corrección de estilo fueron muy enriquecedores.

Capítulo 1. La química analítica

1.1 La importancia de medir las propiedades en los alimentos

Un alimento, en cualquier presentación física, lo podemos definir como todo producto natural, o con cierto grado de transformación, que por su composición química y propiedades sensoriales puede ser ingerido para saciar el hambre, satisfacer el apetito y ser portador de sustancias nutrimentales para que dentro del cuerpo humano se desarrollen los procesos bioquímicos necesarios para la vida. Además, un alimento también debe de ser seguro, por lo que determinar su inocuidad es importante. En forma general, un alimento tiene tres grandes grupos de componentes: carbohidratos, proteínas y lípidos. Además, los alimentos tienen cientos de componentes minoritarios, generalmente en bajas concentraciones, tales como: vitaminas, minerales, ácidos, pigmentos, enzimas, oxidantes, antioxidantes y una variedad de compuestos que le confieren su aroma y sabor. El agua es un componente que está siempre presente en la mayoría de los alimentos, a veces en proporciones notables (p.ej. el pepino o la jícama con 98% en peso). Dependiendo de la concentración de cada componente mayoritario, los alimentos se pueden clasificar como ricos en agua, en carbohidratos, en proteínas o bien en lípidos. Pero, a un alimento también lo podemos clasificar como natural o procesado. Por lo tanto, de acuerdo a la definición de alimento, el conocimiento de su composición, tanto en forma cualitativa y cuantitativa, es de vital importancia para asegurar su función de alimentar, nutrir y de provocar cierto grado de placer sensorial al consumidor. La caracterización de alimentos está englobada en lo que hoy en día se conoce como la química analítica, la cual precisa el uso de equipos y metodologías para lograr los resultados apropiados. En la Figura 1.1 se puede observar, algunos equipos en un moderno laboratorio de análisis de alimentos (CIATEJ).

1.2 La definición de química analítica

La química analítica es una de la rama de la química que tiene como objetivo magistral el estudio de la composición química de una sustancia o muestra, a través de diferentes métodos. Aunque, hay que mencionar, que dentro de la química analítica pueden estar clasificadas las técnicas de análisis basadas en las propiedades fisicoquímicas de una muestra (por ejemplo, la reología, la calorimetría, etc.), las cuales, obviamente, se encuentran basadas en su composición química. La química analítica ha desempeñado un papel fundamental en

11

el desarrollo de la ciencia en muy diversos campos, tales como la medicina, la biotecnología, la ciencia de los materiales, etc. La química analítica se divide en la química analítica cualitativa, la cual determina los componentes presentes en una muestra, y la química analítica cuantitativa, la cual mide la cantidad relativa de los compuestos identificados.





Figura 1.1 Herramientas de la química analítica en el laboratorio de análisis de alimentos del CIATEJ.

En el contexto de los alimentos, diversos tipos de análisis han sido perfeccionados con el paso del tiempo, tales como la determinación de proteínas, carbohidratos o lípidos, han propiciado el perfeccionamiento de diversas técnicas de análisis, que han utilizado diversos reactivos, diferentes equipos analíticos y varias herramientas estadísticas de análisis de datos. La búsqueda de métodos analíticos más rápidos, selectivos, precisos y menos contaminantes es uno de los objetivos básicos buscados por los investigadores de la química analítica, no solamente relacionado con la medición de alimentos, sino en el análisis de cualquier muestra orgánica o inorgánica de que se trate. En la práctica, resulta muy difícil encontrar métodos analíticos que combinen todas las características mencionadas, por lo que a menudo es necesario prescindir de alguna de ella.

El desarrollo de sistemas instrumentales químicos más exactos y confiables, sumado al desarrollo en las técnicas estadísticas y computacionales, ha favorecido el desarrollo de metodologías analíticas innovadoras que presentan un alto grado de exactitud en la identificación de alimentos, como son la calorimetría diferencial de barrido, la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos de alta resolución, la resonancia magnética nuclear, métodos basados en DNA y diversas técnicas de espectroscopia: UV-Vis (ultra violetavisible), colorimetría, difracción de rayos X o la espectroscopia de infrarrojo. De igual manera la evolución de las tecnologías de la electrónica ha permitido la fabricación de instrumentos de mejor calidad, los cuales pueden aportar mejor resolución y rapidez en el resultado obtenido. Hay que mencionar que el desarrollo de las técnicas señaladas tuvo lugar en las décadas de los años 50's, 60's y 70's del siglo XX, las cuales se modernizaron a partir de los años 90's del mismo siglo y hasta el día de hoy, principalmente debido al uso de sistemas computacionales que las convirtieron en más amigables y fáciles de utilizar. Idealmente, las técnicas de análisis deben ser rápidas, fáciles de usar y con un costo ajustable al presupuesto propio. Muchas de las técnicas analíticas arriba mencionadas son costosas y en la mayoría requieren a menudo un complicado proceso de preparación de la muestra. Sin embargo, una de ellas, la técnica de espectroscopia de infrarrojo, objeto de este libro, ha sido considerada por investigadores de diferentes partes del mundo como una herramienta rápida, precisa, relativamente económica y no contaminante para el análisis de las propiedades en alimentos y bebidas.

1.3 El tratamiento de las muestras

Primero se debe de tomar una muestra representativa del sistema real. Posteriormente, para realizar un análisis químico, la muestra que va a ser evaluada debe de tener una forma o estado que se pueda adaptar al equipo analítico en cuestión. Es común que la muestra a medir este sometida a un proceso de tratamiento químico o físico, o una combinación de ambos. La precisión del resultado la mayoría de las ocasiones dependerá en gran medida del acondicionamiento de la muestra. El objetivo fundamental de acondicionar una muestra es evitar al máximo la interferencia que pudiera existir entre las especies moleculares a medir y

las moléculas de la matriz que componen la muestra. Un caso clásico es la preparación de una muestra para cromatografía de gases, en donde la muestra es acondicionada para que una vez dentro del cromatógrafo los componentes, en este caso volátiles, se separen en forma ordenada por diferencia de pesos moleculares. El acondicionamiento anterior, en la mayoría de las ocasiones consume más tiempo que el análisis mismo en el cromatógrafo. Otras técnicas de análisis requieren una muestra con mínima o incluso nula preparación, solamente es condición necesaria qué la muestra a utilizar sea representativa, tal y como es el caso de la preparación de una muestra requerida en la mayoría de las técnicas de espectroscopia.

1.4 El resultado del análisis químico

Hoy en día, el resultado del análisis químico se obtiene a través de la pantalla de una computadora, en forma amigable y rápida, y éste se puede representar en forma de un gráfico x-y, en donde se puede observar el valor de la característica o variable buscada. Las Figuras 1.2-1.5 muestran ejemplos de resultados obtenidos utilizando diversas técnicas de análisis, en donde se pueden observar las diferencias de presentación e información general obtenida. El significado de cada uno de los gráficos estará en función del principio de la técnica de análisis seleccionada, y por supuesto, de las características de la muestra utilizada.



Figura 1.2 Cromatograma de una muestra de miel de abeja, la cual fue acondicionada para extraer su fracción volátil a través de la técnica de cromatografía de gases. Los picos en la figura representan los compuestos identificados en función de su tiempo de retención. En esta técnica se utiliza un detector de espectroscopia de masas para identificar cada uno de los compuestos volátiles extraídos. Cromatograma tomado de la tesis elaborada por Fernando Navarro Rodríguez-Universidad de Guadalajara-CIATEJ, 2010.



Figura 1.3 Termogramas de mieles de abeja provenientes de distintas regiones del Estado de Nayarit (México), en donde pueden ser observados los distintos valores de la temperatura de transición vítrea (señalados en el óvalo). Técnica utilizada: Calorimetría diferencial de barrido.



Figura 1.4 Comportamiento de la viscosidad en función de la temperatura en las mieles de abeja procedentes de dos regiones del Estado de Nayarit (A y B). Técnica utilizada: Reometría.



Figura 1.5 Difractógrama, con los planos de difracción, del recubrimiento de hidroxiapatita (HA) sobre la superficie del acero inoxidable 316L. (*, austenita del acero 316L), (+, CaCrO₄), (\blacklozenge , Fe_{0.2}Cr_{1.3}O₃), (\clubsuit , Fe₃O₄), obtenido en un difractómetro de rayos X, después del sinterizado de la HA a 800 °C durante 2 horas. La fotografía fue tomada por microscopia electrónica de barrido. HA es un bio-cerámico colocado sobre la superficie del acero con el propósito de mejor su bio-compatibilidad. Figura tomada de la Tesis doctoral elaborada por este autor (CINVESTAV-IPN-2004).

1.5 La selección de la técnica de análisis

La selección de una técnica de análisis para desarrollar un trabajo de prueba o de investigación en alimentos puede ser relativamente sencillo para un analista o investigador experimentado. Pero puede causar alguna confusión cuando se trata de un analista novato o estudiante de pregrado o posgrado. Aunque se facilita muchas veces cuando se tiene claro la hipótesis a comprobar y los objetivos específicos relacionados o el propósito del análisis puntual en cuestión. Hoy en día, es común ayudarse de artículos de investigación novedosos, los cuales están relacionados con el tema de estudio, y de este modo, al analizar la metodología del artículo seleccionar el uso de una técnica de análisis en particular para nuestro trabajo e incluso seguir parte de la metodología empleada. También, el seguir los consejos de los tutores de tesis sobre la selección de técnica analítica es muy importante. Sin embargo, es posible realizarse una serie de preguntas antes de seleccionar las técnicas analíticas que se manejarán durante el desarrollo del trabajo de investigación, por ejemplo:

¿De qué tipo de muestra alimenticia se trata (es rica en carbohidratos, proteínas, etc.)? ¿Identificó los compuestos específicos a encontrar?

¿Conozco la propiedades físicas y químicas de los compuestos a encontrar?

¿En qué nivel de concentración se encontrarán los compuestos buscados?, su % en peso, por ejemplo.

¿Conozco el principio químico, físico o fisicoquímico de medición de la técnica de análisis seleccionada?

¿Se requiere preparación especial de la muestra seleccionada?

¿La técnica de análisis seleccionada está disponible y en buen estado?

¿Necesito consumibles para operar la técnica de análisis seleccionada?

¿Cuál es el costo del análisis?

¿Estoy preparado para interpretar los resultados, los cuales serán obtenidos en forma de gráficos (espectros, cromatogramas, etc.)?

¿De cuánto tiempo se dispone para entregar el reporte de análisis de resultados?

¿Basta con una técnica de análisis, o es necesario contemplar el uso de otras técnicas con el propósito de lograr demostrar los objetivos del trabajo o estudio?

Lecturas recomendadas

1. Lourdes Munch, Ernesto Ángeles. Métodos y Técnicas de Investigación. Editorial Trillas, tercera edición, 2007, México, D. F.

Francis Rouessac, Annick Rouessac. Análisis Químico. McGraw Hill-Interamericana, 2000, Madrid, España.
Michele Lees (Editor). Food Authenticity and Traceability. CRC, 2003, Cambridge, England.

4. Salvador Badui Dergal. Química de los alimentos, 5ª edición. Pearson educación de México, 2013, México, D. F.

Capítulo 2. Las técnicas de análisis y la actualidad ambiental verde

2.1 Introducción

Cuando seleccionamos una técnica analítica a menudo se hace pensando en que el resultado obtenido servirá para demostrar los objetivos planteados, este razonamiento científicamente es muy normal, sin embargo, en el momento de selección de la herramienta de análisis, pocas veces pensamos en lo contaminante o no que conlleva su uso. Esto puede resultar hasta cierto punto lógico, puesto que lo importante es obtener el resultado satisfactorio. Pero, hoy en día conviene hacer un alto, y preguntarse el nivel de amigabilidad con el medio ambiente que presenta el uso de la técnica analítica seleccionada, y, por lo tanto, poder hacer planes para en lo posible eliminar el uso de un agente químico contaminante, o disminuir su uso. Si bien, es verdad, que cotidianamente son varias las técnicas de análisis que utilizan compuestos químicos altamente tóxicos, por ejemplo, la cromatografía, y que se siguen habitualmente controles estrictos de eliminación o transformación de los residuos generados.

Por lo tanto, de acuerdo al pensamiento anterior, este libro empieza con este capítulo que habla sobre la filosofía de utilizar técnicas analíticas que sigan, en la manera de lo posible, metodologías que minimicen al máximo el uso de agentes químicos tóxicos para el ser humano y su entorno. Además, en este capítulo se hace mención de la importancia de los tiempos verdes, del concepto de la química verde y de sus principios, así como de las herramientas analíticas verdes, en donde en esta última clasificación, la técnica de espectroscopia de infrarrojo ocupa un lugar importe, ya que a menudo no requiere o produce residuos contaminantes durante su aplicación.

2.2 Los tiempos "verdes"

Hoy en día (año 2020), como todos sabemos, la palabra "verde" sirve para indicar, de acuerdo al contexto en que se encuentre la palabra, que la acción o hecho que se esté involucrando, en cualquier actividad humana, se hace con cuidado al medio ambiente o que se están utilizando procesos o técnicas con el menor involucramiento de sustancias tóxicas que lo

puedan dañar o contaminar. En pocas palabras una persona o institución es "verde" sí contamina menos el medio que lo rodea (aire, agua o suelo) al llevar a cabo cualquier tipo de actividad (industrial, agrícola, de recreación, etc.).

El campo de la medición o caracterización química, física o fisicoquímica de muestras provenientes de materiales (orgánicos e inorgánicos), en la mayoría de las ocasiones es imprescindible el uso de sustancias tóxicas para obtener un resultado confiable. Estos compuestos tóxicos, llamados solventes o reactivos, son utilizados para lograr una óptima separación (y/o concentración) de los compuestos o sustancias que se desean conocer y medir su contenido en una muestra a través del uso de técnicas de análisis en un laboratorio. En la Figura 2.1 se puede observar una perspectiva de un laboratorio del CIATEJ.



Figura 2.1 El laboratorio del CIATEJ y algunas técnicas de análisis de alimentos y bebidas.

La cantidad y tipo de solventes dependerá en gran medida del tipo de medición que se desee realizar. A continuación, se mencionan algunos ejemplos de uso de solventes o reactivos químicos, los cuales a menudo son tóxicos al ser humano y al medio ambiente.

Cuando se desea revelar la estructura de un metal (un acero, por ejemplo), su superficie una vez lijada y pulida, se somete a un ataque químico con ácido nítrico (diluido en agua al 10%) con el propósito de revelar sus fases metalográficas.

Si se desea cuantificar la grasa en un alimento a menudo se utiliza hexano para atrapar la grasa contenida en el alimento. Posteriormente se elimina el solvente y se pesa la grasa obtenida. También, las técnicas de análisis denominadas de separación o cromatográficas (papel, gases o líquidos) utilizan con frecuencia cantidades importantes de solventes químicos tóxicos. Estas técnicas son utilizadas para identificar y cuantificar una gran cantidad de compuestos volátiles y no volátiles en diversos tipos de muestras orgánicas, y de acuerdo con el solvente utilizado se logrará una mejor separación de los compuestos a identificar provenientes de la muestra en cuestión.

20

Si bien, es importante recalcar que muchas técnicas de análisis utilizan compuestos altamente contaminantes, los cuales son necesarios para obtener un resultado confiable, hay que destacar que se hacen esfuerzos de desarrollo e investigación para involucrar un menor contenido de sustancias contaminantes o de ser posible una eliminación por completo de ellos en el desarrollo de un proceso de medición analítica.

En el contexto de este libro, la técnica de espectroscopia de infrarrojo es conocida por utilizar poca cantidad de muestra para su análisis y, frecuentemente, no requiere utilizar sustancias contaminantes de apoyo, es decir, se puede considerar a la espectroscopia de infrarrojo una técnica verde. Aunque hay que decir que algunas veces la muestra a analizar es sometida a un proceso de separación de algunos componentes utilizando ciertos tipos de sustancias químicas agresivas al medio ambiente (alcoholes, cetonas, etc.), pero en concentraciones relativamente pequeñas.

2.3 El concepto de química verde.

La química verde se define como el diseño de los productos químicos y procesos con el propósito de reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas [1]. Esta definición fue formulada a inicios de 1990 y, desde entonces, ha adquirido una alta importancia. Alrededor del mundo, se han creado organismos, tanto gubernamentales como privados, que han generado programas de prevención. Además, se han creado programas educativos, basados en la química verde, en distintas universidades del mundo, tanto a nivel maestría como doctorado. En el año de 1997 apareció la primera revista dedicada a la química verde: *Green Chemistry Journal of the Royal Society Chemistry*.

Un aspecto clave de la química verde es el concepto del diseño [2]. El diseño, por definición, es una manifestación de la intensión ser humano por elaborar un producto y no dejar al libre albedrio o por accidente alguno de sus detalles básicos. Esto incluye la innovación, planeación o concepción sistemática.

Por lo tanto, la química verde se caracteriza por la cuidada planeación de síntesis química y diseño molecular para reducir adversas consecuencias. La química verde ha sido utilizada en todos los ámbitos industriales: aeroespacial, automotriz, electrónica, agrícola, farmacéutico, etc.

Finalmente, la meta de la química verde es llegar a lograr una sustentabilidad técnica y/o económica a través del diseño de metodologías involucradas en la fabricación de un producto que minimicen el uso directo de sustancias químicas peligrosas, así como, se disminuya al máximo la generación de residuos contaminantes (o al menos que se han altamente biodegradables) durante su elaboración.

La filosofía de la química verde puede resumirse en los siguientes puntos [1]:



2. La química verde busca diseñar la naturaleza inherente de los productos y procesos químicos para reducir su riesgo intrínseco.

3. La química verde trabaja como un sistema cohesivo de principios y criterios.

2.3.1 Los doce principios de la química verde.

Los doce principios de la química verde fueron propuestos en el año de 1998 por los científicos Paul Anastas y John Warner [3]. Básicamente, los principios son una guía para minimizar el uso de productos químicos contaminantes durante la producción de un producto o servicio. A continuación, se enlistan los doce principios de la química verde.

1. Prevención: Es mejor evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.

2. Economía atómica: Los métodos de síntesis deberán diseñarse de manera que reúnan al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.

3. Aplicación de metodologías que generen productos con toxicidad mínima: Cuando sea posible, los métodos de síntesis deberán diseñarse para utilizar y producir sustancias que tengan poca o nula toxicidad, tanto para el ser humano como para el medio ambiente.

4. Generar productos eficaces, pero no tóxicos: Los productos químicos deberán ser seleccionados de manera que mantengan la eficacia a la vez que reduzcan su toxicidad.

5. Reducir el uso de sustancias auxiliares: Evitar el uso de sustancias que no sean indispensables (solventes para realizar separaciones, etc.) y en el caso de ser utilizadas que sean lo más inocuos posible.

6. Consumo energético eficiente: Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, minimizando su consumo. Sí es posible, llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.

7. Uso de materias primas renovables: Las materias primas deberán ser preferentemente renovables en lugar de agotables, siempre que sea técnica y económicamente viable.

8. Reducir la derivatización: Se evitará, en lo posible, la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).

9. Potenciación de la catálisis: Emplear, en lo posible, catalizadores selectivos y reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.

10. Generar productos biodegradables: Los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no perduren en el medio ambiente, sino que se conviertan en productos de tengan una degradación inocua.

11. Desarrollar metodologías analíticas para el monitoreo en tiempo real: Las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir una monitoreo y control en tiempo real del proceso, detectando la formación de sustancias peligrosas casi de manera inmediata.
12. Prevención de accidentes químicos: Seleccionar las sustancias empleadas en los procesos químicos de manera que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluyendo las emanaciones, explosiones e incendios.

2.4 La química analítica verde.

La química analítica verde puede ser considerada como una rama de la química verde, y desde hace algunos años, ha sido de vital importancia en el desarrollo de nuevas metodologías dentro de la química analítica. La química analítica verde se encuentra basada en los doce principios de la química verde. Y en esencia, se busca reducir la aplicación o reducción de sustancias químicas peligrosas en la medición de las propiedades físico-químicas de una muestra. En la Figura 2.2 se puede observar esquemáticamente el procedimiento general para realizar una medición analítica en una muestra.



Figura 2.2 Procedimiento típico de medición de una muestra

2.4.1 Los principios de la química analítica verde.

Existen principios a seguir al llevar a cabo una medición química verde [4], los cuales se mencionan a continuación:

1. Eliminación de los solventes del proceso analítico (o al menos una importante reducción), particularmente de solventes orgánicos.

2. Reducción de vapores o gases, así como la reducción de desechos líquidos y sólidos.

3. Eliminación de agentes altamente tóxicos para humanos y para el medio ambiente de los procedimientos analíticos.

4. Reducción del consumo de energía y del trabajo en el desarrollo de procedimientos analíticos.

De acuerdo a los principios enunciados, la preparación adecuada de la muestra es una característica importante para seguirlos, al igual, obviamente, de la naturaleza química y física de la muestra. En forma ideal, una muestra para un análisis químico verde, debe de tener alguna de las siguientes características: tiempo de preparación reducido para un ensayo analítico (sin el uso de agentes o reducir al máximo su uso) y usar poca cantidad de muestra [5-7].

2.4.2 Las técnicas analíticas verdes.

La selección de una técnica química analítica depende del tipo de información física, química o fisicoquímica que se desea obtener de la muestra (véase diagrama de bloques en Figura 2.3). Esta información proporcionada por el equipo sirve para demostrar una hipótesis o lograr los objetivos planteados en un trabajo de investigación. A menudo, es necesario utilizar varias técnicas analíticas a la vez para obtener los resultados deseados y confiables.



Figura 2.3 Diagrama de bloques para de la selección de una técnica de análisis

Existen muchas técnicas de análisis aplicadas ampliamente para la determinación de propiedades en muestras de alimentos y bebidas. Por ejemplo, las técnicas de espectroscopia (Espectrometría de infrarrojo, difracción de rayos X y colorimetría). Estas técnicas pueden ser consideradas como verdes, ya que a menudo solamente se necesita una muestra homogénea proveniente de un alimento o bebida para llevar a cabo el análisis.

Referencias

1. Anastas P., Eghbali N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. Chemical Society Reviews, 39, 301-312.

2. Clark J. H. (1999). Green Chemistry: Challenges and opportunities. Green Chemistry, February, 1-8.

3. Clark J. H. (2006). Green Chemistry: today (and tomorrow). Green Chemistry, 8, 17-21.

4. Galuszka A., Migaszewski Z., Namiesnik J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. Trends in Analytical Chemistry, 50, 78-84.

5. Spietelun A., Marcinkowski, de la Guarda M., Namiesnik J. (2013). Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards Green analytical chemistry. Journal of Chromatography A, 1321, 1-13.

6. He Y., Tang L., Wu X., Hou X., Lee Y. (2007). Spectroscopy: The best way toward Green Analytical Chemistry? Applied Spectroscopy Reviews, 42, 119-136.

7. Keith L. H., Gron L. U., Young J. L. (2007). Green Analytical Methodologies, Chemical Reviews, 107, 2695-2708.

Capítulo 3. Los principios de la espectroscopia de infrarrojo

3.1 La naturaleza de la luz

En la Grecia clásica, la luz llamó la atención de varios pensadores griegos. Demócrito consideraba a la luz como un flujo de diminutas partículas que partían de una fuente luminosa, por ejemplo, el sol o una vela. Pero, Pitágoras tenía una versión opuesta, él pensaba que los ojos emitían una luz que envolvía a los objetos dándoles forma y tamaño. En el siglo XVII Isaac Newton planteó que la luz estaba formada por corpúsculos, los cuales se propagaba en línea recta y que la luz cambiaba su velocidad mientras pasaba de un medio a otro. Además, Newton observó utilizando un prisma que la luz blanca estaba formada por una banda de varios colores. En esa misma época Christian Huygens sostenía una teoría diferente a la de Newton, él decía que la luz viajaba en forma de onda y no como un conjunto de partículas.



Figura 3.1 El efecto fotoeléctrico explicado por Albert Einstein en 1905 contribuyó a comprobar el comportamiento de la dualidad de la luz: onda-partícula. Los electrones del material absorben los fotones y adquieren la suficiente energía para salir.

A principios del siglo XIX Thomas Young demostró con experimentos basados en la interferencia de la luz, que la luz es un fenómeno de naturaleza ondulatoria. Décadas después Michael Faraday propuso que la luz era una onda de naturaleza electromagnética de alta frecuencia. En 1862 el francés Léon Foucault midió la velocidad de la luz con buena

precisión (2.8 x 10⁸ m/s). Pocos años después, James Maxwell unificó todas las teorías hasta esa fecha sobre la naturaleza de la luz, y demostró mediante ecuaciones matemáticas que la luz era de carácter ondulatorio compuesta por un campo magnético y eléctrico. A fines del siglo XIX la naturaleza ondulatoria de la luz era la aceptada por la mayoría de los científicos. Sin embargo, a inicios del siglo XX se fueron encontrando nuevos fenómenos que no se podían explicar suponiendo que la luz se comportara como una onda, sino más bien se podían entender si la luz actuará como partícula, por ejemplo, el efecto fotoeléctrico, descubierto por Hertz en 1887 y analizado por Albert Einstein en el año de 1905, esto es, la emisión de electrones de las superficies de sólidos y líquidos cuando son iluminados (Figura 3.1). Por lo que se determinó que la luz presentaba una doble naturaleza: onda-partícula. En aquel tiempo muchos trabajos experimentales confirmaron esta dualidad, por ejemplo, el fenómeno de difracción de partículas que mostraban los electrones. Cabe decir que Einstein alcanzó el premio Nobel por su trabajo sobre el efecto fotoeléctrico.

3.2 La radiación electromagnética

La intensidad de la luz está organizada en lo se conoce como el espectro electromagnético y se encuentra divido en varias regiones en función del nivel de intensidad de la radiación, es decir de su longitud de onda. En la Figura 3.2 se puede apreciar en forma esquemática las regiones del espectro electromagnético. Los humanos podemos apreciar las cosas que nos rodean en todas sus variedades de colores gracias a que nuestros ojos interactúan con la luz o radiación visible. Los ojos de los humanos evolucionaron a través del tiempo para solamente detectar ese estrecho intervalo de radiación electromagnética. Para poder detectar otro tipo de radiaciones y su efecto que tienen sobre la materia, por arriba o por debajo de la luz visible, es necesario utilizar instrumentos de detección, tales como los espectrómetros.



Figura 3.2 El espectro electromagnético

27

En la Figura 3.2 se puede apreciar que la radiación infrarroja se encuentra ubicada entre 0.70 y 1000 μ m (unidades de longitud de onda). Los diferentes tipos de radiaciones del espectro electromagnético están formadas por una combinación de rápidos movimientos de campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre ellos.



Figura 3.3 Representación de una onda electromagnética.

En la Figura 3.3, los campos están representados por ondas y su magnitud eléctrica y magnética por los vectores E y M, respectivamente. Un descubrimiento significativo realizado con relación a la radiación electromagnética es que su velocidad de propagación era constante para todos los tipos de radiaciones del espectro. Esta velocidad de propagación es la velocidad de la luz (c), la cual en el vacío tiene un valor de 2.997925 x 10^8 m/s. En la Figura 3.3 la distancia entre dos picos adyacentes es la conocida longitud de onda (λ) y la frecuencia se define como el número de veces o ciclos que la onda sufre una oscilación completa (v). Por lo tanto, la velocidad de una onda matemáticamente se puede representar como:

$$c = \lambda v \tag{3.1}$$

Gracias a los trabajos de científicos como Einstein, Plank o Bohr, entre otros, relacionados con la naturaleza de la luz y su interacción con la materia, se encontró que existe una correspondencia entre la energía (E) de distintos tipos de radiación electromagnética consideradas como paquetes de partículas (o cuantos de luz) y está dada por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{E} = \mathbf{h} \, \mathbf{v} \tag{3.2}$$

En donde h es la constante de Planck (h = $6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) y v es equivalente a la frecuencia. En la espectroscopia infrarroja se generan fenómenos de cambio, es decir cuando la radiación infrarroja interacciona con la materia ocurren vibraciones o rotaciones moleculares, los cuales pueden ser representados en términos de discretos niveles de energía cuantizada: E₀, E₁, E₂, E₃, etc., en donde una molécula o más existen en cada uno de estos niveles de energía. En un arreglo molecular habrá distintos niveles de energía y cuando una radiación infrarroja interactúe con las moléculas un cuanto de energía (fotón) podría ser emitido o absorbido. En cada uno de los casos, la energía de los cuantos de radiación debe de estar absorbiendo o emitiendo radiación con la energía justa correspondiente a la diferencia de niveles $E_1 - E_0$ o $E_2 - E_1$, etc. La energía de los cuantos está relacionada con la frecuencia de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\Delta E = h v \tag{3.3}$$

Por consiguiente, la frecuencia de emisión o absorción de la radiación infrarroja para una transición entre estados de energía ($E_1 - E_0$, por ejemplo) se puede expresar como:

$$v = (E_1 - E_0) / h \tag{3.4}$$

3.3 La espectroscopia

La espectroscopia estudia la interacción de la radiación electromagnética con una sustancia y tiene como base que la radiación incidente sobre la materia es diferente a la radiación saliente. Está diferencia energética entre la radiación entrante y la saliente se le conoce como energía de interacción o de absorción. Está clase de energía cuando interacciona con la muestra puede provocar cambios a nivel atómico o molecular. Existen diferentes maneras en que la radiación puede interaccionar con la muestra de estudio, y son básicamente las que se pueden observar ilustradas en la Figura 3.4. En esta figura la radiación incidente se puede descomponer al momento de interactuar con la muestra de varias formas. Estos diferentes tipos de interacción dependerán principalmente de las características físicas y químicas de la muestra, así como de la intensidad de la radiación utilizada.



Figura 3.4 Tipos básicos de interacción de radiación electromagnética en una muestra

Además, dependiendo de la intensidad de la radiación electromagnética que interviene en la interacción con la muestra así será el efecto que se produzca a nivel molecular en ella. En la Figura 3.5 se representan en forma general los efectos atómicos que producen distintos tipos de radiación electromagnética en una muestra.



Figura 3.5 Representación gráfica del efecto en los enlaces atómico producida al interaccionar determinado tipo de radiación electromagnética en una muestra.

Por otro lado, en el estudio de muestras por espectroscopia de infrarrojo, la región de la radiación infrarroja es comúnmente dividida en tres zonas: infrarrojo-cercano de 1.0-2.5 μ m (10,000-4,000 cm⁻¹), infrarrojo-medio de 2.5-50 μ m (4,000-200 cm⁻¹) e infrarrojo lejano de 50-1000 μ m (200-10 cm⁻¹). Como se puede observar, en los valores, es posible utilizar indistintamente longitudes de onda o los llamados números de onda (\bar{v}), en cm⁻¹. Sin embargo, en el ámbito científico, generalmente se utilizan los números de onda, debido, tal vez, a que las cantidades son relativamente más fáciles de ser recordadas o manejadas, por ejemplo, es más sencillo recordar o manejar 3,500 cm⁻¹, que una cantidad en forma decimal, la cual en este caso equivale aproximadamente a 2.857 μ m. La siguiente ecuación relaciona ambas unidades:

$$\bar{\upsilon}(en \ cm^{-1}) = \frac{1}{\lambda \ (en \ \mu m)} \times 10^4$$
 (3.5)

3.4 Breve historia de las técnicas espectroscópicas

3.4.1 El inicio.

En los siglos XVIII y XIX, el prisma de cristal era un elemento óptico ampliamente usado por varios investigadores para descomponer la luz, por ejemplo, tal y como lo hizo Issac Newton en 1666. En aquella época, el prisma fue reforzado con rendijas y lentes telescópicas consiguiéndose así un instrumento más potente y preciso para examinar la luz procedente de distintas fuentes.



Figura 3.6 El espectro de la luz solar encontrado por Joseph Fraunhofer representado por las líneas oscuras representó el inicio moderno de la espectroscopia.

En el año 1802, el químico inglés William Wollaston, y en el año 1814, el físico alemán Joseph von Fraunhofer, descubrieron en forma independiente la presencia de líneas negras en el espectro de la luz solar. Wollaston observó siete líneas negras, mientras que Fraunhofer logró identificar cientos de ellas, cuyas longitudes de onda fueron calculadas con mucha precisión. Años después, los alemanes Gustav Kirchhof y Robert Bunsen descubrieron que, al calentar distintos gases, metales o sales, estos mostraban una serie de líneas de Fraunhofer estrechas, coloreadas y brillantes sobre un fondo oscuro, en una posición bien definida (Figura 3.6). La longitud de onda en la que aparecía cada una de estas líneas era característica de la muestra que había sido calentada. Por lo que, en aquel entonces, se tuvo la idea de utilizar estos espectros como huella digital de los elementos, un distintivo que venía escrito en el tipo de luz que emitían y que permitían identificarlos desde lejos analizando la luz. A partir de ese momento, se desarrolló toda una industria dedicada exclusivamente a la obtención de espectros de todos los elementos y compuestos conocidos. Se puede decir que a fines del siglo XIX y principios del XX fue una época de oro para la recientemente ciencia de la espectroscopia, especialmente la para la astronomía, en aquella época se determinó la composición química del sol, así como los compuestos químicos presentes en estrellas lejanas.

3.4.2 El descubrimiento de la radiación infrarroja

A principios del siglo XVIII el astrónomo William Herschel (Figura 3.7) descubrió la radiación infrarroja cuando trataba de medir la temperatura de los distintos colores del espectro obtenido cuando la luz del sol atraviesa un prisma de vidrio. Herschel, haciendo controles de temperatura en los distintos colores de ese espectro observó que más allá del rojo fuera de las radiaciones visibles la temperatura era más elevada. Además, él encontró que esta radiación invisible por encima del rojo se comportaba de la misma forma desde el punto de vista de fenómenos como la reflexión, refracción, absorción y transmisión que la luz visible. Era la primera vez que alguien demostraba que había otra forma de radiación que era invisible al ojo humano. En aquella época a esta radiación se le nombró energía calorífica, a la cual tiempo después se le denomino como radiación infrarroja (infra, significa más allá del rojo).



Figura 3.7 El astrónomo inglés William Herschel descubrió la radiación infrarroja, la cual es invisible al ojo humano.

3.4.3 Génesis de la espectroscopia de infrarrojo

En el siglo XVIII la fotografía fue inventada por Louis Daguerre en 1839 y en años siguientes fue desarrollada por varios científicos más, específicamente en la fijación de la fotografía en una placa. Años después, y gracias a estos desarrollos Abney y Festing en el año de 1880 lograron obtener en una placa fotográfica, sensible a la radiación infrarroja, los primeros espectros de absorción, los cuales fueron relacionados con la presencia de ciertos grupos químicos en las sustancias analizadas. Este descubrimiento fue de vital importancia para el establecimiento de la espectroscopia como técnica analítica, ya que fue la primera vez que se interpretó un espectro empleando radiación infrarroja. En el año de 1905 William Coblentz realizó las que se pueden considerar las primeras investigaciones utilizando un espectrómetro con radiación infrarroja. Coblentz construyó uno de los primeros espectrómetros, el cual fue

a base de un prisma rotatorio hecho de cloruro de sodio y una termopila conectada a un galvanómetro. Este dispositivo fue altamente sensible para detectar pequeños cambios térmicos en función del voltaje medido. Aunque Coblentz tardaba hasta un día entero en lograr un simple espectro, obtuvo espectros de varios cientos de compuestos en la región comprendida entre 1 y 1.5 μ m. Además, Coblentz descubrió algunos aspectos básicos de la espectroscopia infrarroja, por ejemplo, que cada compuesto tenía su propia "huella digital" o que había sustancias distintas con los mismos patrones de absorción, es decir tenían lo que se conoce actualmente como un grupo funcional (-OH, por ejemplo).

Hay que hacer notar que en la época de Coblentz se estaban llevando a cabo importantes avances relacionadas con la espectroscopia analítica, los cuales fueron la base para el desarrollo de los primeros espectrómetros comerciales a base de prismas rotatorios o de los espectrómetros dispersivos aparecidos en los años 50s y 60s del siglo XX. Hoy en día, y gracias a los progresos de los últimos veinticinco años, los espectrómetros de infrarrojo con trasformada de Fourier con notables adelantos en su electrónica interna y con amigables y rápidos sistemas computacionales de operación son usados ampliamente en escuelas y centros de investigación en diferentes áreas del conocimiento, como ciencias de la salud, criminología, ciencia y tecnología de alimentos, ciencia de los materiales, etc.

3.5 La absorción de la radiación infrarroja

3.5.1 El momento dipolar

Para que ciertos enlaces atómicos de una molécula puedan absorber radiación en infrarrojo, éstos deben de tener una característica especial, es decir, los enlaces atómicos deben de tener un momento dipolar de enlace activo. El momento dipolar se puede definir como la magnitud de la polaridad de los enlaces en una molécula. Cuando dos átomos se hallan enlazados químicamente, y sus electronegatividades son distintas, el de mayor electronegatividad atraerá a los electrones hacia él, dando lugar a dos cargas opuestas en el enlace, es decir se crea un momento dipolar. Sí la molécula estuviera compuesta por más de dos átomos, en ella se podrían generar varios momentos dipolares.

El momento dipolar de enlace es el producto entre el valor de las cargas (q) y la distancia (d) que las separa, o sea la longitud del enlace. De esta manera, tenemos que el momento dipolar de enlace (μ) puede ser definido de la siguiente forma:

$$\mu = (q) (d) \tag{3.6}$$

En la Figura 3.8 se representa la molécula del agua. En esta figura los electrones de los átomos de hidrógeno fueron atraídos fuertemente por el átomo de oxígeno, de mayor electronegatividad, lo que ocasionó que se crearan zonas preponderantemente con cargas positivas (δ +) y negativas (δ -). Estas zonas con cargas en la molécula, las podemos

representar como vectores, con magnitud y direcciones diferentes (ver Figura 3.8). Estos dos vectores al sumarse, darían una determinada magnitud con un signo preponderante, en este caso negativo. En otras palabras, la molécula del agua presenta un momento dipolar, y por lo tanto es "activa" a la radiación infrarroja.



Figura 3.8 Polarización de una molécula de agua

En la Figura 3.9 se muestra un ejemplo de manera general de una molécula *activa*, la cual muestra dos tipos de estiramientos y, por lo tanto, en ambos casos un cambio en su momento dipolar.



Figura 3.9 Representación de los cambios en el momento dipolar de una molécula diatómica (a) bajo la influencia de una radiación infrarroja (b y c).

3.5.2 El fenómeno de resonancia

Además del momento dipolar, otro requisito para que una molécula absorba radiación infrarroja, es que debe de haber una compatibilidad entre la frecuencia de vibración basal en el enlace en cuestión (\bar{v}_1) y la frecuencia de la radiación infrarroja incidente absorbida (\bar{v}_1), fenómeno que se conoce como resonancia. Entonces, el enlace atómico en cuestión aumenta su nivel de vibración en dicha frecuencia (\bar{v}_1), lo cual se manifiesta en un espectro con la formación de un pico de absorción (Figura 3.10). En caso de no coincidir ambas frecuencias (basal y de absorción), se obtiene una interferencia destructiva, por lo tanto, no hay aumento en la vibración del enlace basal en la molécula, y por lo tanto no habrá pico de absorción en el espectro obtenido en dicha frecuencia.



Figura 3.10 Representación gráfica de la obtención de un pico de absorción a partir de un enlace atómico en un espectro de infrarrojo y su relación con la resonancia de frecuencia basal de enlace (\bar{v}_1) y frecuencia de infrarrojo incidente (\bar{v}_1) .
3.6 Principio fundamental de la espectroscopia de infrarrojo

El resultado que se obtiene del análisis por espectroscopia de infrarrojo es un **espectro de infrarrojo** de la muestra analizada. Un espectro es una secuencia de bandas o picos de absorción en un intervalo de frecuencias dentro del infrarrojo. Cada pico en el espectro representa un tipo de vibración que ocurrió en un enlace atómico, cuando interaccionó el haz de infrarrojo con dicha muestra. Estas vibraciones provienen de específicos enlaces atómicos que tienen las moléculas de la muestra analizada.



Figura 3.10 El espectro de infrarrojo de una muestra y la ubicación de sus picos de absorción

En el espectro (Figura 3.10) se pueden observar picos de absorción más intensos, marcados con una flecha, los cuales provienen de los enlaces que vibraron más intensamente al absorber energía en infrarrojo. También, en esta misma figura es posible observar picos de absorción de menor intensidad, que obviamente sus enlaces absorbieron menor cantidad de energía.



Figura 3.11 Representación de la vibración de enlaces específicos (1 y 2) en una molécula al absorber radiación infrarroja.

Ahora bien, ¿Por qué algunos enlaces absorben energía más intensamente que otros? Responder está pregunta es de vital importancia para entender el principio fundamental de la espectroscopia en infrarrojo. Los átomos de una muestra orgánica están unidos mediante un enlace del tipo covalente, es decir los átomos participantes comparten electrones comunes para formar la molécula. Por lo tanto, una muestra podría tener varios enlaces donde participaran átomos, por ejemplo, átomos de carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N) u oxígeno (O). Ahora, como los átomos están siempre en movimiento, las moléculas también lo harán. Pero, como es lógico suponer el movimiento de estas moléculas estará en función de la naturaleza de los átomos que formen el enlace en cuestión.

Por ejemplo, los picos de absorción, del espectro de la Figura 3.10, se generaron de la siguiente forma: antes de incidir el haz de infrarrojo sobre la muestra, los enlaces de la muestra presentaban muchas vibraciones naturales a diferentes intensidades, muchas de ellas en el rango de infrarrojo. Pero, digamos que este tipo de vibración generada en forma natural es relativamente débil. Sin embargo, al incidir la energía de infrarrojo sobre la muestra solamente algunos de los enlaces conseguirán absorber energía en infrarrojo, y serán aquellos que entren en resonancia con la energía que incide sobre ellos, es decir podrán absorber energía, la cual está asociada con un cambio en el momento dipolar de la molécula (o moléculas) lo que dará como resultado una vibración molecular en forma conjunta. Por esta razón, en un espectro la intensidad de los picos es función de la cantidad de enlaces específicos que absorban una energía infrarroja a una intensidad determinada (Figura 3.11). Entonces, como ya mencionamos, en el espectro de infrarrojo es donde se refleja el resultado del nivel de interacción de las vibraciones en los enlaces atómicos de la muestra analizada.

3.7 Los modos normales de vibración

Las interacciones de la radiación infrarroja con una muestra se pueden explicar en términos de los cambios en los momentos dipolares asociados con las vibraciones y rotaciones en algunos de los átomos que conforman las moléculas de la muestra en cuestión. Por ejemplo, en La Figura 3.12, cada átomo en particular presenta tres grados de libertad, es decir tiene tres movimientos a lo largo de sus ejes (x, y, z), estos átomos presentan una vibración normal a una determinada frecuencia, la cual se ve perturbada cuando incide una radiación infrarroja de la misma frecuencia sobre ellos dando lugar a una vibración más intensa y con características propias, es decir, las moléculas se pueden trasladar o rotar.



Figura 3.12 Representación de los movimientos (grados de libertad) de un átomo

La determinación de los movimientos en una molécula es muy complejo, pero se ha permitido deducir que puede considerarse una combinación de varios movimientos vibratorios muy simples. En general, las vibraciones pueden ser como aquellas que cambian longitudinalmente sus enlaces (estiramiento) o que cambien de ángulo sus enlaces (flexión) (Figura 3.13). Algunas de las vibraciones de estiramiento pueden ser de dos tipos, en fase (estiramiento simétrico) o fuera de fase (estiramiento asimétrico), como puede observarse en la Figura 3.14.



Figura 3.13 Vibraciones de estiramiento y flexión



Figura 3.14 Vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento

En el caso de la molécula de H_2O se han identificado de tres tipos de movimientos, los cuales se muestran representados en la Figura 3.15.



Figura 3.15 Modos normales de vibración característicos en una molécula de agua

En la Figura 3.16 se muestran diferentes tipos de vibraciones de flexión. A las vibraciones de deformación y balanceo se les clasifica como vibraciones dentro del plano y a las de agitación y torsión como fuera del plano. En esta figura se están contemplando los átomos aislados de otras uniones y en un mismo plano, por ejemplo, el átomo de hidrógeno, el cual puede moverse en una misma u opuesta dirección. Sin embargo, en moléculas complejas los átomos se encuentran unidos en forma masiva y, por lo tanto, estos átomos forman una red más rígida, lo que provoca a menudo una vibración de flexión ya sea dentro del plano o fuera del plano, tal y como se muestra gráficamente en la Figura 3.16.

Cada uno de estos movimientos se denomina modo normal de vibración. Por ejemplo, la vibración global de la molécula de agua es una combinación de esos tres modos normales de vibración, los cuales tienen distinta rapidez o frecuencia. Así, la frecuencia del modo de estiramiento simétrico es de unos 105 billones de Hz, la del modo de estiramiento asimétrico, de 103 billones de Hz aproximadamente y la del modo de flexión, es de unos 50 billones de Hz.

En general, el número de modos normales de vibración en que se puede descomponer el movimiento de toda molécula no lineal, como el agua, es de 3n–6, siendo n el número de

átomos en la molécula. Por otro lado, si la molécula es lineal, entonces el número de modos normales de vibración es de 3n-5.



Figura 3.16 Representación de los diferentes tipos de vibraciones de flexión. El signo (+) representa un movimiento hacia el lector y el sigo (-) indica un movimiento que se aleja del lector.

Por supuesto, no todos los modos de un tipo (por ejemplo, tensión simétrica) de todas las moléculas tienen la misma frecuencia; eso dependerá de las masas de los átomos y de la fuerza de sus enlaces.

Debido a estos movimientos, cada molécula tiene una cierta energía de vibración, pero esta energía puede variar al absorber energía en infrarrojo. Cuando se absorbe energía la molécula se dice que pasa a un estado de vibración superior en el que los modos de vibración y sus frecuencias no cambian, pero sí la amplitud de la vibración.

Referencias

1. Levine, I. R., Físico Química. Primera Edición (español). McGraw-Hill/Interamericana de España S. A, Madrid (Madrid), 1991, pp. 823-825.

2. Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G., Bioquímica. Tercera Edición. Pearson Educación S. A. Madrid (España), 2009, pp. 226-227.

3. Rouessac, F., Rouessac. A., Análisis Químico. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid (España), (2003).

4. Stuart B., Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications. Wiley and sons, Chichester (England), (2004).

5. Coates, J., "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach" Encyclopedia of Analytical Chemistry, R. A. Meyers (Editor), 10815-10837 (2000)

6. Smith, B. C., Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, CRC, Boca Raton, Florida, 15-53 (1996).

7. Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Photosynthesis Research, **101**, 157-170 (2009).

Capítulo 4. El espectrómetro de infrarrojo

4.1 Una breve historia

El espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier o Espectrómetro de FTIR (siglas del inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) es el nombre del equipo en donde se llevan a cabo las mediciones, es decir la obtención de los llamados espectros. Estos equipos han sido utilizados desde hace cerca de 70 años para el estudio de distintos tipos de sustancias orgánicas. Muchos han sido los cambios que les han sucedido a los espectrómetros a lo largo de ese lapso de tiempo, y distintas disciplinas tecnologías han participado para poder tener los modelos actuales de espectrómetros de FTIR, por ejemplo, el diseño de circuitos electrónicos cada vez más pequeños o el uso de la computadora para manejar y controlar el equipo. Históricamente podemos distinguir tres etapas en el desarrollo de la construcción de espectrómetros de infrarrojo, la primera está relacionada con la aparición (1940) de los primeros equipos cuya característica principal era su extremada lentitud en la obtención de un espectro, además utilizaban internamente prismas ópticos a base de NaCl como sistemas divisores de frecuencias. En ese tiempo no eran populares estos espectrómetros.

A partir de 1950, los espectrómetros de infrarrojo se basaban en método dispersivo y contenían, en lugar de prismas, una rejilla monocromática que dividía o "dispersaba" la radiación en varias frecuencias, sin embargo presentaban baja velocidad de barrido y sensibilidad en comparación con la tercera generación (1980 a la fecha) de espectrómetros, los cuales incluían la computadora para la obtención de espectros por medio del uso del artificio matemático conocido como la transformada de Fourier. Este tipo de espectrómetros ya se habían desarrollado desde los años de 1960s, sin embargo, solamente algunos centros de investigación los usaban debido a que se necesitaban complejos y costosos sistemas de computación. Hay que hacer notar que uno de los dispositivos novedosos incluido en los espectrómetros de infrarrojo de tercera generación fue el interferómetro de Michelson que destituyó al elemento monocromador de los espectrómetros dispersivos. Hoy en día, el uso de los modernos espectrómetros de FTIR son extremadamente amigables, debido principalmente al desarrollo de software asociado con el manejo de los instrumentos. Además, los avances en la electrónica de los equipos han permitido su miniaturización.

4.2 La evolución de los espectrómetros

Físicamente los espectrómetros han experimentado cambios notables a través de los años, por ejemplo, uno de los primeros espectrómetros comerciales se ilustra en la Figura 4.1. Este espectrómetro modelo 12C fue construido en el año de 1945 por la empresa Perkin-Elmer.



Figura 4.1 Espectrómetro de infrarrojo fabricado en el año de 1945

En la Figura 4.2 se muestra el espectrómetro de infrarrojo marca Perkin-Elmer modelo 21 producido en el año de 1950 y en donde se puede apreciar el carrete donde se podía imprimir el espectro de la muestra analizada.



Figura 4.2 Espectrómetro de infrarrojo fabricado en el año de 1950

En los años 60s del siglo pasado el modelo 137 Infracord fue ampliamente utilizado en diversos laboratorios. En la Figura 4.3 se muestra el espectrómetro con algunos de los aditamentos utilizados por el equipo. Nótese el frasco de tinta utilizado para imprimir los espectros en las hojas del rodillo.



Figura 4.3 Espectrómetro de infrarrojo fabricado en el año de 1960.

En la Figura 4.4 se muestra el espectrómetro de infrarrojo modelo PE 1600 fabricado por Perkin-Elmer a fines de los años 80s del siglo pasado, además se puede apreciar la computadora integrada al equipo.



Figura 4.4 Espectrómetro de infrarrojo fabricado en el año de 1988.

Hoy en día, la miniaturización de los equipos de infrarrojo es un hecho, prácticamente se puede decir que hay en el mercado espectrómetros de bolsillo, los cuales permiten la medición en cualquier lugar y tiempo y, además, la transmisión de los datos (espectros) se hace en tiempo real a celulares o computadoras a distancia para su análisis. En la Figura 4.5 se muestra una fotografía de un espectrómetro de la marca Agilent modelo Cary 630.



Figura 4.5. Espectrómetro de infrarrojo moderno marca Agilent modelo Cary 630.

4.3 Los espectrómetros dispersivos

Actualmente los modernos espectrómetros de infrarrojo que se encuentran en el mercado son relativamente fáciles de manejar y los espectros son obtenidos en segundos con una alta resolución. Pero, como ya mencionamos no siempre fue así, de hecho, los modelos antiguos tenían un principio de operación bastante diferente a los modelos actuales. Históricamente, los espectrómetros construidos eran dispersivos. En estos equipos la radiación infrarroja producida por la fuente, y una vez que interaccionaba con la muestra, era dispersada (o dividida en frecuencias individuales) cuando pasaba a través de una rendija monocromática. Entonces, el detector media la cantidad de energía a cada frecuencia que había pasado a través de la muestra. Y como en estos instrumentos cada frecuencia era medida en un determinado momento, la obtención de un espectro se lograba en varios minutos. Los espectrómetros dispersivos eran mecánicamente muy complejos, tenían muchas partes en movimiento, esto ocasionaba que el haz de infrarrojo producido por la fuente recorriera un largo camino hacia el detector, lo que producía a menudo una baja resolución en los espectros obtenidos. En la Figura 4.6 se representa en forma de diagrama el sistema óptico de un espectrómetro de infrarrojo dispersivo de doble haz. En la figura se puede observar el largo camino de la radiación infrarroja desde la fuente hasta el detector. Sin embargo, y a pesar de sus desventajas, los espectrómetros dispersivos fueron utilizados con éxito en todo el mundo por más de 60 años para el análisis de muestras orgánicas, hasta que fueron totalmente sustituidos por los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier a partir de finales de los años 70s del siglo pasado.



Figura 4.6 Esquema de los componentes de un espectrómetro de infrarrojo basado en un elemento monocromador dispersivo

Sin embargo, los espectrómetros de infrarrojo por transformada de Fourier los fueron desplazado poco a poco gracias a su mayor sensibilidad y velocidad de operación, debido principalmente a que el monocromador fue sustituido por un interferómetro, el cual permite el registro simultáneo de varias frecuencias. Debido a que las señales resultantes mostraban múltiples ondas sinusoidales superpuestas, fue necesario aplicar el algoritmo matemático de la transformada de Fourier para convertir estas señales en un espectro convencional de infrarrojo.

4.4 Espectrómetro de infrarrojo con Transformada de Fourier

La mayor desventaja de los espectrómetros dispersivos era su lento proceso para la obtención de un espectro de infrarrojo. Por lo tanto, la idea para medir simultáneamente todas las frecuencias de infrarrojo, en lugar de individualmente como se hacía hasta entonces, se basó en un viejo artifició llamado interferómetro, desarrollado en 1881 por Michelson y Morley, el cual por cierto fue utilizado originalmente para intentar medir la velocidad de la luz. En la segunda mitad de la década de los 70s del siglo XXI fue cuando comenzaron a aparecer comercialmente los primeros espectrómetros basados en el interferómetro y en el uso de sistemas de computadora estos equipos incluían el algoritmo matemático de la transformada de Fourier para convertir el interferograma producido en un espectro de infrarrojo. A partir de ese momento los espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier desplazaron definitivamente a los espectrómetros de infrarrojo basados en métodos dispersivos.

Actualmente, los espectrómetros son físicamente compactos, y cada vez son más pequeños, y los fabrican distintas compañías a nivel mundial, tales como Agilent, Bruker, Cole-Parmer o Nicolet. Los espectrómetros actuales se controlan con distintos tipos de software, los cuales son cada vez más amigables.



Figura 4.7 Representación gráfica de los componentes principales de un espectrómetro de FTIR.

Una de las partes esenciales del espectrómetro es el interferómetro de Michelson, el cual consta de dos espejos (uno fijo y otro móvil) y un divisor de luz (Figura 4.7). Básicamente, en el interferómetro el divisor divide el haz de energía en dos partes, las cuales se dirigen a los espejos y al rebotar en ellos se produce una señal de interferencia al encontrarse nuevamente, que estará dada en función del cambio de la distancia recorrida por el movimiento del espejo móvil. Esta señal de interferencia pasa por la muestra a medir antes de llegar al detector. De este modo, se construye un dominio de distancia recorrida y frecuencia de la radiación, el cual es a vez transformado en el software de la computadora, por medio del artificio matemático conocido como la transformada de Fourier, a un dominio de más fácil lectura, es decir, se obtiene un espectro de infrarrojo.



4.5 El espectro de infrarrojo

Figura 4.8 Espectro de FTIR de un aceite vegetal de cocina en (a) absorbancia y (b) transmitancia

La información obtenida de un ensayo de FTIR se presenta en la forma de un espectro de infrarrojo o de FTIR. Este espectro en el eje de las x (abscisas) representa el número de onda (cm^{-1}) o longitud de onda (μ m) y en el eje de las y (ordenadas) representa la absorbancia o el % de transmitancia. El espectro muestra una serie de picos o bandas llamadas de absorción o transmisión, las cuales se presentan a diferentes intensidades y diferentes posiciones. Un espectro de FTIR puede ser obtenido en absorbancia o transmitancia. En la Figura 4.8 se observa un espectro FTIR de un aceite vegetal de cocina, tanto en absorbancia como en transmitancia y en la figura se puede observar qué las bandas no cambian en frecuencia, pero sus picos se invierten, hacia arriba en absorbancia y hacia abajo en transmitancia. La selección de la presentación del espectro de FTIR estará en función de mostrar las bandas importantes, las cuales serán función del tipo de investigación o estudio que se esté llevando a cabo a una muestra. Incluso, la selección de la presentación del espectros de FTIR en absorbancia. Una expresión útil que relaciona la transmitancia y la absorbancia es la siguiente:

$$A = \log_{10} \left(1/T \right) = -\log_{10} T = -\log_{10} \left(I/I_0 \right) \tag{4.1}$$

Donde, Transmitancia (% de transmitancia, T) es la proporción de radiación transmitida por la muestra (I) con relación a la radiación incidente sobre la muestra (I_0). La absorbancia (A) es el logaritmo de base 10 del recíproco de la transmitancia (T).

4.6 Consejos generales para la obtención de un espectro

Actualmente hay espectrómetros de FTIR fabricados por diversas compañías, básicamente todos ellos contienen las mismas partes esenciales de operación. Además, el software de operación de los equipos, si bien presentan presentaciones visuales diferentes, contienen las mismas instrucciones básicas para obtener un espectro de FTIR de una muestra colocada, por ejemplo, en un accesorio de ATR (se detalla su principio en el siguiente capítulo). A continuación, se presentan en forma general los pasos a seguir para la obtención de un espectro.

a) Tener la muestra del alimento a medir, ya sea en forma de líquido, polvo o película. Asegurar que la muestra en cuestión sea físicamente lo más homogénea como sea posible, especialmente si es un polvo.

b) Asegurarse que la superficie del cristal del accesorio de ATR se encuentre perfectamente limpia.

c) Determinar las condiciones óptimas de operación para la obtención del *background* a determinado número de barridos y resolución. El *background* es generalmente un espectro del aire ambiente, el cual está en contacto con partes del equipo o con el accesorio de ATR, y que de algún modo interactúa con el haz de infrarrojo. Pero, el *background* puede ser de otro tipo, por ejemplo, de agua y aire y, como ya mencionamos, es una señal que automáticamente se elimina del espectro de la muestra. En la Figura 4.9 se muestra el espectro de infrarrojo del *background* del aire ambiente. En esta figura los picos intensos alrededor de los 3500 y 1500 cm⁻¹ están asociadas con la vibración de la molécula del H₂O del aire ambiente. Mientras que aproximadamente a 2300 cm⁻¹ se puede observar una delgada pero intensa banda de absorción, la cual está asignada al CO₂ del aire ambiente.



Figura 4.9 Espectro de FTIR del aire ambiente, background.

d) Una vez obtenido el *background*, la muestra a analizar se coloca en el accesorio de ATR, teniendo cuidado de que la muestra cubra perfectamente la superficie del cristal, así como que la muestra se encuentre perfectamente adherida a la superficie, especialmente si es un polvo.

e) Seleccionar las condiciones de obtención del espectro de la muestra tomando en cuenta los siguientes parámetros: número de barridos, resolución, presentación o intervalo de frecuencia deseada. Estas variables son las comúnmente predeterminadas en el equipo utilizado y tienen el objetivo de obtener espectros nítidos con relación a la obtención de picos de calidad en el espectro. A continuación, una breve explicación de estos parámetros de obtención.

La resolución puede tener valores de 16, 8, 4 o 2 cm⁻¹. Lo cual indica el grado de fineza visual de los datos obtenidos en la medición y, por lo tanto, la generación del espectro con picos de

absorción más definidos. Es decir, el espectro obtenido se construye punto por punto teniendo una distancia dada por el valor de la resolución seleccionado. Por ejemplo, sí se selecciona 4 cm⁻¹, el espectro se construirá en intervalos de 2 cm⁻¹. Para obtener espectros con alta resolución, un valor de 2 o 1 cm⁻¹ deberá de ser seleccionado. Habitualmente se recomienda por los fabricantes de los espectrómetros una resolución de 4 cm⁻¹, tanto para el análisis de muestras sólidas o líquidas.

El número de barridos, o popularmente conocidos como escaneos (palabra proveniente del inglés *scanners*) se refiere al número de veces en que se realiza internamente y rápidamente el espectro de la muestra y cuyo promedio matemático se refleja en el espectro final obtenido. No hay un número de barridos especifico a ser utilizado, sino que se selecciona con base en la calidad observada, es decir sí el espectro es menos fino con 10 barridos, se selecciona ahora 20 o 30 barridos y se observa sí la resolución de los picos de absorción fue mejorada. La selección óptima de la resolución y el número de escaneos se observará en el espectro obtenido, y en mayor medida dependerá de las condiciones físicas de la muestra, por ejemplo, sí es un polvo, éste deberá tener un tamaño de partícula lo más fino que sea posible, ya que en caso de ser grueso el espectro no tendrá buena apariencia.

f) Por último, iniciar la obtención del espectro, el cual a menudo se obtiene en pocos segundos.

En caso de ser necesaria la obtención de más espectros, asegurarse de limpiar el cristal del accesorio perfectamente bien, y proseguir con las mismas recomendaciones dadas. A menudo es común realizar solamente un *background* del aire, aunque se vayan a realizar varios espectros más. Aunque no hay que destacar la obtención de espectro del *background cada* vez que se quiere obtener el espectro de una muestra, sobre todo si el espectrómetro se encuentra en una habitación donde son continuos los cambios composicionales del aire en función a una contaminación o a la producción de un tipo de gas.

Referencias

1. Stuart B., Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications. Wiley and sons, Chichester (England), (2004).

2. Levine, I. R., Físico Química. Primera Edición (español). McGraw-Hill/Interamericana de España S. A, Madrid (Madrid), 1991, pp. 823-825.

3. Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G., Bioquímica. Tercera Edición. Pearson Educación S. A. Madrid (España), 2009, pp. 226-227.

4. Rouessac, F., Rouessac. A., Análisis Químico. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid (España), (2003).

5. Smith, B. C., Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, CRC, Boca Raton, Florida, 15-53 (1996).

Capítulo 5. El accesorio de reflexión total atenuada (ATR)

5.1. Introducción

En el espectrómetro de FTIR, el dispositivo donde se produce la interacción entre la radiación infrarroja y la muestra a ser analizada se le conoce como accesorio de interacción y, al igual que los equipos, a través del tiempo han aparecido en el mercado novedosos diseños. En la Figura 5.1 se pueden observar algunos diseños. Estos diseños están basados generalmente en el aspecto físico de la muestra a ensayar, que pueden ser líquidas, solidas, semisólidas, gaseosas, en polvo o en forma de laminilla delgada. En este apartado se habla del accesorio de reflexión total atenuada, o también conocido como ATR (acrónimo proveniente del inglés, *Attenuated Total Reflection*), ya que es un accesorio ampliamente versátil, debido a que prácticamente se adapta a cualquier tipo de presentación física de la muestra (véase Figura 5.1). También, se mencionan los principios ópticos esenciales relacionados con el accesorio de ATR (por ejemplo, la ley de Snell), así como se muestran algunos diseños geométricos básicos. Además, se mencionan las características de los materiales con que se elaboran los cristales de interacción del ATR.



Figura 5.1. Un accesorio de ATR (a) y su versatilidad para el análisis de muestras en estado líquido (b) o sólido (polvos) (c).

5.2 Los accesorios de interacción

Los modos o accesorios para que suceda la interacción de la radiación infrarroja y la muestra son de varios tipos, y principalmente se conocen en función a la forma en que interactúa el haz de infrarrojo con la muestra y por lo tanto sus diseños geométricos y materiales son diferentes. Por ejemplo, los más comunes son los basados en fenómenos de reflexión difusa, reflexión total atenuada y de transmisión. En la Figura 5.2a-c se muestran gráficamente estos fenómenos. Este libro, al estar basado en el análisis de alimentos haciendo uso del accesorio de reflexión total atenuada más adelante se hablará más detalle de este diseño (Figura 5.2c).



Figura 5.2 Modos comunes de interacción entre una muestra y un haz de infrarrojo, (a) Reflexión difusa, (b) Transmisión y (c) Reflexión total atenuada.

El modo de transmisión es el más antiguo de los métodos de interacción y (Figura 5.2b) consiste básicamente en colocar la muestra (con un espesor relativamente delgado) de manera perpendicular al haz de infrarrojo, de esta manera el haz interactúa con la muestra al atravesarla. En el modo de reflexión difusa la muestra, generalmente dispersa en una matriz

transparente al infrarrojo (no absorbe radiación infrarroja), por ejemplo, polvo de bromuro de potasio (KBr), se coloca en un compartimiento donde el haz de infrarrojo interacciona en forma difusa (en varias direcciones) con la muestra dispersa en el KBr, para después salir en varias direcciones y concentrar la señal que se dirigirá hacia el detector del espectrómetro (Figura 5.2a). Estos dos modos de interacción mencionados han ido perdiendo relativamente popularidad en relación con el modo de ATR debido principalmente a la simplicidad del método y a la buena resolución de los espectros resultantes, independientemente del estado físico de la muestra. Esto no quiere decir que los modos de transmisión y de reflexión difusa dejen de utilizarse definitivamente para el caso de muestras alimenticias, ya que aún con las bondades de la técnica de ATR, hay que mencionar que es una medida superficial de las muestras.

5.3 Principios básicos de refracción y reflexión de la luz

5.3.1 El índice de refracción

En el vacío, la luz se propaga a una velocidad (c) de 299,792.458 m/s, mientras que, en cualquier otro medio, se propaga más lentamente. La relación entre c y la velocidad de la luz propagada en cualquier otro medio (v), se denomina índice de refracción (n) de esa sustancia, es decir:

$$n = c/v \tag{5.1}$$

Sí bien, la determinación del índice de refracción está influenciada por la temperatura y la longitud de onda de la luz emitida sobre una sustancia. En condiciones controladas de medición, es una propiedad constante para un material y permite determinar la pureza de una sustancia o cuantificar un compuesto en mezclas binarias de constituyentes conocidos. El índice de refracción se mide en un refractómetro normalmente a 20°C y a una longitud de onda de 589 nm. Actualmente la medición del índice de refracción de líquidos se determina de manera rápida y fácilmente. En cambio, para muestras sólidas es conveniente que ésta se fije en forma correcta en el porta-muestras del refracciómetro.

5.3.2 El índice de refracción de los alimentos

La mayoría de los alimentos fluidos frescos tienen un índice de refracción mayor al del agua (1.333), lo cual resulta obvio ya que todos estos alimentos poseen una buena cantidad de ella. Por ejemplo, la miel de abeja presenta un índice de refracción entre 1.491 y 1.486, ya que puede presentar valores de humedad cambiantes (16-24%) como consecuencia de las condiciones ambientales donde la producen las abejas. Las bebidas de sabor suelen tener un valor de índice de refracción por arriba de 1.333 en función de la cantidad de azúcar añadida.

Una solución de sacarosa al 95% en peso tiene un índice de refracción aproximadamente de 1.518. La leche fluida puede tener valores de índice de refracción también cambiantes y tiene en promedio un valor de 1.350. Por otro lado, un aceite comestible presenta un valor promedio de 1.460. Hay que hacer notar que los índices de refracción mencionados, los cuales aparecen muy frecuentemente en la bibliografía especializada, fueron calculados utilizando una luz en el rango del espectro visible (589 nm), no con radiación infrarroja, pero para fines prácticos pueden considerarse como valores aproximados del índice de refracción.

5.3.3 Ley de Snell

En la segunda década del siglo XVII el matemático y astrónomo holandés Willebrord Snell realizó trabajos sobre varios aspectos de geometría óptica. Sin embargo, no fue sino hasta 80 años después de la muerte de Snell, en el año de 1703, que el también holandés Christiaan Huygens publicó los resultados de Snell, entre los que se encuentran varios estudios sobre las leyes de la refracción, lo que le permitió encontrar lo que hoy en día se conoce como la ley de Snell.



Figura 5.3 Representación del fenómeno de refracción de la luz

La ley de Snell relaciona los índices de refracción de dos medios $(n_1 y n_2)$ con las direcciones de propagación de la luz en términos de los ángulos de la normal $(\theta_1 y \theta_2)$ (ver Figura 5.3), lo cual matemáticamente se puede representar como:

$$(n_1) \operatorname{sen} \theta_1 = (n_2) \operatorname{sen} \theta_2 \tag{5.2}$$

De acuerdo a la ley de Snell, es posible decir que mientras mayor sea el ángulo de incidencia, el ángulo de refracción será mayor. Sin embargo, hay un límite. Para cierto ángulo de incidencia, ahora llamado el ángulo crítico (θ_c), el ángulo de refracción es 90° y el rayo refractado se dirige a lo largo de la interface entre los medios (Figura 5.4).



Figura 5.4 Representación de un rayo refractado paralelo a la horizontal

Sí el ángulo de incidencia es mayor que el ángulo critico ($\theta_1 > \theta_c$), el rayo ya no se refracta, sino que ahora se refleja internamente, a esta condición se le llama reflexión interna total y se muestra gráficamente el fenómeno en la Figura 5.5.



Figura 5.5 Representación del fenómeno de reflexión interna total, donde el ángulo θ_1 es mayor que el ángulo crítico θ_c .

Utilizando la ley de Snell es posible encontrar una relación para generar la reflexión interna total. Y dado que $\theta_2 = 90^\circ$ y como sen $90^\circ = 1$, la ecuación (5.2) queda como sigue:

$$\operatorname{sen} \theta_1 = n_2/n_1 \tag{5.3}$$

Por lo tanto, si el ángulo de θ_1 es mayor al ángulo crítico (θ_c) se estará generando en la interfase de ambos medios, el fenómeno de reflexión interna total, es decir:

$$\theta_c = \operatorname{sen}^{-1}(n_2/n_1)$$
 (5.4)

La relación anterior es válida para cualquier tipo de radiación, sin embargo, cuando se utiliza una radiación infrarroja un fenómeno diferente sucede en la interfase (n_2/n_1) , lo cual es la clave del accesorio de ATR, es decir a cada reflexión de la radiación, una onda evanescente se forma en el medio de menor densidad óptica.

5.4 El fundamento del accesorio de ATR

Un accesorio comercial de ATR consta principalmente de un cristal de alto índice de refracción (n_1) , el cual no absorbe radiación infrarroja, donde se coloca la muestra a medir. En la Figura 5.6 se muestra el dibujo de un típico accesorio comercial de ATR. La muestra alimenticia, con índice de refracción n_2 , se coloca en contacto con la superficie del cristal. Entonces, la radiación infrarroja incide a través de cristal, y de ahí a la interfase (cristal-muestra), y enseguida una fracción de está radiación es la que penetra a la muestra (en forma de onda evanescente, e^{-1}), la cual parte de ella es selectivamente absorbida por la muestra a determinadas frecuencias, el resto de la radiación sale hacia el detector del espectrómetro [1-5] (Figura 5.6). Existen accesorios de ATR donde se originan varias reflexiones internas o solamente una sola reflexión internas, y su uso depende de varios factores, pero podemos decir que depende en gran medida de la capacidad de absorción de una muestra, lo cual redunda en la obtención de un espectro de calidad (picos bien definidos).



Figura 5.6 Representación del accesorio de reflexión total atenuada (ATR) y la forma en que interactúa la radiación infrarroja en la interfase cristal-muestra (I = radiación incidente, R = radiación reflejada). θ_c es el ángulo crítico.

Y de acuerdo a la ley de Snell, para que suceda entre la muestra y el cristal el fenómeno de reflexión interna se debe de cumplir la siguiente expresión matemática:

$$sen \ \theta_c > \frac{n_2}{n_1} \tag{5.5}$$

5.4.1 El fenómeno de la onda evanescente



Figura 5.7 Representación gráfica de una onda evanescente formada en la superficie del elemento óptico de mayor índice de refracción (n_2) en contacto íntimo con el elemento óptico de menor índice de refracción (n_1) .

Hemos visto que hay una condición para producir la reflexión interna total de la radiación cuando esta circula de un medio de alta densidad óptica a otro medio de baja densidad óptica. Sin embargo, cuando esta radiación es de naturaleza infrarroja se produce un fenómeno de suma importancia en la interfase de los dos cuerpos ópticos, es decir se genera una onda evanescente en el cuerpo de menor densidad óptica. En la Figura 5.7 se muestra esquemáticamente el principio de la onda evanescente. La onda evanescente puede ser descrita como un campo eléctrico, de la onda electromagnética, que permanece normal a la interfase de los medios ópticos y es el resultado de la interacción de los campos eléctricos de las ondas incidentes y reflejadas de la radiación infrarroja. La amplitud de la onda eléctrica (E) disminuye exponencialmente con la distancia desde la interfase y matemáticamente puede ser expresada como sigue:

$$E = E_0 e^{-(\frac{Z}{d_p})}$$
(5.6)

donde E_0 es la amplitud del campo eléctrico en la interfase (z = 0), z es la distancia desde la interfase y d_p es la profundidad de penetración. La distancia de penetración (d_p) está definida como la distancia donde la amplitud del campo eléctrico es e^{-1} de E_0 , es decir la intensidad de esta onda va decayendo a medida que se aleja de la interfase [4]. Una condición esencial para que se genere la onda evanescente es un eficiente contacto entre los dos cuerpos ópticos, en este caso el cristal y la muestra. La profundidad de penetración de la onda evanescente en la muestra puede ser expresada de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta_c - (n_2/n_1)^2}}$$
(5.7)

Como se puede apreciar en la ecuación anterior la profundidad de penetración (d_p) depende en gran medida de cada longitud de onda (λ) en el intervalo del infrarrojo medio y del índice de refracción del cristal del accesorio de ATR (n_1) y de la muestra (n_2) , así como del ángulo critico de incidencia de la radiación (θ_c) .

5.5. Geometrías de los accesorios de ATR

Actualmente en el mercado existen diversos accesorios de interacción para la técnica de FTIR-ATR, y básicamente la diferencia estriba en el diseño geométrico de los accesorios para el estudio de muestras en cualquiera de sus presentaciones, ya sea en forma de polvos, líquidos, geles, semisólidas o películas con aplicaciones en alimentos.

En la Figura 5.8 se muestra el accesorio horizontal de múltiples reflexiones internas. Este diseño tiene como desventaja principal el uso de una muestra representativa del alimento relativamente grande (a menudo no disponible en la investigación), ya que el espacio donde se coloca ésta sobre el cristal del ATR tiene una superficie extensa (Figura 5.8). Algunos accesorios de ATR tienen una superficie de hasta 40 cm².



Figura 5.8 Representación del típico accesorio horizontal de ATR (Múltiples reflexiones internas (I = radiación incidente, R = radiación reflejada).

En la Figura 5.9 se muestra el dibujo de un accesorio horizontal de una simple reflexión interna, el cual tiene un cristal, en promedio, de 1.8 mm de diámetro. Hoy en día este tipo de diseño es ampliamente utilizado, debido principalmente a que un ensayo necesita muy poca cantidad de muestra.



Figura 5.9 Representación del accesorio de ATR con una sola reflexión interna (I = radiación incidente, R = radiación reflejada).

Algunos modelos de accesorios de ATR de una simple reflexión interna vienen acompañados de una prensa, la cual permite un adecuado contacto entre el cristal y la muestra, tal y como se muestra en la representación de la Figura 5.10. En la Figura 5.11 se muestra un accesorio comercial de ATR de una simple reflexión interna con prensa (Modelo MIRacle, PIKE).



Figura 5.10 Representación gráfica del aseguramiento del contacto entre la muestra y el cristal de un accesorio de ATR.



Figura 5.11 Accesorio de ATR de una reflexión interna (Modelo MIRacle, PIKE).

Existen en el mercado otros tipos de geometrías, como son los accesorios de tipo cámara o cilíndricos, los cuales se muestran representados en la Figura 5.12. Estos diseños, generalmente, son utilizados para cuando se utiliza gran cantidad de muestra.



Figura 5.12 Representación del accesorio de ATR: (a) vertical o cámara y (b) cilíndrico o túnel (I = radiación incidente, R = radiación reflejada).

También, existen en el mercado accesorios de diseño especial, por ejemplo, en la Figura 5.13 se muestra esquemáticamente un accesorio de ATR de ángulo variable, el cual tiene un dispositivo que ajusta el ángulo de incidencia del haz de infrarrojo sobre la muestra.



Figura 5.13 Representación esquemática de un accesorio de ATR de ángulo variable. (I = radiación incidente, R = radiación reflejada).

5.6 Tipos de cristales de los accesorios de ATR.

Los cristales del accesorio de ATR están elaborados de distintos tipos de materiales. Sin embargo, el más comúnmente usado es el que está hecho de seleniuro de zinc (ZnSe) simple o reforzado con un recubrimiento de diamante [1]. La selección del material del cristal del accesorio depende de muchos factores a considerar, los cuales son el intervalo del espectro de infrarrojo de interés, la naturaleza del solvente a ser utilizado, el pH del sistema, y por último, su respectivo costo. En la Tabla 5.1 son mostradas las características de varios tipos de cristales comercialmente disponibles. Los modernos accesorios de ATR tienen la facilidad de cambiar el tipo de cristal.

Hay una serie de factores que pueden afectar el ensayo de FTIR-ATR y que se traducen en la obtención de un espectro de infrarrojo de una muestra [2-8]. A continuación, se describen algunos de ellos.

Material	n	Dureza (Kno op) ^a	ρ (g/cm ³)	Solubilidad (g/100g H ₂ O)	Pun to de fusión (°C)	Agente de limpieza	Rango de transmisión (cm ⁻¹) ^b
AMTIR	2.5	170	4.40	i	300	Alcohol, acetona, tolueno, agua.	11000-1000
CdTe	2.7	56	6.20	i	1040	Alcohol, acetona agua.	10000-500
Diaman te	2.4	7000	3.5	i	3500	Alcohol, acetona, agua.	4500-2500 1667-33
Ge	4.0	550	5.32	i	936	Alcohol, acetona, tolueno, agua.	5000-900
Cuarzo	1.4	174	2.6	i	1610	Alcohol, acetona, agua.	25000-2200 250-FIR
Zafiro	1.7	1370	4.00	i	2030	Alcohol, acetona, tolueno, agua.	33000 -28 00
Si	3.4	1150	2.33	i	1420	Alcohol, acetona, agua.	9500-1500 350-FIR
KRS-5	2.4	40	7.45	0.05	415	Metil etil cetona.	14000-400
ZnSe	2.4	137	5.27	i	1520	Alcohol, acetona, agua.	20000-700
ZnS	2.2	178	4.08	i	1830	Alcohol, acetona, agua.	14000-1000

Tabla 5.1 Propiedades físicas y químicas de cristales para ATR

^a kg/mm ² .

^b Rango de transmisión

El ángulo crítico: Aunque hoy en día los accesorios comerciales de ATR cuentan con cristales de alto índice de refracción y de buena resistencia mecánica, además de estar diseñados para que el ángulo de incidencia sea superior al ángulo crítico, este aspecto no parece afectar a un ensayo de FTIR-ATR de algún tipo de muestra hoy en día. Además, hay accesorios de ATR en donde es posible variar el ángulo de incidencia.

Calidad de contacto: Una condición básica para producir una buena interacción de la radiación infrarroja sobre la muestra es lograr un contacto eficiente entre ésta y el cristal del accesorio de ATR. Cuando se trata de una muestra líquida no hay problema, ésta se adhiere perfectamente, pero cuando la muestra es sólida o semisólida, o con forma irregular, se debe de asegurar un buen contacto mediante la aplicación de una presión efectiva, la cual frecuente se hace con una prensa que acompaña al accesorio de ATR.

Número de reflexiones internas: Actualmente en el mercado existen accesorios de ATR desde una reflexión interna hasta los diseñados con múltiples reflexiones internas. Obviamente el incremento del número de reflexiones internas aumenta en ese orden las veces en que interacciona la radiación de infrarrojo con la muestra. La selección del adecuado número de reflexiones estará dada por la capacidad que tenga la muestra para absorber la radiación infrarroja incidente, es decir sí el espectro de la muestra presenta las bandas de

absorción características y en forma clara. En la mayoría de las muestras a menudo con la aplicación del accesorio con una reflexión interna es suficiente, pero todo dependerá de la concentración relativa del o los compuestos que absorben la radiación infrarroja. Sí las bandas en un espectro son débiles, entonces es recomendable utilizar un accesorio de múltiples reflexiones internas para mejorar la intensidad de las bandas espectrales.

Características del cristal del accesorio: Comercialmente existen diferentes tipos de cristales del accesorio de ATR. Estos cristales tienen la propiedad de no absorber radiación infrarroja. Las principales características de los cristales es su alta densidad óptica y están hechos de materiales de alta dureza que soportan amplios intervalos de pHs. Actualmente se utiliza ampliamente el cristal de ZnSe con o sin recubrimiento de diamante.

5.7 Ventajas del accesorio de ATR con relación a los modos de transmisión y reflexión difusa



Figura 5.14 Representación esquemática de las desventajas de las técnicas de reflexión difusa y transmisión. Estos efectos pueden ser minimizados utilizando la técnica de ATR.

64

Hoy en día, quizá una de las causas de la popularidad del método de ATR es el hecho que los espectros puedan ser obtenidos a partir de muestras en cualquier forma física, a parte de los líquidos, es decir gases, líquidos turbios, muestras en polvo o en forma de películas delgadas. Estas muestras pueden ser consideradas como "problemáticas", ya que algunas veces presentan una alta capacidad de absorción y/o presentan propiedades de alta dispersión (*scattering*) de luz (Figura 5.14), lo que origina espectros de mala calidad, por ejemplo, picos de absorción poco intensos [9, 10].

De hecho, como hemos mencionado tradicionalmente para este tipo de muestras (en polvo o en películas delgadas) se han utilizado por muchos años los modos de medición de transmisión y reflexión difusa. Sin embargo, sí se utiliza el accesorio de ATR para esta muestra "problemática" es posible que no se presenten problemas de dispersión o de alta absorción debido a que el haz de infrarrojo penetra en forma tenue (atenuada) y en varias ocasiones (múltiples reflexiones internas). La forma atenuada minimiza los problemas provocados por la dispersión y a la alta capacidad de absorción de una muestra se compensa al interactuar en forma de reflexión repetidamente la radiación en ella. Otra gran ventaja de la técnica de ATR respecto a transmisión y reflexión difusa, es el hecho de que, en estas técnicas, en primer lugar, se debe de diluir una muestra en polvo con una muestra de sal trasparente al infrarrojo (por ejemplo, el KBr) y obtener mediante una prensa un disco o un pellet. Una ventaja del accesorio de ATR respecto al de transmisión es el resultado del tamaño del espesor de la muestra, es decir sí una muestra es demasiado gruesa la mayoría de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra, provocando que solamente una pequeña fracción de la radiación llegue al detector del equipo, lo cual genera como resultado espectros con picos de absorción poco claros e intensos.

Referencias

- 1. Anónimo. (2011). ATR-Theory and applications. Application note-PIKE Technologies.
- 2. Swathi, S., Srikanth, S., Maheswara, Rao, V. U., Attenuated total reflectance spectroscopy: A overview, International Journal of Pharmaceutical Research and Analysis, **4**, 229-236 (2014).
- 3. Hind, A., R., Bhargava, S. K., Mckinnon, A., At the solid/liquid interface: FTIR/ATR-the tool of choice, Advances in Colloids and Interface Science, **93**, 91-114 (2001).
- 4. Stuart, B., Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England (2004).
- 5. Harrick, N. J., Internal reflection spectroscopy, Wiley, New York, USA (1967).
- 6. Rodríguez-Saona, L. E., Allendorf, L. E., Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food, Annual Review of Food Science and Technology, **2**, 467-483 (2011).
- 7. Zhang, Z., Ewing, G. E., Attenuated partial internal reflection infrared spectroscopy, Analytical Chemistry, **74**, 2578-2583 (2002).
- 8. Vigano, C., Ruysschaert, J. M., Goormaghtigh, E., Sensor application of attenuated total reflection infrared spectroscopy, Talanta, **65**, 1132-1142 (2005).
- 9. Hartman Kok, P. J. A., Kazarian, S. G., Briscoe, B. J., Lawrence, C. J., Effect of particle size on near-wall depletion in mono-dispersed colloidal suspensions, Journal of Colloids and Interface Science, **280**, 511-517 (2004).

10. Coates, J., Interpretation of infrared spectra, a practical approach, Encyclopedia of Analytical Chemistry. R. A. Meyers (Ed.), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 10815-10837 (2000).

Capítulo 6. Análisis de los espectros de infrarrojo

6.1 Introducción

Una vez que el espectro de infrarrojo fue obtenido, el siguiente paso es su interpretación. Para lograr una buena interpretación una serie de pasos generales son recomendados, si bien no puede tomarse como una regla general, pero pueden ser de gran ayuda la mayoría de las ocasiones, sobre todo para quién interpreta por primera vez un espectro de infrarrojo.

6.2 El espectro de infrarrojo y sus zonas características

El resultado que se obtiene de un análisis de espectroscopia de infrarrojo está dado por un espectro de infrarrojo. En la Figura 6.1 están mostradas las zonas principales de un espectro de infrarrojo, y como ejemplo tenemos el espectro de una muestra de miel de abeja.



Figura 6.1 Espectro de infrarrojo de la miel de abeja

En el eje de las X's se encuentra indicada la intensidad de la radiación infrarroja, en número de onda (cm⁻¹) y en el eje de las Y's se encuentra indicada la intensidad de radiación infrarroja absorbida. Como se puede observar en la figura, el espectro consta de una serie de picos (bandas) de absorción, o simplemente picos, los cuales, como en este ejemplo, se ubican a diferentes posiciones y tienen alturas y anchuras diferentes. Obviamente, la composición mayoritaria de la miel de abeja se ve reflejada en el espectro. La miel de abeja es rica en agua y en carbohidratos (azúcares) y sus picos asociados a estos componentes se encuentran señalados en el espectro. En forma general, un espectro de infrarrojo se divide en dos partes. La primera, entre 4000 y1500 cm⁻¹, la cual se conoce como la región de huella digital. En esta región los picos provienen de vibraciones de enlaces presentes en las moléculas consideradas como grupos funcionales [2]. Los picos que aparecen en la región comprendida entre 1500 y 500 cm⁻¹, llamada región de huella digital, son generados por varias vibraciones de enlace presentes en la estructura (o esqueleto) de la (s) molécula (s), de ahí el nombre de huella digital al provenir de estructuras únicas de cada molécula o grupo de moléculas [3].

6.3 Guía general para la interpretación de un espectro

Una vez obtenido el espectro de una muestra, el paso siguiente es la interpretación de las bandas que lo forman. A menudo suele ser relativamente complicado, sobre todo para los estudiantes que apenas comienzan a utilizar esta técnica. Sin embargo, existen algunas reglas y consejos útiles que pueden ayudar.

6.3.1 La región de los grupos funcionales.

Un grupo funcional es aquel que absorbe radiación en un intervalo especifico de frecuencias, independientemente a que este unido en una molécula. Es decir, la banda que se genera en un espectro se ubica siempre en la misma zona. Hoy en día, a través de libros, revistas o bibliotecas digitales (software) se han ido acumulando tablas de referencias de distintos grupos funcionales, lo cual facilita su búsqueda y comparación.

CONSEJO: El conocimiento teórico de la naturaleza del compuesto o los compuestos (por ejemplo: carbohidratos, lípidos o proteínas) de la muestra ensayada será de mucha utilidad para la interpretación de las bandas del espectro resultante.

Además de los grupos funcionales, existen varias regiones importantes en un espectro, en donde se presentan bandas de absorción características de muchos compuestos.

La región de los grupos funcionales comprendida entre 4000 y 1500 cm⁻¹ puede ser divida en tres zonas con el propósito de facilitar la identificación de un espectro (ver Figura 6.2).

6.3.1.1 La región de 4000-2500 cm⁻¹.

Las bandas que aparecen en esta región se encuentran relacionadas con enlaces de estiramiento de O-H, C-H y N-H. El enlace O-H, del agua, genera una banda muy amplia y alta entre 3500 y 3200 cm⁻¹. La banda de este mismo enlace, pero ubicado en otra molécula, tiene una apariencia puntiaguda y poco intensa. El enlace de estiramiento C-H aparece entre la región de 3400 y 3200 cm⁻¹ con una apariencia menos amplia que el enlace O-H del agua. Entre 3000 y 2800 cm⁻¹ aparecen bandas ligadas al enlace de estiramiento C-H.

CONSEJO: El agua es un compuesto presente en la mayoría de los alimentos, por lo tanto, si la muestra tiene residuos, en esta zona se presenta una banda ancha alrededor de 3500-3200 cm⁻¹, la cual se debe a vibraciones de estiramiento del enlace O-H.

6.3.1.2 La región de 2500-2000 cm⁻¹.

A menudo en esta región en un espectro no aparecen bandas, y en caso, de que llegaran a aparecer tienen una apariencia muy débil, y frecuentemente no son relevantes para la interpretación de un espectro. Por lo tanto, se recomienda hacer énfasis en la interpretación de otras bandas del espectro. En caso, de aparecer tales bandas, estas tienen su origen en enlaces triples, por ejemplo, C=C, C=O o C=N.

6.3.1.3 La región de 2000-1500 cm⁻¹.

En esta región, también llamada de los dobles enlaces, principalmente aparecen los enlaces de vibración C=C y C=O. La banda asociada con el enlace C=O es intensa y aparece, y dependiendo del compuesto, entre 1830 y 1650 cm⁻¹, por ejemplo, en esta región se encuentra el grupo carbonilo C=O. En las proteínas, el grupo amida (C=O) aparece alrededor de 1650 cm⁻¹. El enlace C=N suele aparecer en esta región, pero a menudo la banda no es muy intensa.

CONSEJO: El agua es un compuesto presente en la mayoría de los alimentos, por lo tanto, si la muestra tiene residuos, en esta zona se presenta una banda ancha alrededor de 1650 cm⁻¹, la cual se debe a vibraciones de estiramiento del enlace H-O-H. En esta zona la presencia de esta banda puede ocultar la presencia de otras.

6.3.2 La región de huella digital (1500-600 cm⁻¹).

Las bandas que aparecen en esta región son producto de varios tipos de vibraciones de enlace, por lo cual a menudo es difícil de asignar su origen a una banda en particular. Además, estas vibraciones de enlace originan una fuerte interacción entre enlaces vecinos. Pero, gracias a esta complejidad, cada muestra tendrá un muy particular espectro, por lo que esta región de un espectro se le conoce con el nombre de "huella dactilar".

CONSEJO: La región de huella digital en muchos espectros es muy importante, ya que permite su identificación en forma rápida y clara. Por ejemplo, en la familia de los carbohidratos aparece un pico muy alto ente los 1100 y 1000 cm⁻¹, el cual cambia de posición en función del tipo específico de carbohidrato ensayado.



Figura 6.2 Representación general de los tipos de enlaces que aparecen en distintas regiones de un espectro de infrarrojo.

6.4 Análisis de espectros de FTIR-ATR de muestras alimenticias

En la Figura 6.3 se muestran las regiones espectrales donde aparecen las bandas asociadas con los componentes mayoritarios en los alimentos (proteínas, carbohidratos y lípidos). También se muestra en la figura la posición de las bandas del agua, compuesto que aparece casi siempre en los alimentos [2-5].



Figura 6.3 Resumen de las regiones de principales bandas de absorción originadas por los compuestos mayoritarios en alimentos.

Esta Figura puede ser de mucha utilidad sobre todo para quién se inicia en el estudio de alimentos utilizando la espectroscopia de FTIR. Además, se pueden observar la interferencia que eventualmente podría llevarse a cabo, las cuales pueden dificultar la asignación de las bandas de absorción en alimentos donde predominen dos o más compuestos mayoritarios presentes en la muestra.

En la Figura 6.4 son mostrados ejemplos de espectros FTIR del agua y de muestras ricas en proteínas, carbohidratos y lípidos. En esta figura es posible observar la diferencia en posición, forma e intensidad en sus respectivas bandas de absorción.


Figura 6.4 Espectros de infrarrojo de muestras de agua y ricas en proteína (carne seca), carbohidrato (sacarosa) y lípido (aceite vegetal).

6.5 Factores que afectan la calidad de los espectros

La obtención de un espectro de infrarrojo de calidad, esto es, que sus picos sean lo más claros (por ejemplo, su altura) y representativos de la muestra ensayada, puede ser afectada por una serie de factores que a continuación se detallan.

6.5.1 Calidad del contacto entre la muestra y el cristal del ATR

Para la obtención de espectros de FTIR de muestras alimenticias en estado sólido (polvos o películas) usando el accesorio de ATR es necesario asegurar un adecuado contacto de la muestra con el cristal de reflexión de la radiación infrarroja con el propósito de obtener un espectro de calidad, es decir con las bandas características de la muestra bien definidas. La forma normal de asegurar un buen contacto de la muestra con el cristal es mediante la

71

aplicación de una presión sobre ella utilizando una prensa, la cual empuja y presiona a la muestra hacia el cristal, y mantiene a la muestra en contacto íntimo con el cristal durante el tiempo de la medición (Figura 6.5).



Figura 6.5 Representación gráfica del aseguramiento del contacto entre la muestra y el cristal de un accesorio de ATR.



Figura 6.6 Espectro de FTIR de una muestra de perejil en polvo en donde se observa el efecto de la intensidad de la presión aplicada sobre la muestra colocada en el accesorio de ATR

Cuando la muestra es un polvo, es importante mencionar, que buen contacto de la muestra con el cristal se logra de mejor manera si el polvo se pulveriza hasta obtener un polvo lo más fino posible. En la Figura 6.6 se muestra el efecto de la intensidad de presión ejercida sobre una muestra de polvo fino de perejil en la calidad del espectro de FTIR obtenido. En esta figura se pueden observar claramente los contrastes espectrales entre la muestra sin presión alguna y la muestra con un incremento progresivo de la presión ejercida.

Actualmente hay accesorios de ATR que cuentan con una prensa integrada, incluso es posible controlar la cantidad de presión aplicada sobre la muestra. Hay también prensas que no cuentan con el dispositivo para controlar el nivel de presión deseada, pero dependerá del tacto del analista el nivel de presión adecuada sobre la muestra, cuyo espectro obtenido dará la pauta para aumentar o disminuir el nivel de presión. Además, se debe de tener cuidado de no exceder el límite de presión que pueda dañar al cristal del accesorio de ATR.

6.5.2 Influencia de la forma física de la muestra

En la Figura 6.7 se observan los espectros de FTIR de una muestra de sacarosa en forma de polvo fino y de una muestra de sacarosa en solución acuosa. En el espectro de muestra acuosa se pueden observar perfectamente las bandas asociadas con el agua, así como la posición de las bandas provenientes del azúcar. Sin embargo, en el espectro de la muestra en polvo hay más bandas asociadas con la sacarosa, principalmente en la región comprendida entre 1500 y 700 cm⁻¹. Si comparamos esta región espectral con el espectro de la solución, se puede observar que banda del agua, ubicada aproximadamente a 1650 cm⁻¹, "levanta" al espectro en dicha región, provocando que las bandas sean menos intensas e incluso al final de la mencionada región ya no se puede apreciar ninguna clase de pico.



Figura 6.7 Espectros de FTIR de muestras de sacarosa, (a) en forma de polvo fino y (b) en solución acuosa

En la región comprendida entre 3700 y 2800 cm⁻¹ de los espectros de la Figura 6.7 se puede observar en forma clara la diferencia entre una señal de un O-H proveniente del agua y de otro procedente de un azúcar, el primero es una banda ancha y elevada, mientras que el segundo es una banda relativamente poco ancha y pequeña.

Los alimentos preferentemente se pueden encontrar en forma sólida, líquida o semi-líquida. Para realizar un análisis de FTIR en un alimento dependerá del objetivo planteado para convertir, por ejemplo, una muestra liquida a muestra en polvo. Ya que algunas veces una muestra líquida podría dar una señal espectral acorde con nuestras expectativas, es decir la interferencia que provoca el agua contenida en la muestra no es de vital importancia, como sucede frecuentemente en una muestra de la familia de los carbohidratos, cuyas bandas principales de absorción de manera general aparecen en diversas posiciones en la región del espectro comprendidas entre 1500 y 700 cm⁻¹.

6.5.3 Señal residual del *background* en el espectro



Figura 6.8 Espectro de FTIR de fructanos de agave (*Tequilana Weber var. azul*) en donde se muestra la señal residual proveniente del aire ambiente, (a) muestra en polvo y (b) muestra líquida

Desde hace tiempo, y en función de los modernos equipos de cómputo acoplados a los espectrómetros el *background* se resta automáticamente del espectro de FTIR de la muestra, y con ello se elimina la interferencia natural que tiene el haz de infrarrojo con el aire ambiente cada vez que se realiza la obtención de un espectro de FTIR de una muestra.

De hecho, en algunos espectros de FTIR, obtenidos utilizando el accesorio de ATR, a menudo permanecen señales del *background*, principalmente alrededor de los 2300 cm⁻¹ (del CO₂) sobre todo en muestras en forma de polvo, tal y como se puede observar en la Figura 1, debido principalmente a que parte del CO₂ queda "atrapado" entre las partículas de la muestra del polvo colocado en el accesorio de ATR. Caso contrario cuando se utiliza una muestra en

forma líquida sobre el cristal del accesorio de ATR, existe menor posibilidad de que el aire quede "atrapado" en la muestra, y por lo tanto la señal proveniente del CO₂ sea más pequeña (Figura 6.8).

6.5.4 La interferencia del solvente en un espectro

Los alimentos en estado líquido o semilíquido presentan un espectro de FTIR influenciado grandemente por el solvente, preferentemente debido al agua o por el etanol presente en las bebidas alcohólicas. La influencia de este tipo de solventes en muchos casos puede "tapar" todo rastro de otros compuestos (a menudo en bajísimas concentraciones) presentes en una muestra o dificultar la identificación de sus picos de absorción. En la Figura 6.9 se muestra el caso de una solución de sacarosa en agua, en donde se puede observar la dificultad para observar las bandas de absorción del azúcar, sobre todo cuando se encuentra la sacarosa en baja concentración. Cuando la solución se encuentra a una mayor concentración de azúcar, se pueden observar los picos de absorción con mucha mayor facilidad.



Figura 6.9 Espectros de FTIR de muestras de diferentes concentraciones (en peso) de sacarosa en solución acuosa.

Para el caso de una bebida alcohólica, en este caso tequila, su espectro de FTIR prácticamente es una combinación de bandas de absorción generadas por la presencia de agua y etanol presentes en la muestra, no hay evidencia de algún otro tipo de componente en el espectro de una bebida alcohólica, tal y como se muestra en la Figura 6.10.



Figura 6.10 Espectros de FTIR de tequila (a) y etanol puro (b)

6.6 Tratamiento de los espectros obtenidos

Hoy en día existen muchas técnicas de análisis disponibles para mejorar la interpretación de espectros de FTIR. A menudo los espectrómetros son manejados a través de un software de computadora. Este software tiene varias instrucciones para ayudar a resolver un espectro ya sea para un análisis cualitativo o cuantitativo. A continuación, se presentan los tratamientos para mejorar la resolución de los espectros que son los más frecuentemente utilizados [6-8].

6.6.1 Suavizado (smoothing)

El "ruido" puede ser reducido de un espectro de FTIR mediante un proceso de suavizado. El origen del ruido puede ser debido a varios aspectos, pero con frecuencia aparece más notoriamente en muestras en polvo como consecuencia principalmente de un deficiente contacto con el accesorio de ATR.

76





Figura 6.11 Suavizado correcto de espectro de FTIR. (a) espectro original, (b) espectro suavizado correctamente



Figura 6.12 Suavizado incorrecto de espectro de FTIR. (a) espectro original, (b) espectro suavizado incorrectamente

La eliminación del ruido de un espectro puede ser moderado o excesivo, pero debe de cuidarse el no afectar los picos originales y bien definidos del espectro (Figura 6.11) y ocasionar el efecto de "sobre-suavizado", es decir la eliminación de picos importantes presentes en el espectro original (Figura 6.12).

6.6.2 Sustracción de espectros

Este método consiste en extraer del espectro original de la muestra, la cual está formada por multi-componentes, el espectro de uno de los componentes individuales presentes en la muestra, y cuya señal a menudo puede obstruir bandas relacionadas con los otros componentes. El resultado de la sustracción es un espectro de FTIR sin la señal del componente sustraído. En la investigación de alimentos uno de los componentes que con frecuencia se extrae del espectro de FTIR obtenido es el agua, de esta manera se obtiene un espectro construido solamente por los componentes restantes de la muestra (Figura 6.13).



Figura 6.13 Espectro de FTIR sin (a) y con (b) substracción del espectro del agua

6.6.3 Transformación por derivadas

Este método se utiliza para mejorar la resolución de bandas obtenidas en un espectro de FTIR. Se utilizan los procedimientos de la primera y segunda derivada. La primera derivada provoca en una banda un incremento mejorando su observación (Figura 6.14a). La segunda derivada origina, para cada banda u hombro en el espectro de FTIR, bandas negativas, lo que mejora su resolución (Figura 6.14b). La ventaja del ajuste por derivadas se puede apreciar de mejor manera en espectros complejos de FTIR en donde se dificulta su interpretación cualitativa.



Figura 6.14 Efecto del ajuste en un espectro original (a) de FTIR utilizando el método de la primera derivada (b) y el de la segunda derivada (c).

6.6.4 Transformación por curvas gaussianas



Figura 6.15 Representación de un ajuste de curva de un pico extraído de un espectro. En este ejemplo se pueden observar dos curvas gaussianas resultantes.

El análisis del valor del área bajo la curva, es deseable cuando hay solapamiento de picos en grado extremo, el cual se puede realizar con una metodología de ajuste de curvas. Generalmente, la metodología de ajuste implica la selección del número de onda de los picos involucrados, a menudo utilizando el procedimiento de la segunda derivada (picos hacia abajo) y utilizar un programa adecuado (software) para determinar las curvas que se ajustan al solapamiento de curvas mostrado en el espectro original. Un método muy popular es el ajuste por gaussianas por medio de un software. En la Figura 6.15 se muestra un ejemplo de ajuste por gaussianas, cuyo valor del área bajo su curva se obtiene automáticamente.

6.7 Identificación de grupos funcionales

Un grupo funcional es un tipo de enlace atómico que caracteriza a una clase de compuesto químico. Cada grupo funcional determina las propiedades químicas específicas de cada una de las sustancias que lo poseen, en otras palabras, determina su función química. Como ya hemos mencionado, en un espectro de FTIR-ATR existe una región, entre 4000 y 1500 cm⁻¹, denominada como región de los grupos funcionales, por lo tanto, en esa zona es posible identificar picos provenientes de grupos funcionales [2]. En la Figura 6.16 pueden ser observados espectros FTIR-ATR de tres tipos de alimentos: aceite vegetal, carne seca (proteína) y pectina, en donde se señalan los grupos funcionales de cada una de estas muestras.



Figura 6.16. Espectros FTIR-ATR de muestras de pectina (a), aceite vegetal (b) y carne seca (proteína) (c). En los espectros se indica el grupo funcional de cada producto.

Referencias

1. Coates, J., Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry. R. A. Meyers (Ed.), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 10815-10837 (2000).

2. Stuart, B., Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, England (2004).

3. Berthomieu C., Hienerwadel R., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, Photosynthesis Research, **101**, 157-170 (2009).

4. Bureau, S., Cozzolino, D., Clark, C. J., Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review, Postharvest Biology and Technology, **148**, 1-14 (2019).

5. Larkin, P. J., Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation, 2 edn. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (2018).

6. Jackson, M., Mantsch, H. H., The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, **30**, 95-120 (1995).

7. Tatulian, S. A., Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Method of Choice for Studying Membrane Proteins and Lipids, Biochemistry, **42-41**, 11898-11907 (2003).

8. Carbonaro, M., Nucara, A., Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region, Amino Acids, **38**, 679-690 (2010).

Capítulo 7. La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas

7.1 Introducción.

Actualmente, las empresas productoras de alimentos y bebidas ponen importante énfasis en el control de los ingredientes que componen sus productos finales, desde las materias primas utilizadas, hasta la información oportuna y confiable en cada una de las etapas de proceso con relación a las transformaciones químicas o fisicoquímicas que tienen lugar en los diferentes ingredientes que participan en la elaboración del producto final obtenido. Los componentes mayoritarios presentes en los alimentos, tales como el agua, los carbohidratos, las proteínas o los lípidos son habitualmente medidos para establecer intervalos de control en la elaboración de algún tipo de producto. Hoy en día, la modernidad en la que vivimos hace que la rapidez en la obtención de información para la toma de decisiones optimas y confiables, casi en cualquier actividad en la que se encuentre involucrado, adquiere una gran importancia. En el contexto de la medición y análisis de los alimentos o bebidas, la técnica de FTIR-ATR proporciona una buena alternativa para la detección de los componentes mayoritarios en un producto, de manera rápida, confiable y efectiva. En este apartado se muestran los espectros de infrarrojo característicos del agua, carbohidratos, lípidos y proteínas. Para cada componente mayoritario se podrán observar en sus respectivos espectros, cuáles son los picos característicos más importantes que los caracteriza. Además, en este apartado son mostrados espectros de mezclas de componentes mayoritarios y su respectiva interpretación. También, se hace énfasis en algunos conceptos teóricos que serán de mucha ayuda en la interpretación de los picos espectrales, particularmente en el caso de agua y la influencia que tienen los enlaces por puentes de hidrógeno en su espectro de infrarrojo. Por otro lado, en la parte del análisis de los espectros de las proteínas, se muestra la determinación de la estructura secundaria utilizando el artificio matemático de transformación por Gaussianas, metodología que es de amplia utilización en la actualidad.

7.2 El espectro FTIR-ATR del agua

Este capítulo comienza analizando el espectro de infrarrojo del agua, ya que este compuesto se encuentra presente casi siempre en los alimentos, ya sean estos naturales o procesados, y obviamente, en las bebidas en forma mayoritaria. Por lo tanto, a menudo se encuentran, en

83

mayor o en menor medida, señales espectrales de agua en los espectros obtenidos en alimentos sólidos o semisólidos. En esta sección es mostrado el espectro de infrarrojo del agua y la influencia marcada que tienen los puentes de hidrógeno en su configuración. El espectro de infrarrojo del agua presenta dos picos notables, uno alrededor de los 1645 cm⁻¹ y otro pico muy intenso y ancho ubicado alrededor de los 3350 cm⁻¹ [1]. Quizá, el espectro del agua es el más conocido por su sencillez (solamente dos picos destacados). En esta sección, también son mostrados ejemplos de espectros de infrarrojo de alimentos ricos en agua, con su interpretación incluida.



Figura 7.1 El espectro de FTIR-ATR del agua

En la Figura 7.1 se muestra el espectro de FTIR del agua pura, quizá sea el espectro más conocido en el campo de la espectroscopia de infrarroja. El espectro del presenta dos picos perfectamente observables, uno grande a la derecha y otro de menor intensidad en la parte izquierda.

En el espectro de FTIR del agua en torno a los 3350 cm⁻¹aparece un pico ancho e intenso, el cual está asociado con la vibración del enlace O-H. Un segundo pico se puede observar alrededor de 1645 cm⁻¹, el cual está asociado con la vibración del enlace H-O-H. Sin embargo, la intensidad del pico ubicado a 3350 cm⁻¹ se encuentra influenciado por otro tipo de O-H diferente al de la molécula del agua: el O---H producido por los enlaces puentes de hidrógeno que se generan al interactuar entre sí las moléculas de agua. Este tipo de interacción electrostática entre el protón del oxígeno y la región negativa del átomo de oxígeno (ver Figura 7.2), presenta una fuerza de interacción relativamente alta (O---H), la cual al generarse en forma instantánea millones y millones de veces, y casi al mismo tiempo desintegrarse, contribuye de manera notable al incremento del pico en el espectro al interactuar con la radiación infrarroja.



Figura 7.2 Representación del enlace puente de hidrógeno producido en una molécula de agua.

Hay que hacer notar, que, aunque la interacción por puentes de hidrógeno forma un enlace no covalente (O---H), por lo tanto, su energía de interacción (no de enlace) es mucho menor que la mostrada por el enlace covalente (O-H) en la molécula de agua, y aunque la interacción O---H no tiene un momento dipolar activo, como el O-H, sí es activa a la radiación infrarroja y la absorbe a la misma frecuencia (~ 3350 cm⁻¹) que el O-H de la molécula del agua, de ahí que se sumen sus efectos de absorción. Ahora bien, suponiendo que los enlaces O-H de la molécula del agua, sin la presencia de enlaces puentes de hidrógeno, en el espectro de infrarrojo, alrededor de 3350 cm⁻¹, se podría observar, hipotéticamente, un pico mucho más bajo, pero puntiagudo (ver Figura 7.3), claro esto es improbable que suceda, pero al menos nos da una idea de la gran influencia que tienen los enlaces puentes de hidrógeno en una molécula de agua, aspecto que es notorio en el espectro de FTIR del agua.



Figura 7.3 Espectro de infrarrojo del agua y la forma del espectro sin interacciones puentes de hidrógeno (3700-2750 cm⁻¹).



7.3 El espectro del agua contenida en los alimentos

En la Figura 7.4 se presentan espectros de FTIR de varios alimentos ricos en agua, tales como leche, naranjada o refresco de cola. Como es posible observar, los espectros son muy parecidos. En estos espectros se puede observar perfectamente las bandas correspondientes al agua, de hecho, solamente en la parte izquierda del espectro se pueden observar bandas que son pertenecientes a carbohidratos (azúcares) y los cuales son compuestos en solución mayoritarios presentes en cada una de las muestras alimenticias analizadas.



Figura 7.4 Espectros de FTIR-ATR de muestras de alimentos ricos en agua



En la Figura 7.5 se pueden apreciar en el espectro de FTIR de la miel de abeja que tiene en promedio alrededor de 20% de agua en peso y cerca de 70% de azúcares (principalmente fructosa y glucosa), y cuyas bandas asociadas a estas sustancias aparecen en forma notoria en la parte izquierda del espectro. La Figura 7.6 muestra un espectro de FTIR proveniente de una muestra alimenticia sólida (tortilla de maíz), en donde se puede observar de manera clara sus picos característicos asociados con la molécula del agua.



Figura 7.5 Espectro de FTIR-ATR de miel de abeja



Figura 7.6 Espectro de FTIR-ATR de tortilla de maíz

87

Por último, es conveniente mencionar que los picos del agua en un espectro, provenientes de una muestra alimenticia diluida o con poca cantidad de agua, pueden solapar otros picos de interés de la muestra en cuestión, sobre todo el pico ubicado a 1645 cm⁻¹, aunque también lo hace el pico del agua ubicado alrededor de 3350 cm⁻¹. Por ejemplo, en el caso de muestras ricas en proteínas, cuyos picos característicos de interés aparecen alrededor de 1645 cm⁻¹, residuos de agua en la muestra resulta perjudicial, tal y como se menciona con detalle más adelante. Sin embargo, también se puede decir que el agua prácticamente afecta a todo el espectro de FTIR de una muestra, ya que literalmente "levanta" el espectro de una muestra que la configuración de los picos cambie en amplitud.



Figura 7.7 Secuencia de eliminación de los picos del agua de un espectro FTIR-ATR de miel de abeja, (a) espectro original de miel de abeja, (b) espectro del agua y (c) espectro de miel de abeja con sustracción espectral del agua.

La señal del agua en los espectros de infrarrojo de los alimentos es común. Sin embargo, es posible eliminar los picos característicos del agua, con el propósito de desenmascarar picos provenientes de otros componentes de la misma muestra, por ejemplo, carbohidratos o proteínas. Actualmente se realiza, en pocos segundos, siguiendo las instrucciones del software de operación del espectrómetro utilizado. En la Figura 7.7 se muestra la secuencia espectral antes y después de la sustracción del espectro del agua del espectro de una miel de abeja. En el espectro después de la sustracción es posible observar picos más intensos y definidos provenientes de los azúcares de la miel de abeja, principalmente en la región comprendida entre 1000 y 600 cm⁻¹. También, el pico ubicado alrededor de 2800 cm⁻¹ aparece con mejor resolución. En el espectro sustraído, en el lugar de los picos del agua, se pueden observar picos más pequeños e invertidos, esto significa que la miel de abeja tiene menos agua (alrededor de 20% en peso), y, por lo tanto, la intensidad de sus picos asociados con ella es menor, en comparación a la intensidad de los picos del espectro del agua pura.

7.4 El análisis de los carbohidratos por FTIR-ATR

7.4.1 Introducción

Los carbohidratos son un amplio grupo de moléculas formadas principalmente por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Los carbohidratos son uno de los principales componentes que se encuentran presentes en los alimentos, ya sea naturales o procesados. Existen diferentes tipos de carbohidratos, los cuales han sido clasificados como azúcares, almidones, pectinas, celulosas, etc. En la Figura 7.8 se muestran algunos ejemplos de representaciones estructurales de carbohidratos (glucosa y sacarosa). En el campo de la espectroscopia de infrarrojo, los espectros de los carbohidratos presentan una característica muy particular: en una muestra de carbohidratos diluida en agua, siempre aparece un pico intenso (o dos, algunas veces), el cual se encuentra ubicado entre 1200 y 900 cm⁻¹. Pero, dependiendo de la muestra del carbohidrato en cuestión, el pico máximo se encontrará ubicado a una específica frecuencia, perfectamente distinguible en comparación al que aparece en los espectros de otros tipos de carbohidratos.



Figura 7.8 Tipos de carbohidratos (moléculas de glucosa y sacarosa)

7.4.2 El espectro de los carbohidratos

En las Figura 7.9 se pueden observar espectros de FTIR de tres tipos diferentes de carbohidratos en polvo. En esta figura se puede apreciar perfectamente que la región a la derecha del espectro, ubicada en el intervalo entre 1200 y 750 cm⁻¹, presenta una serie de picos intensos, pero que difieren en posición al hacer una comparación entre ellos.



Figura 7.9 Espectros de FTIR-ATR de varios tipos de carbohidratos en polvo: (a) sacarosa, (b) pectina y (c) almidón de maíz.



Figura 7.10 Espectros de FTIR-ATR de estándares de diferentes tipos de azúcares disueltos en agua entre el intervalo de 1800 y 800 cm⁻¹, después de la sustracción del espectro del agua. En la Tabla 1 se muestra la asignación de los principales picos. Nótese la diferencia en la posición de los picos máximos en los espectros.



En la Figura 7.10 son mostrados los espectros de FTIR-ATR de muestras acuosas de cuatro tipos de azucares y en la Tabla 1 se indican las asignaciones de sus principales picos en el intervalo comprendido entre 1800 y 800 cm⁻¹. En estos espectros es posible observar las diferencias en la posición de sus picos más intensos: fructosa (1054 cm⁻¹), glucosa (1028 cm⁻¹), maltosa (1024 cm⁻¹) y sacarosa (991 cm⁻¹).

Tabla 7.1 Asignación de picos en espectros de FTIR de varios estándares de azúcares disueltos en agua en el intervalo entre 1800 y 800 cm⁻¹ (Figura 7.10) [2-6].

Azúcar	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación del pico
Glucosa	1433	C-H y O-H, flexión
Maltosa	1362	O-H, estiramiento
Fructosa	1343	O-H, flexión
Sacarosa	1265	C-H, flexión
Fructosa	1152	C-O, estiramiento
Maltosa	1146	C-O, estiramiento
Sacarosa	1134	C-O, estiramiento
Glucosa	1105	C-O, estiramiento
Fructosa	1080	C-O y C-C, estiramiento, C-O-H, flexión
Glucosa	1073	C-O y C-C, estiramiento, C-O-H, flexión
Fructosa	1054	C-O, flexión, C-O-H, estiramiento
Sacarosa	1047	C-O, estiramiento
Glucosa	1028	C-O y C-C, estiramiento, C-O-H, flexión
Maltosa	1024	C-O y C-C, estiramiento
Sacarosa	991	C-O-C, enlace glicosídico
Fructosa	981	C-C-H, flexión
Sacarosa	926	C-C, estiramiento
Fructosa	920	C-C, estiramiento en la piranosa
Glucosa	916	C-C, estiramiento
Fructosa	866	C-C, estiramiento
Fructosa	821	C-C, estiramiento

Entonces, como puede ser observado, tanto en la Figura 7.10 y Tabla 7.1, la región del espectro de FTIR-ATR comprendida entre 1200 y 900 cm⁻¹ es de vital importancia para identificar el tipo de carbohidrato en cuestión, en este caso de azúcares, pero se puede hacer



extensivo para todos los tipos diferentes de carbohidratos existentes, tales como almidones o celulosas, entre otros.

Figura 7.11 Espectros de FTIR-ATR de varios tipos de alimentos: refresco de cola (a), chocolate (b), pan de caja (c) y galleta (d). En estos espectros se puede apreciar claramente el pico de los carbohidratos en el intervalo de 1200-800 cm⁻¹, a pesar de la aparición de picos asociados con otros compuestos.

Por otro lado, en la Figura 7.11 se puede observar, en los espectros de FTIR mostrados, que las bandas asociadas con los carbohidratos presentes en un alimento no son afectadas por otras bandas asociadas con otros compuestos mayoritarios presentes en las muestras.

7.4.3 El espectro de mezclas de carbohidratos

En algunos casos, una muestra compuesta por varios tipos de carbohidratos produce un espectro de FTIR en donde se pueden presentar algunas ligeras diferencias, pero perfectamente observables. Por ejemplo, el espectro de FTIR de una mezcla acuosa de

fructosa + glucosa, en la misma concentración en peso, produce un pico intenso en la misma región que la producida por los espectros de sus componentes individuales y, por lo tanto, resulta difícil establecer cual pico corresponde a cada uno de los compuestos de la mezcla. Sin embargo, en este caso, en el espectro de la mezcla se pueden observar una serie de pequeños picos que aparecen por debajo de 1000 cm⁻¹, las cuales también aparecen en el espectro de la fructosa, por lo tanto, es posible identificar perfectamente a la fructosa en la solución agua + glucosa + fructosa (Figura 7.12).



Figura 7.12 Espectros de FTIR-ATR de soluciones acuosas de (a) fructosa, (b) glucosa y (c) fructosa + glucosa, después de la extracción del espectro del agua.



Figura 7.13 Espectro de FTIR-ATR de miel de abeja procedente del estado de Nayarit, después de la extracción del espectro del agua.

95

Otro ejemplo de un espectro de FTIR-ATR de un alimento formado principalmente por azúcares es la miel de abeja. La miel de abeja es un producto constituido en forma mayoritaria por agua, fructosa y glucosa, y en menor proporción por sacarosa y maltosa. En la Figura 7.13 se puede observar un espectro de FTIR-ATR de una miel producida en el Estado de Nayarit. El pico negativo que se observa alrededor de 3350 cm⁻¹ es una señal proveniente del agua (enlace O-H), la cual es producto de la sustracción del espectro del agua del de la miel de abeja, e indica que la muestra de miel de abeja tiene una mucho menor concentración de agua con relación a la muestra usada de agua destilada para realizar el espectro de referencia, que obviamente es 100% agua. El pico ubicado entre 3000 y 2750 cm⁻¹ está asociada con el estiramiento del enlace O-H proveniente del ácido carboxílico y del estiramiento del enlace N-H (NH₃⁺) perteneciente a los aminos ácidos, los cuales están presentes en pequeñas cantidades en la miel de abeja. El pico negativo que se observa aproximadamente a 1645 cm⁻ ¹ es una señal proveniente del agua (enlace H-O-H), y que al igual que el pico ubicado en 3350 cm⁻¹ indica menor concentración de agua en la muestra con respecto al agua sustraída en forma espectral. Entre 1400 y 1200 cm⁻¹ se encuentran tres pequeños, pero distinguibles, picos de absorción. El pico ubicado alrededor de 1410 cm⁻¹ proviene de una combinación de flexión del enlace O-H del grupo C-OH y flexión de la unión C-H de los alquenos. El pico observado a 1320 cm⁻¹ al movimiento de flexión asociado con el enlace O-H del grupo C-OH. El pico alrededor de 1255 cm⁻¹ corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios (fructosa y glucosa). El pico más intenso ubicado aproximadamente a 1024 cm⁻ corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios (fructosa y glucosa).



Figura 7.14 Superposición de espectros FTIR-ATR en el intervalo entre 1200 y 800 cm⁻¹ de muestras de miel de abeja procedente de varias regiones del Estado de Jalisco.



Cerca del pico más amplio, se encuentra un pico apenas perceptible, el cual se ubica aproximadamente a 1125 cm⁻¹ y está asociado al enlace C-O de la unión C-O-C. En la región comprendida entre 900 y 750 cm⁻¹ se encuentran pequeños picos de absorción asociados con las vibraciones asociadas con la configuración de la molécula de fructosa (elemento mayoritario en la miel de abeja).

Por otro lado, en la Figura 7.14 se muestran, en el intervalo entre 1200 y 800 cm⁻¹, varios espectros de mieles de abeja procedentes del Estado de Jalisco. En esta figura se pueden apreciar ligeras diferencias en la intensidad de los picos, aproximadamente a 1053 y 1024 cm⁻¹, pero todos dentro un mismo patrón de ubicación y forma, lo cual es debido a los cambios composicionales naturales de los azúcares presentes en las mieles de abeja, principalmente por el contenido de una mezcla de fructosa y glucosa.



7.5 El análisis de los lípidos por FTIR-ATR

7.5.1 Introducción

Los lípidos son un grupo de moléculas formadas por átomos de carbono e hidrógeno, principalmente, aunque pueden tener también átomos de nitrógeno, fósforo o azufre. Comúnmente los lípidos se clasifican en dos grandes grupos: aceites y grasas. Los aceites a temperatura ambiente tienen forma líquida debido que en su composición hay en su mayoría ácidos grasos mono y poliinsaturados. Las grasas están formadas fundamentalmente por ácidos grasos saturados y a temperatura ambiente son sólidas, al ser su temperatura de fusión más alta respecto a la temperatura ambiente. Los espectros de FTIR-ATR de los lípidos presentan características muy particulares que los hace perfectamente distinguibles de otros componentes en los alimentos, por ejemplo, alrededor del intervalo entre 2950 y 2800 cm⁻¹ aparecen picos asociados con los enlaces C-H o un pico intenso ubicado aproximadamente a 1740 cm⁻¹, el cual está relacionado con el enlace C=O del grupo carbonilo.

7.5.2 El espectro de los lípidos y sus principales picos



Figura 7.15 Espectros de FTIR-ATR de muestras de aceite, (a) de oliva y (b) de pescado

Los espectros de FTIR de una gran variedad de lípidos, 100% puros, son muy similares entre sí. En la Figura 7.15 se pueden apreciar espectros de FTIR de un aceite vegetal comercial

(oliva) y otro de origen animal (pescado). En esta figura podemos apreciar el gran parecido de los picos de absorción que presentan los espectros de FTIR-ATR.



Figura 7.16 Espectro de FTIR-ATR de un aceite de oliva extra virgen

En la Figura 7.16 en un espectro de FTIR-ATR se encuentran indicados los principales picos asignados para un aceite de oliva extra virgen. En la Tabla 7.2 se muestra la asignación respectiva a los picos más representativos y su modo de vibración correspondiente.



Número de onda		
(cm ⁻¹)	Asignación y modo de vibración de los picos.	
3004	C=CH, estiramiento.	
2924 y 2850	C-H (-CH ₂), estiramiento, asimétrico y simétrico, respectivamente.	
1740	C=O, estiramiento del grupo carbonilo.	
1464	CH ₂ (C-H) y CH ₃ (C-H), flexión de grupos alifáticos.	
1417	CH ₂ , flexión del grupo.	
1402	=C-H, flexion.	
1372	CH ₂ , flexión del grupo.	
1234 y 1158	C-O, estiramiento	
1116 y 1098	C-O, estiramiento	
1030	C-O, estiramiento	
962	C-H, flexión	
851	=CH ₂ , agitación (<i>wagging</i>)	
720	-CH ₂ , varias vibraciones (de giro y fuera del plano)	

 Tabla 7.2 Asignación y modo de vibración de los picos en un espectro de aceite de oliva [7, 8]

7.5.3 La identificación de lípidos en espectros de muestras ricas en otros compuestos

En la Figura 7.17 se puede observar en los espectros de FTIR-ATR de muestras ricas en carbohidratos (chocolate) y proteínas (carne asada), la interferencia de sus picos sobre los picos provenientes de los lípidos. En el espectro de la Figura 1a son perfectamente notorios los picos de los lípidos y en la parte derecha del espectro los picos asociados con los carbohidratos de la muestra de chocolate.

Por otro lado, en el espectro de la carne asada apenas se puede visualizar el pico asociado con los lípidos, el cual está muy cerca de los picos asociados con las proteínas de la muestra.

7.5.4 Obtención de espectros utilizando poca cantidad de muestra

La versatilidad del accesorio de ATR se puede ejemplificar a través de la medición del aceite superficial contenido en una muestra, tal es el caso de una botana. En México, para preparar una botana se utiliza generalmente aceite de maíz o de ajonjolí. La botana puede ser de papa o de un producto con forma a base de harina de trigo o maíz. Las botanas, ya preparadas, tienen una pequeña cantidad de aceite en su superficie, a menudo difícil de apreciar a simple vista.



Figura 7.17 Identificación de los lípidos en espectros de FTIR-ATR de dos tipos de alimentos: chocolate (a) y carne asada (b).

Para obtener un espectro FTIR del aceite de la superficie de una botana, ésta se coloca cuidadosamente en el accesorio de ATR y al tener la botana una superficie irregular, con ayuda de la prensa se logra un contacto muy sutil con el cristal del accesorio, y de esta manera se asegura que una capa delgada de aceite quede adherida a la superficie del cristal. Entonces, se retira la muestra de botana y, enseguida se lleva a cabo la obtención del espectro del aceite adherido al cristal, aunque hay que decir que en algunas ocasiones podrían aparecer picos de absorción provenientes de los carbohidratos de la botana en cuestión, pero no interfieren grandemente con los picos del aceite. En la Figura 7.18 se muestra fotográficamente una secuencia de preparación para la obtención del espectro de FTIR-ATR (ver Figura 7.19) de un aceite que se encuentra situado en la superficie de una papa frita.







Muestra de aceite dejada sobre el cristal de ATR.

Figura 7.18. Secuencia de colocación en el accesorio de ATR de una papa frita para la obtención del espectro de FTIR del aceite contenido en la superficie de la papa.



Figura 7.19. Espectro de FTIR-ATR de una muestra de aceite proveniente de la superficie de una papa frita comercial.



7.5.5 Determinación de grasas trans

Actualmente la cuantificación de grasas trans en alimentos por FTIR-ATR está basada en el método experimental 2000.10 de la AOAC [9]. Este método se basa en la preparación de una curva de calibración utilizando una mezcla de grasas trans de trioleina (cis) y trielaidina (trans). En los espectros de FTIR-ATR mostrados en la Figura 7.20 se puede apreciar en el intervalo entre 1040 y 900 cm⁻¹ una serie de picos ubicados a 966 cm⁻¹, los cuales se incrementan al aumentar el radio entre trioleina/trielaidina. La curva de calibración se realiza leyendo la absorbancia a 966 cm⁻¹ para cada una de las mezclas seleccionadas (Figura 7.21).



Figura 7.20 Espectro FTIR-ATR de un aceite vegetal en la región entre 1050 y 900 cm⁻¹. El recuadro muestra la zona del pico a 966 cm⁻¹ con ajuste a línea base.



Figura 7.21. Ejemplo de curva de calibración para determinar grasas trans en alimentos

7.6 El análisis de las proteínas por FTIR-ATR.

7.6.1 Introducción

Las proteínas, desde el punto de vista químico, se pueden definir como sustancias complejas de alto peso molecular, formadas, principalmente, por α -aminoácidos ligados mediante uniones peptídicas. Las moléculas de proteínas están compuestas principalmente de átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, además, en algunos casos pueden tener átomos de azufre o fósforo. Los alimentos ricos en proteínas son esenciales para el ser humano, ya que, gracias a su contenido de nitrógeno, que no está presente en otras moléculas alimenticias, como los lípidos o los carbohidratos. También son fundamentales para las síntesis y mantenimiento de diversos tejidos o componentes del organismo, como los jugos gástricos, la hemoglobina, las vitaminas, las hormonas y las enzimas.

7.6.2 El espectro de las proteínas

En la Figura 7.22 se muestra el espectro de FTIR de una proteína extraída de la soya. En esta figura se indican los principales picos de absorción y en la Tabla 7.3 se indica su asignación.



Figura 7.22 Espectro FTIR-ATR de una muestra de proteína (soya).

El espectro de infrarrojo de una proteína presenta picos de absorción asociados principalmente con los grupos amida (Figura 7.23).



Designación (Amida)	Número de ono	da (cm ⁻¹)	Asignación
Α	3300		N-H, estiramiento
В	3110		N-H, estiramiento
Ι	1653		80% del C=O, estiramiento; 10% del C-N, estiramiento; 10% del N-H, balanceo.
II	1567		60% del N-H, balanceo; 40% del C-N, estiramiento.
Ш	1360		30% del C-N, estiramiento; 30% del N-H, balanceo; 10% del C=O, estiramiento; 10% del O=C-N, balanceo; 20% de otros.
	0		
		N	р

Tabla 7.3 Asignación de los picos de absorción en una muestra de proteína mostrados en la Figura 7.22 [1, 10].



Figura 7.23 Representación del grupo amida.

También, en la Figura 7.22 se puede observar en la parte derecha del espectro tres picos: dos picos intensos alrededor de 1653 (Amida I) y 1567 (Amida II) cm⁻¹ y un pequeño pico aproximadamente a 1360 cm⁻¹ (Amida III). En la Figura 7.24 se encuentran representadas las vibraciones en los enlaces de la amida I y II. El pico amida I se considera muy importante, ya que a partir de éste es posible determinar el tipo de estructura secundaria de una proteína, tal y como se menciona más adelante en este mismo capítulo. Por otro lado, en la parte izquierda del espectro, se pueden apreciar dos picos alrededor de 3300 y 3110 cm⁻¹ que se encuentran asociados a los grupos amida tipos A y B, respectivamente.



Figura 7.24 Representación de las vibraciones de los picos amida I y II.

7.6.3 Espectros de muestras ricas en proteínas

Las muestras ensayadas en un equipo de FTIR además de tener proteínas en su composición, pueden contener otros tipos de compuestos mayoritarios (carbohidratos o lípidos), los cuales pueden reflejarse en los picos de absorción en el espectro resultante, sin embargo, lo importante es que no enmascare los picos principales asociados con las proteínas, por ejemplo, los picos amida I y II. En las Figuras 7.25 y 7.26 se muestran los espectros de FTIR de alimentos que contienen proteínas, pero también, son ricos en lípidos y carbohidratos.



Figura 7.25 Espectro FTIR-ATR de una muestra de queso, en donde se pueden observar los picos asociados con las proteínas, pero también picos asociados con los lípidos y carbohidratos, principalmente.

En el espectro del queso (Figura 7.25), los picos asociados con los lípidos y carbohidratos contenidos en la muestra se pueden observar perfectamente, pero estos no interfieren con los picos de las proteínas (amida I y II) ubicados en el intervalo entre 1750 y 1500 cm⁻¹. También, en el espectro de la yema de huevo de gallina (Figura 7.26), los picos asociados con los lípidos y carbohidratos contenidos en la muestra no interfieren con los proteínas tipo amida I y II, situados en el intervalo entre 1750 y 1500 cm⁻¹, respectivamente.





106

Figura 7.26 Espectro FTIR-ATR de una muestra de yema de huevo de gallina, en donde se pueden observar picos asociadas con las proteínas, pero también picos provenientes de lípidos y carbohidratos, principalmente.

7.6.4 El grupo amida I y la deconvolución gaussiana

El grupo amida I, en un espectro se ubica alrededor de 1653 cm⁻¹, y es de vital importancia para la caracterización de una proteína. Este grupo se encuentra asociado al enlace C=O de la amida y contribuye con cerca del 80% en la configuración del pico, y representa una vibración de tipo estiramiento. En la Figura 7.27 se muestra el espectro de infrarrojo entre 1750 y 1450 cm⁻¹ en donde se puede observar el pico de la amida I, acompañado del pico de la amida II. Frecuentemente, el pico de la amida I es más intenso que el pico de la amida II.



Figura 7.27 Picos de la amida I y II en el espectro de infrarrojo de una proteína.
106

El pico de la amida I ha sido ampliamente utilizado para analizar el tipo de estructura secundaria de una proteína (beta, helicoidal, etc.). En la Figura 7.28 se representan las estructuras alfa y beta presentes en una proteína.



Figura 7.28 Representación gráfica de las estructuras secundarias alfa y beta de una proteína

Básicamente se utiliza el método de transformación gaussiana, el cual es un artificio matemático basado en la descomposición de la curva original de amida I en una serie de curvas gaussianas, las cuales se obtienen con la ayuda de un software especializado. Las curvas gaussianas proporcionan la información del tipo de estructura secundaria, así como es posible calcular el porcentaje relativo de cada tipo de estructura encontrado.

En el año de 1986 apareció un artículo en la revista *Biopolymers* titulado "*Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra*", cuyos autores son D. Michael Byler y Heino Susi [11]. En este trabajo se estudió, sistemáticamente por primera vez, la estructura secundaria de la proteína empleando las curvas gaussianas procedentes del espectro de infrarrojo (pico amida I). Los resultados obtenidos utilizando las curvas gaussianas fueron comparados con gran éxito con los resultados del análisis proveniente del estudio de las mismas proteínas por medio de la técnica de difracción de rayos X, la cual, en aquel entonces, era una técnica bien establecida para determinar la estructura secundaria de las proteínas. En la Tabla 7.4 se muestran las comparaciones, encontradas por Byler y Susi, de la determinación de la cantidad de estructura secundaria contra la medida por difracción de rayos X en distintos tipos de proteínas.

En dicha tabla se pueden observar que no existe una diferencia notable entre ambos resultados obtenidos a través de espectroscopia FTIR y difracción de rayos X.

1	ļ		5			
	% de estructura beta			% de estructura helicoidal		
Proteína	FTIR	Rayos X	Diferencia	FTIR	Rayos X	Diferencia
Carboxipeptidína	33	30	+3	40	39	+1
Quimotripsinógeno	49	46	+3	13	11	+2

11

27

21

11

10

29

22

9

+1

-2

-1

+2

Tabla 7.4 Determinación cuantitativa de la estructura secundaria de distintas proteínas obtenidas por FTIR y su comparación con la determinada por difracción de rayos X.

-2

+3

+4

-2

45

32

50

54

Elastína

Papaína

Ribonucleasa A

Tripsinógeno

47

29

46



Figura 7.29 Procedimiento grafico de la obtención de las curvas gaussianas en el pico amida I: a) obtención del espectro de FTIR, b) segunda derivada y c) obtención de las gaussianas.

Básicamente el procedimiento empleado por Byler y Susi fue el siguiente: a) obtención del espectro de infrarrojo en el intervalo donde aparece el pico de la amida I (1700-1600 cm⁻¹), b) obtención de la segunda derivada de la curva amida I, y c) obtención de las curvas gaussianas en el espectro de la amida I, tomando los centros de las curvas gaussianas con referencia al valor de los picos que tienen su dirección hacia abajo obtenidos del análisis de la curva de segunda obtenida (inciso b). En la Figura 7.29 se puede observar en forma gráfica el procedimiento antes descrito.

A partir del artículo de Byler y Susi la cascada de artículos basados en la transformación gaussiana de la banda amida I, e incluso de la banda amida II, ha sido vertiginosa. Muchos de estos estudios han ido de la mano de los constantes avances en el desarrollo de software y hardware que se han sucedido hasta la fecha, lo cual ha permitido el desarrollo de procedimientos matemáticos aplicados en el análisis de datos numéricos [12-15].

En la Tabla 7.5 son citados los característicos números de onda asignados a los diferentes tipos de estructura secundaria obtenidos de la transformación gaussiana del pico de la amida I en el espectro de infrarrojo [1].

Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de estructura	
1691-1696	Laminar B	
1674-1690	Laminar-giro β	
1659-1669	Hélice "3-giro"	
1648-1657	Hélice α	
1640-1647	Desordenada	
1630-1639	Laminar β	
1610-1626	Laminar β	

Tabla 7.5 Asignaciones de la estructura secundaria a las curvas gaussianas obtenidas del pico de la amida I.

En la Figura 7.30 son presentadas las gaussianas del pico de la amida I de una muestra de atún. El pico de la amida I muestra seis curvas gaussianas, cuyos centros y áreas relativas son mostrados en la Tabla 7.6.





Figura 7.30 Gaussianas del pico amida I del espectro FTIR-ATR del atún.

Número de onda (cm ⁻¹)	Área relativa (%)
1617	51.65
1636	10.17
1653	4.84
1669	30.10
1682	2.25
1697	0.99

Tabla 7.6 Porcentajes del área relativa de las gaussianas en el pico amida I del espectro FTIR de atún

Los picos ubicados en 1697, 1682, 1636 y 1617 cm⁻¹ corresponden a una estructura laminar tipo β . Esta estructura representa un 65.06% de la proteína en la muestra de atún. La gaussiana a 1669 cm⁻¹ se puede asociar con una estructura tipo hélice. Mientras tanto, la gaussiana ubicada a 1653 cm⁻¹ representa aproximadamente 4.84% de estructura helicoidal tipo α .



7.6.5 Espectros FTIR-ATR de muestras de proteína con agua.

Es bien conocido que la presencia de agua en una muestra de proteína tiene un efecto adverso en la identificación, principalmente del pico amida I. En los espectros de FTIR (Figura 7.31a-c) se ilustra tal efecto. En la Figura 7.31a se observa el espectro sin agua de la proteína, en donde se pueden notar sin ningún problema los picos amida I y II. Sin embargo, cuando la muestra de proteína tiene agua, el espectro cambia dramáticamente, ahora se observan los picos de amida I y II mucho más pequeños en comparación con los presentados en el espectro de la proteína sin agua (Figura 7.31b). Por lo tanto, la posición del pico amida I no es confiable, debido a que el pico del agua ubicado a 1650 cm⁻¹ (H-O-H) (ver el espectro del agua en la Figura 7.31c) puede contribuir grandemente enmascarando o recorriendo el pico asociado con la amida I.



Figura 7.31 Espectro FTIR-ATR de una proteína, sin la presencia de agua (a), el espectro FTIR-ATR del agua (b) y una proteína con agua (c).

En los alimentos, como se ha mencionado, el agua es un compuesto común en ellos, este hecho hay que tenerlo en cuenta cuando se quiera analizar una muestra rica en proteína, pero

112

con algún residuo de agua, ya que las señales de los picos de absorción del agua interfieren en forma notable las bandas de absorción más importantes generadas por una proteína (amida I y II). En la Figura 7.32 se muestra la posición del espectro (entre 1800 y 1400 cm⁻¹) del agua y el de una proteína. En esta figura se puede observar que el pico de absorción de agua (~1645 cm⁻¹) puede obstaculizar la identificación de los picos de absorción correspondientes a la amida I (~ 1700-1600 cm⁻¹) y II (~ 1600-1500 cm⁻¹).



Figura 7.32 Espectro de FTIR-ATR del agua (a) y el de una proteína (b). Nótese la magnitud y posición de la banda del agua con relación a los picos amida I y II.

Sabiendo que la presencia de agua en una muestra de proteína afecta al espectro de FTIR-ATR obtenido, sobre todo, en la región donde aparece la banda asociada con la amida I (~1653-1645 cm⁻¹), se han buscado formas de eliminar el agua en dichas muestras. Existen varias maneras de eliminar el agua de una muestra (Figura 7.33), por ejemplo, dejando durante varios días la muestra dentro de un desecador, el cual puede contener un material con gran capacidad para absorber agua del ambiente encerrado del desecador, humedad producto del intercambio del agua de la muestra con el ambiente del desecador.

Otra forma rápida de eliminar humedad de la muestra es colocarla dentro de un horno a una temperatura moderadamente baja durante un corto periodo de tiempo. Esta última opción debe de hacerse con sumo cuidado, ya que se puede correr el riesgo de dañar la estructura secundaria de la proteína (por desnaturalización, por ejemplo). El uso de una liofilizadora para eliminar el agua de una muestra es también otra opción. En este equipo la muestra pierde el agua por un proceso de congelación-evaporación, sin pasar por el estado líquido.

Por otro lado, desde hace tiempo se viene utilizando el agua deuterada (D₂O) para analizar una muestra de proteína, con cierta cantidad de agua en su composición, debido a que este tipo de agua no muestra la señal de absorción en la posición de 1645 cm⁻¹, la cual aparece en el espectro del agua [16]. El agua deuterada u óxido de hidrógeno (2 H₂O), también llamada agua pesada, tiene dos átomos de deuterio unidos a un átomo de oxígeno en su composición, en lugar de los dos átomos de hidrógeno que contiene el agua común. Si bien el agua deuterada no es tóxica, más bien es inerte, su uso implica un notorio aumento en el costo del

ensayo de FTIR. Pero, como se mencionó líneas arriba, el uso de este tipo de agua para diluir una muestra de proteína es muy utilizado en espectroscopia FTIR-ATR.



Figura 7.33 Representación de algunas opciones de procesamiento para eliminar el agua en una muestra a base de proteínas: desecación (a), en horno (b) y por liofilizado (c).

7.6.6 Identificación de la desnaturalización de las proteínas.

La desnaturalización de las proteínas se refiere a la transformación de la estructura de orden superior (secundaria, terciaria o cuaternaria), permaneciendo una cadena peptídica sin ningún tipo de arreglo tridimensional (Figura 7.34).



Figura 7.34 Representación de la desnaturalización de una proteína



Son varios los factores que pueden provocar la desnaturalización de una proteína, tales como, el pH, altas temperaturas, disolventes agresivos, fuerza iónica, etc. Básicamente, lo que ocurre durante la desnaturalización de las proteínas es la pérdida de todo tipo de interacciones entre los sitios activos de las proteínas, por ejemplo, por puentes de hidrógeno o disulfuro, interacciones no polares (hidrofóbicas) o polares (hidrofílicas) [17, 18]. La desnaturalización puede ser detectada a través de una comparación espectral FTIR entre muestras de proteínas antes y después de ser sometidas a un proceso donde se pueda llevar a cabo la desnaturalización de las proteínas. En las proteínas el enlace puentes de hidrógeno se manifiesta de manera notable, ya que es el responsable de otorgarle a las proteínas su tipo de estructura secundaria (hélice o plegada). En la Figura 7.28 se mostró la representación de las regiones de la estructura secundaria en una proteína y la influencia que ejercen los enlaces puentes de hidrógeno en su conformación tridimensional.

Sin embargo, la proteína puede sufrir la pérdida de su estructura tridimensional original, ya sea por estar sometida a una temperatura excesiva o a pH ácidos, así como sufrir agitaciones mecánicas extremas, fenómeno que es conocido como la desnaturalización de proteína. La desnaturalización básicamente es originada por la eliminación de la interacción llevada a cabo por los puentes de hidrógeno. Una vez que una proteína se encuentra desnaturalizada puede llegar perder sus funciones biológicas, así como sus propiedades fisicoquímicas, tales como viscosidad o solubilidad. En un espectro de infrarrojo se puede conocer el grado de participación de los enlaces puentes de hidrógeno en la estructura de una proteína. Por ejemplo, en la Figura 7.35 y 7.36 se muestra, en el intervalo entre 1750 y 1550 cm⁻¹, la transformación gaussiana del pico amida I, tanto de la proteína nativa, así como de esta misma proteína, pero sometida a un tratamiento térmico, respectivamente.



Figura 7.35 Espectro de FTIR-ATR entre 1750 y 1550 cm⁻¹ y Gaussianas en la región de amida I de una proteína sin calentar.





Figura 7.36 Espectro FTIR-ATR entre 1750 y 1550 cm⁻¹ y las Gaussianas en la región de la amida I de una proteína calentada.

En estos dos espectros se observan tres gaussianas ubicadas en 1680, 1648 y 1620 cm⁻¹, con un área relativa de 0.66, 4.78 y 2.84, respectivamente. Sin embargo, las gaussianas, correspondientes al espectro de la proteína calentada, disminuyeron en sus valores de área bajo la curva, marcadamente con relación a las gaussianas provenientes de la muestra sin calentar, tal y como se puede observar en la Tabla 7.7, dando como resultado una diferencia total de cambio de 2.09 unidades relativas de área.

Número de onda (cm ⁻¹)	Área relativa	Área relativa de	Diferencia
	de muestra sin	muestra calentada	
	calentar		
1680	0.66	0.62	0.04
1648	4.78	2.78	2.00
1620	2.84	2.79	0.05
	Total: 8.28	Total: 6.19	Total: 2.09

Tabla 7.7 Análisis cuantitativo de la región de la amida I de la proteína con y sin calentamiento

Referencias



1. Stuart, B., Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, Wiley, Chichester, England, 2004.

2. Anjos, O., Campos, M., Contreras, P., Antunes, P., Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey, Food Chemistry, **169**, 218–223 (2015).

3. Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J., Renard, C., Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. Food Chemistry, **115**, 1133–1140 (2009).

4. Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M., Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Malek, K., Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **185**, 317-335 (2017).

5. Tewari J., Irudayaraj J., Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **52**, 3237-3243 (2004).

6. Leopold, L. F, Leopold, N., Diehl, H. A., Socaciu, C., Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis, Spectroscopy, **26**, 93-104 (2011).

7. Rohman, A., Che Man, Y. B., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, Food Research International, **43**, 886-892 (2010).

8. Tay, A., Singh, Krishnan, S. S., Gore, J. P., Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy, LWT-Food Science and Technology, **35**, 99-103 (2002).

9. Adam, M., Mossoba, M.M., Lee, T., Rapid determination of total *trans* fat content by attenuated total reflection infrared spectroscopy: An international collaborative study, J. Am. Oil Chem. Soc., **77**, 457-462 (2000).

10. Barth, A., Infrared spectroscopy of proteins, Biochimica et Biophysica Acta, 1767, 1073-1101 (2007).

11. Susi, H., Byler, D. M., Examination of the secondary structure of protein by deconvolved FTIR spectra, Biopolymers, **25**, 469-487 (1986).

12. Grdadolnik ,J., Saturation effects in FTIR spectroscopy: Intents of amide I and amide II bands in protein spectra, Acta Chim. Slov., **50**, 777-788 (2003).

13. Fu, K., Griebenow, K., Hsieh, L., Klibanov, A. M., Langer, R., FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres, Journal of Controlled Release, **58**, 357-366 (1999).

14. Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui X., Wang, Z., Li, D., Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate, Procedia Engineering, **15**, 4819-4827 (2011).

15. Kong, J., Yu, S., Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, **39**, 549-559 (2007).

16. Smith, B. M., Franzen, S., Single pass attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for the analysis of protein in H₂O solution, Analytical Chemistry, **74**, 4076-4080 (2002).

17. Farrell Jr., H. M., Wickham, E.D., Unruh, J. J., Qi, P. K., Hoagland, P. D., Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. Food Hydrocolloids, **15**, 341-354 (2001).

18. Vanga, S. K., Singh, A., Kalkan, F., Gariepy, Y., Orsat, V., Raghavan, V., Effect of Thermal and High Electric Fields on Secondary Structure of Peanut Protein, International Journal of Food Properties, **19**, 1259-1271 (2016).

Capítulo 8. Aplicaciones selectas de la espectroscopia FTIR-ATR

8.1 Introducción

En este capítulo se mencionan algunas aplicaciones selectas que tiene la espectroscopia FTIR-ATR en el análisis de alimentos y bebidas. La cuantificación de compuestos en una solución acuosa es una de las aplicaciones más comunes y confiables en la actualidad, se muestra un ejemplo de determinación de sacarosa en mango. El tratamiento de datos estadísticos de una serie grande de espectros de FTIR-ATR (absorbancia vs número de onda, por ejemplo) es otra gran aplicación, ya que permite la separación de muestras que tienen distintas características composicionales, la cuales a menudo, no presentan grandes diferencias numéricas. Con relación a lo anterior, en este apartado se muestra un ejemplo aplicando el análisis por componentes principales (o PCA, del inglés, Principal Component Analysis). El seguimiento a reacciones químicas es otra gran aplicación que tiene la espectroscopia FTIR-ATR En este capítulo se muestran las transformaciones que sufren los jugos de agave en los procesos cocimiento, fermentación y destilado, que se llevan a cabo para elaborar el tequila. Por otra parte, las interacciones fisicoquímicas que suceden a nivel molecular en una mezcla de compuestos, también pueden ser observadas aplicando esta técnica, por ejemplo: los enlaces puentes de hidrógeno o las interacciones entre grupos ionizados, por ejemplo, entre el NH₃⁺ y el COO⁻. Mediante un ejemplo de desnaturalización de una proteína, se muestra la perdida de los enlaces por puentes de hidrogeno por FTIR-ATR. Además, se muestra un apartado donde se ejemplifica la versatilidad de la técnica de espectroscopia FTIR-ATR: la observación in situ de transformaciones espectrales a través del cambio composicional de una muestra colocada sobre el accesorio de ATR. Por último, se muestran ejemplos de espectros FTIR-ATR provenientes de compuestos minoritarios contenidos en distintos alimentos y se analizan sus picos principales.

8.2 Análisis Cuantitativo en muestras líquidas

El análisis cuantitativo de un compuesto en solución se lleva a cabo por FTIR utilizando el accesorio de ATR. Una condición útil para este tipo de análisis es la adecuada selección de un pico en los espectros obtenidos, en el cual se observe que su magnitud se incremente en función del porcentaje de muestra disuelta para generar una curva con un comportamiento lineal de la absorbancia versus la concentración. A continuación, se ilustra mediante un ejemplo la determinación del contenido de sacarosa en una muestra de jugo de mango.

118

El primer paso es la obtención del espectro de la muestra de jugo de mango, el cual se puede observar en la Figura 8.1a, en donde se puede apreciar que los picos representativos están en posiciones similares (número de onda) con relación a los que aparecen en un espectro de un estándar de sacarosa (Figura 8.1b). La sacarosa presente en el jugo de mango se presume que fue agregada durante su proceso de elaboración y embotellado.



Figura 8.1 Espectros FTIR-ATR: jugo de mango, con concentración de sacarosa desconocida (a) y estándar de sacarosa en solución (b)



Figura 8.2 Espectros FTIR-ATR de las soluciones de sacarosa (intervalo de 5-30% en peso).

El paso siguiente consiste en la preparación de soluciones de sacarosa grado estándar a distintas concentraciones conocidas, en el intervalo donde se presupone se encuentre la concentración de sacarosa en el jugo de mango. Enseguida se realizan los espectros de FTIR de cada una de las soluciones preparadas. En los espectros obtenidos se selecciona el pico que incremente su magnitud (absorbancia) en forma proporcional dentro del intervalo de concentraciones utilizadas. En la Figura 8.2 se pueden observar los espectros de las soluciones de sacarosa a las distintas condiciones preparadas (intervalo de 5-30% en peso). En esta figura se puede observar cómo los picos, asociados con la sacarosa, incrementan el valor de absorbancia en función del aumento en la concentración de sacarosa en la solución, principalmente en el intervalo del espectro entre 1500 y 800 cm⁻¹, tal y como se puede observar con mayor detalle en la Figura 8.3. En esta figura se observa que el pico ubicado alrededor de 1053 cm⁻¹ mantiene una buena proporcionalidad con relación al incremento de su absorbancia en función del aumento en la concentración de la sacarosa en solución, por tal motivo este pico se selecciona para obtener los valores de la curva de calibración. Entonces, la absorbancia del pico ubicado a 1053 cm⁻¹ es medida para cada solución, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 8.1 Estos datos pueden entonces ser graficados para obtener la curva de regresión lineal (Ecuación 8.1) para obtener la concentración de sacarosa desconocida en una muestra de jugo de mango en función de la absorbancia medida a 1053 cm⁻¹. La curva de regresión se muestra en la Figura 8.4.



Figura 8.3 Espectros FTIR-ATR comprendidos en el intervalo de 1500 y 800 cm⁻¹ de soluciones de sacarosa a distintas concentraciones (5-30% en peso).

Concentración (% en peso)	Absorbancia a 1053 cm ⁻¹
5	0.067
10	0.087
15	0.110
20	0.136
25	0.163
30	0.187

Tabla 8.1 Datos de calibración para las soluciones de sacarosa.

La ecuación lineal de regresión obtenida fue la siguiente:



Figura 8.4 Gráfica de comportamiento lineal de las concentraciones de sacarosa en solución

El paso final es la determinación de la cantidad de la sacarosa contenida en el jugo de mango. Por ejemplo, en el espectro FTIR-ATR de la muestra de mango (Figura 8.1a) la absorbancia a 1053 cm⁻¹ fue medida y se obtuvo un valor de absorbancia de 0.131. Ahora, utilizando la ecuación lineal obtenida se sustituye el valor de absorbancia, obteniéndose el valor de la concentración de sacarosa en la muestra de jugo de mango de 18.84% en peso (Figura 8.4).



8.3 Aplicaciones de métodos de análisis estadístico.

Las aplicaciones de métodos estadísticos en el análisis de datos experimentales o multivariados son conocidas como químico-métricos (en inglés: *chemometrics*). Los datos numéricos (multivariados), en el caso de un espectro FTIR, son los valores de número de onda (cm⁻¹) correspondiente con su valor de absorbancia (o % de transmitancia) que componen el espectro de infrarrojo en cuestión. Algunos de los métodos químico-métricos más comúnmente utilizados han sido la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) o los análisis por componentes principales (PCA) [1-4]. En esta sección no se detallan los aspectos matemáticos a los químico-métricos utilizados en la literatura especializada, por escaparse al objetivo de este libro. Para ilustrar el uso de métodos químico-métricos se muestra un ejemplo de la aplicación de PCA para determinar la posible adulteración de muestras de miel de abeja procedente de diferentes fuentes de compra.

La miel de abeja es un producto que tiene gran demanda a nivel mundial debido a sus propiedades nutrimentales y sensoriales. Los principales constituyentes de la miel de abeja son azucares (fructosa y glucosa) y agua. Pero también la miel de abeja contiene sustancias que le confieren propiedades nutrimentales, tales como, minerales, vitaminas, granos de polen o proteínas. Actualmente, existen normas internacionales y nacionales para verificar la autenticidad de la miel de abeja, en donde básicamente se establecen límites de propiedades físicas y químicas que deben de cumplirse, tales como: contenido de agua, composición de azucares, conductividad eléctrica, contenido de hidroximetilfurfural, entre otras. Sin embargo, la adulteración hoy en día de la miel de abeja ha alcanzado gran sofisticación, que a menudo hay que realizar varios tipos de análisis para asegurar su detección con seguridad Por tal motivo, se ha buscado el establecimiento de métodos rápidos y precisos para detectar la adulteración en la miel de abeja. Para este ejemplo se utilizaron 12 muestras de miel de abeja artesanal (auténtica), 13 muestras de miel de abeja de marca (etiqueta 100% de miel de abeja) y 13 muestras de miel de abeja considerada como adulterada, debido a su bajo costo en el mercado.

La Figura 8.5a-b muestra la superposición de tres espectros de infrarrojo, los cuales correspondieron a cada uno de los grupos de miel de abeja establecidos. En la región ampliada (1200-800 cm⁻¹) de los espectros (Figura 8.5b) se pueden observar diferencias en la posición de los picos, principalmente en los correspondientes a la miel de abeja considerada como adulterada. La Figura 8.6 muestra la representación de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2). Estos dos componentes explicaron el 85.1% de la variabilidad, PC1 (65.7%) + PC2 (19.4%). La Figura 8.7 muestra la representación de los componentes uno y tres, los cuales representaron el 79.1% de variabilidad, PC1 (65.7%) + PC3 (13.4%). En la Figura 8.8 se pueden observar los componentes principales dos y tres, los cuales representaron el 32.8% de la variabilidad de los datos, PC2 (19.4%) + PC3 (13.4%).



Figura 8.5 Espectros FTIR-ATR superpuestos de mieles de abeja de cada uno de los tipos estudiados (a) y región ampliada del intervalo 1200-800 cm⁻¹ (b).

Los espectros de infrarrojo de todas las mieles de abeja fueron similares a los encontrados en otras investigaciones de mieles de abeja de distintas partes del mundo. Sin embargo, fue posible observar variaciones en los picos de absorción. Los espectros de infrarrojo correspondientes a las mieles de abeja identificadas como artesanales y etiquetadas son similares entre sí, tal y como se pueden observar en la Figura 8.5a. Sin embargo, el espectro de infrarrojo de una miel de abeja clasificada como adulterada fue notoriamente diferente a los de una miel identificada como artesanal y etiquetada, tal y como puede ser observada en la ampliación en la Figura 8.5b. Estas diferencias se notaron con mayor claridad en los espectros en el intervalo comprendido entre 1200-800 cm⁻¹, cuyos picos de absorción están asociadas a enlaces del tipo C-C y C-O, pertenecientes a los principales azúcares de la miel de abeja: fructosa y glucosa [3]. En la Figura 8.5b, el pico principal de la miel de abeja adulterada, localizado ~1020 cm⁻¹, apareció recorrido a la derecha en comparación a los picos de las otras dos mieles de abejas (artesanal y etiquetada), los cuales aparecen alrededor de 1025 cm⁻¹. Estos 5 cm⁻¹ de diferencia podrían ser debido a la adulteración de la miel de abeja con otro tipo de azúcar, presumiblemente con un jarabe de sacarosa o fructosa. La mayoría de los espectros de infrarrojo de las mieles de abeja consideradas como adulteradas siguen el mismo patrón antes explicado, al igual que los espectros de las mieles de abeja catalogadas como artesanales y etiquetadas. Sin embargo, las diferencias observadas en forma visual en todos los espectros de infrarrojo pueden llevar a conclusiones erróneas, debido a las pequeñas diferencias en la posición entre los principales picos de absorción en los espectros (Figura 8.5b).



Figura 8.6 Clasificación de las mieles de abeja usando el PCA (PC1 y PC3) en los espectros de infrarrojo obtenidos (datos numéricos) en el intervalo 1200-800 cm⁻¹. (\bigstar miel de abeja considerada auténtica), (\circ , miel de abeja etiquetada), (\bullet , miel de abeja considerada adulterada).

En la Figura 8.6 se muestra el PCA (PC1 y PC2) de los espectros de infrarrojo de todas las mieles investigadas. En esta figura es posible observar que las mieles de abeja consideradas con adulteradas se separaron gráficamente a la derecha, tanto de las mieles de abeja artesanales como de las mieles de abeja etiquetadas. Las mieles de abeja artesanales formaron, a la izquierda de la figura, un conglomerado compacto, lo cual podría indicar una gran similitud en su composición química, principalmente de fructosa y glucosa. Las muestran de miel de abeja envasadas tuvieron un comportamiento disperso, incluso la muestra identificada como E12 presentó un singular comportamiento, ya que se encontró situada en la zona donde se localizan la mayoría de las mieles de abeja adulteradas, por lo tanto, se puede inferir que esta muestra de miel de abeja etiquetada (E12) presumiblemente fue adulterada. Tomando en cuenta la explicación anterior, las muestras de miel de abeja etiquetadas, identificadas como E1, E7 y E11, podrían ser catalogadas como sospechosas de estar adulteradas, al encontrarse alejadas de la zona del conglomerado de las muestras de miel de abeja artesanales, pero cerca de las mieles de abeja identificadas como adulteradas (Figura 8.6). Hay que hacer notar que la adulteración de algunas de las mieles de abeja envasada, en este caso identificada por el PCA, ha sido un hecho demostrado con relativa frecuencia en nuestros laboratorios.



Figura 8.7 Clasificación de las mieles de abeja usando el PCA (PC1 y PC3) en los espectros de infrarrojo obtenidos (datos numéricos) en el intervalo 1200-800 cm⁻¹. (\bigstar miel de abeja considerada auténtica), (\circ , miel de abeja etiquetada), (\bullet , miel de abeja considerada adulterada).

Ahora, utilizando los componentes principales PC1 y PC3 con una variabilidad total de 79.1%, en la Figura 8.7 se puede observar una similar distribución de los grupos de mieles de abeja utilizados en comparación a la distribución observada utilizando los componentes PC1 y PC2. Esta similitud observada fue debido a que el componente PC1, el cual representó la mayor variabilidad (65.7%) de los datos obtenidos, formó parte de la construcción de ambos gráficos. Cuando fueron utilizados los componentes con menor variabilidad PC2 y PC3 con 19.4 y 13.4%, respectivamente, la separación de los grupos de miel de abeja clasificados no fue lo suficientemente clara, tal y como lo podemos observar en la Figura 8.8. Esta dispersión confusa de los datos es consecuencia de la poca variabilidad combinada de ambos componentes principales, la cual fue de 32.8% (PC2, 19.4 + PC3, 13.4).

Dado que los componentes principales son representaciones vectoriales como consecuencia de una transformación matemática de los datos multivariados originales (espectros de infrarrojo) [1], existen regiones de los espectros que influyeron en mayor medida en la obtención de los PC's (PC1, PC2 y PC3). En las clasificaciones obtenidas, la región del espectro de 1110-950 cm⁻¹ fue la que mayor influencia estadística presentó en su construcción. En esta región, como ya mencionamos, se encuentran las bandas de absorción más importantes de una miel de abeja y que provienen del contenido de fructosa y glucosa, por tal motivo, cualquier variación en las proporciones de estos azúcares influyeron de manera sensible en el comportamiento de los espectros, principalmente en los de las mieles de abeja consideradas como adulteradas.



Figura 8.8 Clasificación de las mieles de abeja usando el PCA (PC2 y PC3) en los espectros de infrarrojo obtenidos (datos numéricos) en el intervalo 1200-800 cm⁻¹. (\bigstar miel de abeja considerada auténtica), (\circ , miel de abeja etiquetada), (\bullet , miel de abeja considerada adulterada).

8.4 Seguimiento a reacciones de proceso: caso tequila

Para ejemplificar el uso de la técnica de FTIR-ATR en el seguimiento a las reacciones de un proceso de elaboración de un producto, se toma el caso del tequila, en sus etapas de cocimiento y fermentación de los jugos agave, tal y como se describe a continuación.

8.4.1 Caracterización FTIR-ATR de los jugos primarios del agave.

Las cabezas de agave (*A. tequilana* Weber var. azul) en la edad óptima de cosecha (alrededor de 6 a 8 años) contienen los jugos que dan origen al tequila. Aproximadamente estos jugos están compuestos de agua (60%), fructanos de agave (24%), fibras (11%), azúcares reductores (1.5%), proteínas y cenizas (2.70%). De acuerdo a Los fructanos de agave son cadenas poliméricas ramificadas cuya base es la fructosa, unidas por enlaces tipo β -2,1 y β -2,6 [5]. El contenido de fructanos de agave cambia en función de la edad de la planta de agave, siendo de 8 a 10 años donde se obtiene la mayor cantidad de fructanos en sus jugos. En el proceso de elaboración del tequila, habitualmente las cabezas de agave son cocidas enteras y posteriormente son molidas para extraerles el jugo cocido rico en azúcares hidrolizados, principalmente a base de fructosa.



Figura 8.9 Espectro FTIR-ATR de los jugos de agave crudos con la identificación de los picos más importantes.

El espectro de FTIR-ATR en el intervalo entre 4000 y 650 cm⁻¹ de un jugo "crudo" de agave solamente muestra picos asociados con sus componentes mayoritarios: agua y fructanos de agave (Figura 8.9). En el intervalo espectral, ubicado entre 1200 y 800 cm⁻¹, se han asociado los picos procedentes de las moléculas de fructanos de agave. Alrededor de 1023 cm⁻¹ aparece un pico intenso que es debido a una combinación de vibraciones: al estiramiento del C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la molécula de los fructanos. A 1128 cm⁻¹ aparece un pico asignado al estiramiento del enlace C-O del C-O-C. El pico ubicado a 928 cm⁻¹ es debido a una vibración por bandeo del enlace C-H en la molécula de los fructanos de agave. El pico ubicado a 2940 cm⁻¹ está asignada al estiramiento del enlace C-H proveniente del CH₂ y a 2880 cm⁻¹ se encuentra un pico asignado al enlace C-H proveniente de CH₃. Además, en el espectro de la figura aparecen dos picos asociados con la molécula del agua ubicados alrededor de 3245 y 1630 cm⁻¹, los cuales son causados por vibraciones de estiramiento y bandeo en los enlaces O-H y H-O-H, respectivamente.

8.4.2 Caracterización FTIR-ATR del cocimiento de los jugos de agave



Figura 8.10 Transformación del espectro FTIR-ATR, en el intervalo entre 1200 y 750 cm⁻¹, desde los jugos sin cocimiento (ricos en fructanos de agave) (a) hasta su transformación final en fructosa, durante distintos tiempos de cocimiento de la muestra a 95° C: (b) 6 h, (c) 12 h, (d) 24 h, (e) 36 h y (f) 48 h.

Durante el cocimiento de las cabezas de agave, los fructanos son transformados a fructosa principalmente, aunque también puede contener un porcentaje de glucosa (<10%). Tradicionalmente, el cocimiento de las cabezas de agave se lleva cabo en hornos de mampostería a una temperatura de 95 °C durante un intervalo de tiempo entre 24 y 48 horas. Hoy en día, para reducir la duración del cocimiento, las cabezas de agave suelen cocerse en autoclaves aplicado vapor a presión, alcanzándose temperaturas de alrededor de 120 °C, durante un intervalo de tiempo de 12 a 24 horas. Frecuentemente, el seguimiento del cocimiento de las cabezas de agave ha sido llevado a cabo evaluando el color por espectrometría UV (a 490 nm), °Brix, la evolución de azucares, principalmente fructosa y glucosa (a menudo por HPLC) y el pH de los jugos en función de la temperatura y tiempo del cocimiento. Sin embargo, el uso de FTIR-ATR es una buena opción de seguimiento, tal y como se puede observar en la Figura 8.10 donde se muestra la evolución del espectro de FTIR, en el intervalo entre 1200 y 750 cm⁻¹, en un muestreo desde los fructanos de agave crudos hasta el cocimiento final de los jugos de las cabezas de agave. En esta figura se puede observar la paulatina desaparición de los picos provenientes de la muestra de los jugos de

agave crudos, ubicados a 1130, 1021 y 928 cm⁻¹ y la continua formación o deconvolución del pico observado a 1060 cm⁻¹, el cual es característico en un espectro de FTIR de la fructosa. El espectro de FTIR de la muestra del cocimiento final solamente muestra picos asociados con la molécula de fructosa, incluso los picos de menor intensidad ubicados a 972, 922, 864, 810 y 755 cm⁻¹, lo cual puede inferirse a un buen cocimiento de las piñas de agave llevado a cabo en este trabajo. Por lo tanto, un eficiente monitoreo de la transformación de fructanos a fructosa puede ser llevado a cabo por FTIR-ATR en forma rápida y precisa a nivel piloto o industrial.

8.4.3 Caracterización FTIR-ATR de la fermentación de los jugos cocidos.

La transformación de la fructosa en etanol se realiza por medio de una fermentación, la cual se lleva a cabo adicionando una levadura del tipo *Saccharomyces cerevisiae* a los jugos de agave cocidos a una temperatura entre 30 y 35 °C. La velocidad de fermentación depende varios factores, como la composición química de los jugos de agave cocidos, las condiciones de operación del proceso, pero sobre todo de la cepa de levadura utilizada. Con la adición de una levadura previamente desarrollada, la fermentación puede tener una duración de alrededor de 20 a 72 horas. El monitoreo de la fermentación para la obtención de etanol en otras bebidas ha sido analizado con éxito utilizando espectroscopia FTIR. Por ejemplo, Di Egidio y col., monitorearon por FTIR-ATR la fermentación de fructosa en etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como medio de cultivo para la obtención de vino rojo [6]. También, Wu y col., monitorearon durante la fermentación de vino de arroz diferentes parámetros (etanol, azúcares y acidez total) usando espectroscopia FTIR-ATR [7].

Por otro lado, la Figura 8.11 muestra la transformación de los espectros de FTIR-ATR de muestras de jugos de agave cocinados fermentados en función de su tiempo de proceso (0-48 horas). En esta figura se puede observar en forma clara la transformación de la fructosa en etanol. En el espectro de FTIR-ATR de la muestra inicial el pico asociado con la fructosa, localizado alrededor de 1060 cm⁻¹, desaparece paulatinamente, dando lugar a la formación gradual de dos picos (a 1080 y 1040 cm⁻¹), los cuales se observan claramente en el espectro de FTIR-ATR de la muestra final del proceso, estos picos se encuentran asociados a una vibración de estiramiento en los enlaces C-O en la molécula de etanol. También, el pico que aparece a 877 cm⁻¹ en la muestra final de fermentación, comienza su evolución desde el inicio del proceso hasta su finalización.

Por lo tanto, el proceso de fermentación puede seguirse en el intervalo entre 1200 y 700 cm⁻¹ del espectro de FTIR-ATR, en el cual se pueden observar los picos principales de la fructosa y los del etanol.



Figura 8.11 Transformación del espectro de FTIR-ATR de fructosa a etanol, en el intervalo entre 1200 y 750 cm⁻¹, durante una fermentación de jugos de agave cocinados a 35 °C durante: (a) 0 h (b) 8 h, (c) 16 h, (d) 24 h, (e) 32 h, (f) 40 h y (g) 48 h.

8.5 Evolución espectral de una muestra por evaporación.

Una de las clásicas desventajas de la espectroscopia FTIR-ATR ha sido la obtención de espectros que tengan enmascaramiento de picos. Esto quiere decir, que la muestra medida contiene compuestos en gran concentración que tapan picos, qué potencialmente saldrían en esas mismas regiones, pero que se encuentran en la muestra en relativa menor concentración en la muestra. Un ejemplo clásico, es una muestra que contenga agua, esto hace que en su espectro los grandes picos del agua cubran o interfieran otros picos, por ejemplo, en el espectro de una proteína en solución, la banda del agua ubicada alrededor de 1650 cm⁻¹, interfiere la banda asociada con la proteína, la cual aparece en torno a 1625 cm⁻¹. La solución a esta desventaja, a menudo, ha sido la sustracción del espectro del solvente que aparece en la muestra del espectro obtenido de la muestra evaluada. Pero, no siempre esta solución es efectiva, ya que la sustracción de espectros no es aritmética, es decir pueden quedar picos más pequeños, que de algún modo siguen provocando relativa interferencia. En este libro se muestra una metodología para eliminar principalmente solventes en una muestra cuyo interés es precisamente los compuestos minoritarios (no volátiles) también presentes en ella. La metodología en cuestión se encuentra basada en la evaporación del solvente (o los solventes)



de la muestra, la cual originalmente es colocada sobre la superficie del cristal del accesorio de ATR, y una vez evaporado el solvente (o los solventes), sobre la superficie del cristal queda un residuo firmemente adherido al cristal, y enseguida se procede a la obtención del espectro de FTIR-ATR. En este capítulo, en el apartado siguiente, se observa el ejemplo de una muestra de tequila reposado, rica en agua y etanol, en donde se busca determinar en el espectro señales de compuestos provenientes de las barricas, las cuales son utilizadas para añejar el tequila blanco. En la Figura 8.12 se muestra la representación del asecuencia en forma gráfica de la medición usando la evaporación para la obtención del espectro, en este caso a la temperatura de laboratorio (20 °C) de la muestra sobre el cristal de ATR.



Figura 8.12 Representación de la medición espectral al evaporar parte de la muestra sobre el cristal del accesorio de ATR.

8.5.1 Ejemplo de evolución espectral por evaporación de la muestra

El tequila destilado o blanco puede ser posteriormente sometido a un proceso de maduración, el cual se lleva acabo almacenándolo en barricas de roble o encino durante un determinado periodo de tiempo. Cuando el tequila permanece en la barrica por lo menos 2 meses y hasta un año al tequila se le conoce como reposado y cuando el tequila permanece en la barrica por lo menos durante un año se le denomina añejo.



Figura 8.13 Espectros de FTIR-ATR de tequila blanco (a) y tequila añejado comercial (b)

El espectro de FTIR-ATR de un tequila añejado no presenta cambios notorios respecto a un tequila blanco, tal y como se puede observar en la Figura 8.13a-b. Sin embargo, cuando se obtiene el espectro FTIR-ATR del residuo, producto de la evaporación del etanol (en primer lugar) y el agua (en segundo lugar) contenido en la muestra de tequila añejado colocado sobre el cristal del ATR, una serie de picos desaparecen (etanol y agua) y otros lo contrario, lo cual se puede observar perfectamente en el intervalo entre 1300 y 900 cm⁻¹ (ver secuencia en la Figura 8.14).El origen de los picos observados en el espectro final, en el círculo, se puede inferir que provienen de compuestos originados por la interacción entre el tequila y las paredes de la barrica de roble blanco, por la posición mostrada, es probable que procedan de una serie de enlaces del tipo C-H, C-O, C-C o C-O-C, entre otros, los cuales presumiblemente podrían pertenecer a moléculas orgánicas de las siguientes familias: ácidos, ésteres, carbohidratos, furanos, terpenos, etc. [8-11]. En la Figura 8.15 se muestra el efecto del tiempo de maduración en la barrica del tequila blanco (0-60 días) en los espectros FTIR-ATR, entre 1300 y 900 cm⁻¹, y se puede observar el cambio de intensidad de los picos con el paso del tiempo, principalmente a 1114, 1075 y 1047 cm⁻¹. En la misma figura, se puede observar la ausencia de picos en la muestra inicial de tequila blanco.



Figura 8.14 Secuencia de eliminación de picos en los espectros FTIR-ATR para muestra de tequila reposado durante su evaporación en el cristal ATR. Se puede observar que primero desaparecen los picos de etanol y subsecuentemente los picos de agua. El espectro final de FTIR-ATR mostró picos en el intervalo entre 1300 y 900 cm⁻¹ asociados con moléculas de compuestos provenientes de la barrica de roble.



Figura 8.15 Evolución de los espectros FTIR-ATR en el intervalo entre 1300 y 900 cm⁻¹ que muestra la transformación de los picos asociados con compuestos no volátiles procedentes de la barrica durante la maduración del tequila blanco (60 días) en una barrica de roble.



8.6 Introducción al estudio de las interacciones moleculares por FTIR-ATR

Las interacciones moleculares de un sistema de moléculas o iones determinan como se agrupan entre ellas, por lo tanto, son las culpables de los estados de agregación de la materia que puede tener una sustancia (gas, líquido o gaseoso). Los átomos de diferentes moléculas que presentan enlaces covalentes, dependiendo de la polaridad de los mismos, atraerán con mayor o menor intensidad a otros átomos. Como es el caso del agua, en donde sus enlaces tienen una gran polaridad, razón por la cual a temperatura ambiente sea un líquido. Ahora bien, cuando los enlaces de las moléculas están relativamente poco polarizados, las fuerzas que mantienen unidas a estas moléculas son débiles. Por lo tanto, un aumento ligero de la temperatura (que genera un aumento de energía cinética de las moléculas) ocasiona que las uniones entre las distintas moléculas se rompan. Esto es la causa de que sustancias con este tipo de interacción sean gases a temperatura ambiente.

Un aspecto fundamental de las interacciones moleculares descritas es su gran flexibilidad, por lo que pueden desintegrarse y volver a formar enlaces rápidamente, lo cual es de vital importancia para muchos tipos de estructuras complejas y su función.

8.6.1 Identificación del enlace por puentes de hidrógeno

Como hemos visto, en un espectro de FTIR es posible asociar enlaces característicos pertenecientes a una muestra ensayada a través de la identificación de sus picos. Los enlaces por puentes de hidrógeno pueden ser identificados en un espectro de FTIR, básicamente en la posición del pico asociado con el enlace O-H. El enlace O-H aparece en un espectro FTIR en la región de los grupos funcionales entre los 3500 y 3000 cm⁻¹. Sin embargo, el pico del enlace O-H presenta una configuración diferente dependiendo en donde se encuentre el enlace, es decir, si el enlace se encuentra en agua pura o en una muestra rica en agua, o el enlace forma parte de la estructura de una muestra sólida (-OH). También, la forma del pico asociado al enlace O-H en líquidos no polares es ligeramente diferente en intensidad y forma. En el agua líquida sucede una enorme cantidad de interacciones moleculares, pero suceden principalmente por puentes de hidrógeno. Está interacciones tiene una gran influencia en la configuración liquida que presenta el agua. En la Figura 8.16 se muestra una representación rápida de agrupaciones de moléculas de agua unidas por enlaces puentes de hidrógeno que continuamente se separan y se forman de nuevo. Estos cambios suceden muy rápidamente, en alrededor de solamente algunos picosegundos (10⁻¹² s).



Figura 8.16 Representación de las moléculas del agua líquida en donde continuamente se arreglan debido a atracciones conocidas como puentes de hidrógeno.

En la Figura 8.17 se muestra el espectro de infrarrojo del agua líquida. Este espectro nos permitirá adentrarnos en el mundo de los enlaces puentes de hidrógeno. En el espectro de la figura se pueden apreciar perfectamente dos picos de un tamaño completamente opuesto, el primero, muy amplio y alto, asociado con el enlace O-H localizado, en su punto máximo, aproximadamente a 3350 cm⁻¹ y el segundo pico, menos amplio y alto, relacionada con el enlace H-O-H, ubicado en pico máximo, alrededor de 1645 cm⁻¹. La razón por la que el pico ubicado a 3350 cm⁻¹ es amplio y alto se debe en gran medida a la formación de la interacción por puente de hidrógeno en el agua. Este tipo de interacción electrostática entre el protón del oxígeno y la región negativa del átomo de oxígeno, como ya lo mencionamos en el apartado 7.2, presenta una fuerza de interacción relativamente alta, la cual, al generarse en forma instantánea, literalmente en millones y millones de veces, contribuye de manera notable al incremento del pico a 3350 cm⁻¹ en el espectro del agua.

Hay que hacer notar, que, aunque la interacción por puentes de hidrógeno forma un enlace no covalente (O-H), su energía de enlace es menor que la mostrada por el enlace covalente (O-H) en la molécula de agua (ver Figura 8.18). Ahora bien, suponiendo que los enlaces O-H de la molécula del agua, sin la presencia de enlaces puentes de hidrógeno, en el espectro de infrarrojo, alrededor de 3350, se podría observar un pico mucho más bajo, pero puntiagudo (véase representación en la Figura 8.17), claro esto es improbable que suceda, pero al menos nos da una idea de la gran influencia que tienen los enlaces puentes de hidrógeno en el espectro de la molécula de agua.



Figura 8.17 Espectro FTIR-ATR del agua líquida y la influencia de los enlaces puentes de hidrógeno.



Figura 8.18 En el agua el enlace covalente O-H es similar en intensidad de vibración que el enlace por puente de hidrógeno, O-H. Por lo tanto, su pico representativo aparece en la misma frecuencia en un espectro de infrarrojo.

En la Figura 8.19 pueden ser observados los espectros FTIR-ATR del agua y etanol, así como el espectro de una mezcla de agua y etanol (20y 80%, respectivamente). El espectro del agua muestra el pico más intenso en alrededor de 3300 cm⁻¹, el cual como ya hemos mencionado proviene de una vibración del enlace O-H y de una influencia muy importante producto del efecto de los puentes de hidrógeno que suceden entre las moléculas de agua. En el espectro de FTIR-ATR del etanol el pico ubicado a 3350 cm⁻¹, también proviene de un enlace O-H, pero solamente de la molécula del etanol. Sin embargo, en el espectro FTIR-ATR de la mezcla agua-etanol, se puede observar un aumento en la intensidad del pico a 3300 cm⁻¹ con relación al pico ubicado en esa misma posición en el espectro del etanol puro. El aumento del pico en la mezcla se debe a una combinación de dos tipos de enlaces O-H, uno del agua (80%) y otro de la molécula del etanol (20%), pero también tiene una contribución importante los enlaces puente hidrógeno (H---O) que se forman entre las moléculas del agua.



Figura 8.19 Espectros de FTIR-ATR de agua, etanol y etanol + agua



8.6.2 Efecto de los puentes de hidrógeno en una solución.

Figura 8.20 Espectros FTIR-ATR de fructosa y la representación molecular, (a) en polvo y (b) diluida en agua.

En la Figura 8.20a-b se muestran los espectros de infrarrojo de la fructosa en polvo y de fructosa diluida en agua. Los espectros de la figura presentan grandes diferencias entre si. El espectro de la fructosa en polvo (estado alto de agregación) muestra un número notorio de picos de gran intensidad entre 1500 y 650 cm⁻¹, así como en el intervalo entre 3700 y 2800 cm⁻¹ (Figura 8.20a). Por el contrario, en el espectro de la muestra de fructosa diluida en agua (sin agregación) se muestran tres picos perfectamente distinguibles, a 3335, 1650 y 1030 cm⁻¹, los cuales la primera y segunda se encuentran asociadas con enlaces provenientes de la

molécula del agua (O-H y H-O-H, respectivamente), mientras que la última se encuentra relacionada con enlaces de la molécula de fructosa (C-C, C-H, etc.) (Figura 8.20b). La diferencia espectral anterior se debe, en gran medida, a la manifestación de los enlaces puente de hidrógeno cuando se genera la dilución de la fructosa en polvo en agua. En esta mezcla no hay formación de iones, sino solamente se forman interacciones electrostáticas entre el agua y la molécula de fructosa debido a la formación de enlaces puentes de hidrógeno que mantienen separados a las moléculas de fructosa, tal y como se puede observar en la representación molecular mostrada en la Figura 8.20b.

8.6.3 La influencia de la sal (NaCl) en los enlaces puentes de hidrógeno.

La sal de mesa (cloruro de sodio) en estado sólido tiene una estructura cristalina iónica, en donde sus iones (Na⁺ y Cl⁻) se mantienen unidos mediante interacciones carga-carga (Figura 8.21). Carga se refiere al tipo de influencia de atracción o repulsión, positiva o negativa, que presenta un ion. Este tipo de interacción carga-carga es imposible observarla por espectroscopia infrarroja, debido a que no presenta un momento dipolar activo el enlace entre los iones.



Figura 8.21 Representación de la interacción molecular carga-carga entre los iones de la sal (Na⁺ y Cl⁻¹).



Figura 8.22 Representación de las interacciones moleculares entre los iones de la sal común y la molécula del agua.

Por otra parte, la sal de mesa diluida en agua presentará interacciones del tipo carga-dipolo, principalmente. La sal (NaCl), como sabemos en agua se descompone en iones Na⁺ y Cl⁻, entonces, ocurre una interacción molecular entre los iones y los dipolos de la molécula de agua, tal y como se representa en la Figura 8.22. Es decir, la zona negativa de la molécula agua con el ion Na⁺, mientras que su parte negativa con el ion Cl⁻. Además, en la solución los enlaces por puentes de hidrógeno entre moléculas de agua se siguen generando, tal y como se muestra en la figura. Este tipo de interacciones se posible inferirlas por espectroscopia infrarroja, tal y como se explica a continuación. En la Figura 8.23 se muestra el espectro de infrarrojo de una solución acuosa al 15% de NaCl, así como el espectro del agua como punto de comparación. En esta figura ambos espectros presentan los mismos picos de absorción, excepto que los picos en el espectro de la solución de sal sufrieron cambios con relación a su ubicación en el espectro del agua. Es decir, en el espectro del agua el pico ubicado a 3250 cm⁻¹ aparece recorrido hacia la izquierda aproximadamente a 3330 cm⁻¹ en comparación con el espectro de la solución salina, además. este pico sufrió un incremento en su altura con relación al pico del espectro del agua. Mientras tanto, el pico del espectro ubicado a 1645 cm⁻¹ (H-O-H) se elevó en el espectro de la solución salina.



Figura 8.23 Espectros FTIR-ATR del agua y de una solución de sal al 15%

Las diferencias espectrales mostradas en la Figura 8.23 se deben principalmente al cambio en la formación de los enlaces por puentes de hidrógeno. Esto es, cuando hay iones en solución, las moléculas de agua interaccionan con ellos, lo cual provoca menor interacción por puentes de hidrógeno entre moléculas de agua (Figura 8.22) y cuando estos iones no están presentes (agua sin sal) lógicamente las interacciones entre las moléculas de agua son

relativamente mayores. De ahí, las principales diferencias, principalmente en el pico asociado con el enlace O-H, a la izquierda de los espectros de la Figura 8.23.

8.6.4 Observación de la pérdida de puentes de H en una proteína.

En las proteínas el enlace puentes de hidrógeno se manifiesta de manera notable, ya que es el responsable de otorgarle a las proteínas su tipo de estructura secundaria (hélice o plegada), tal y como, ya fue mencionado en el capítulo anterior.



Figura 8.24 Espectros FTIR-ATR, con las curvas de deconvolución gaussiana, de una proteína sin (a) y con calentamiento (b) en la región entre 1750 y 1550 cm⁻¹.

Sin embargo, la proteína puede perder su estructura tridimensional original, ya sea por estar sometida a una temperatura excesiva o al interactuar con pH ácidos, así como por efecto de presiones mecánicas extremas. Esta pérdida conformacional en su estructura es conocida como la desnaturalización de proteína. La desnaturalización básicamente es originada por la eliminación de la interacción llevada a cabo por los puentes de hidrógeno. Una vez que una proteína se encuentra desnaturalizada puede llegar perder sus funciones biológicas, así como sus propiedades fisicoquímicas, tales como viscosidad o solubilidad. En un espectro FTIR-ATR es posible conocer el grado de participación de los enlaces puentes de hidrógeno en la estructura de una proteína. Por ejemplo, en la Figura 8.24a-b se muestran en el intervalo entre 1750 y 1550 cm⁻¹ los espectros de FTIR-ATR de la proteína nativa y de esta misma proteína, pero que fue sometida a un tratamiento térmico. En ambos espectros se observan las curvas gaussianas encontradas. En las gaussianas para cada uno de los casos se observa un pico alrededor de 1653 cm⁻¹, la cual se encuentra asignada a la vibración de estiramiento del enlace C=O de la molécula de la proteína (Amida I). Sin embargo, este mismo pico correspondiente al espectro de la proteína calentada sufrió un cambio en la intensidad de la gaussiana, al pasar de un valor de 0.10 a 0.07, lo que puede ser interpretado como un cambio en la estructura tridimensional de la proteína por efecto del calentamiento (desnaturalización), lo cual fue debido a la pérdida de enlaces por puentes de hidrógeno de manera intermolecular.

8.6.2 Interacciones moleculares en muestras sólidas

En el apartado anterior se habló de la detección por espectroscopia de infrarrojo de las interacciones moleculares en fase líquida y fue básicamente sobre las interacciones por puentes de hidrógeno. Ahora, toca el turno de observar las interacciones en muestras en estado sólido (polvos). En este estado los enlaces por puentes de hidrógeno también se manifiestan, así como otros tipos de interacciones electrostáticas. A menudo se hace una comparación entre el espectro de la mezcla física de los materiales utilizados (sin interacción molecular) y con el de la muestra donde se presume que hay algún tipo de interacción molecular. También se hace uso de los espectros de FTIR de los componentes de la mezcla para visualizar los picos involucrados en identificar dicha interacción. En la Figura 8.25a-d se muestra en forma general y representativa las posibles variaciones en los picos del espectro de infrarrojo en caso de existir o no algún tipo de interacción molecular en la muestra sólida analizada. En la Figura 8.25a, en caso de no existir una interacción molecular, el pico no tendrá cambio alguno, tanto en el espectro de la muestra solamente mezclada y en el espectro de la muestra tratada. Para el caso de existir interacción molecular, el pico seleccionado del espectro de la muestra tratada deberá tener cambios con respecto al pico del espectro de la muestra sin interacción, tal y como se muestran en la Figura 8.25b-d con una flecha. Hay un cambio de alrededor de 4 cm⁻¹ o más en la posición del número de onda en los picos (Figura 8.25b), el pico del espectro aparece relativamente ancho (Figura 8.25c) o la intensidad del pico decrece notablemente (Figura 8.25d), inclusive el pico podría llegar casi a desaparecer del espectro.



Figura 8.25. Representación del comportamiento de un pico en el espectro de infrarrojo que indicaría la formación (b, c y d) o no de interacciones moleculares (a). El pico en rojo es el espectro base (sin interacción) y la azul, representa el pico transformado, lo cual establece que hay interacción molecular. En (d) la línea punteada índica interacción total.

Una vez detectada las posibles variaciones en los picos del espectro de infrarrojo que infiera una interacción molecular, es muy importante asociar a la banda en cuestión con un tipo específico de enlace, por ejemplo, un grupo funcional carboxilo (C=O), hidroxilo (O-H) o amino (N-H del $-NH_3^+$).

8.6.3 La interacción carga-carga

El primer paso para identificar las interacciones carga-carga entre dos moléculas, en una muestra en estado sólido, es conocer los sitios potenciales donde ocurrirá dicha interacción. En un espectro de infrarrojo, estos sitios se identifican en cada uno de los espectros obtenidos de los materiales involucrados antes de su potencial interacción. Para ejemplificar este tipo de interacción se tomó como base la formación de un complejo (coacervado) con dos tipos de biopolímeros: quitosano y goma arábiga. En la Figura 8.26 se muestran los espectros FTIR-ATR de quitosano, goma arábiga y el complejo formado por ambos biopolímeros. Estos espectros fueron obtenidos en estado sólido (polvos). El espectro de quitosano mostró picos en 1635, 1535, 1405, 1150, 1070 y 1020 cm⁻¹. El espectro de la goma arábiga mostró picos en 1600, 1420, 1280 y 1020 cm⁻¹. Como resultado de la interacción de los biopolímeros el espectro de FTIR-ATR mostró cambios significativos en la región los grupos carbonilo-amida. El grupo NH₃⁺ a 1535 cm⁻¹ en el espectro de la goma arábiga, respectivamente, desaparecieron en el espectro
del complejo formado, lo cual indica que se presentó una interacción entre los grupos amino del quitosano (NH₃⁺) y los grupos carboxilo de la goma arábiga (COO⁻). En otras palabras, la nueva interacción formada, ya no absorbe radiación infrarroja durante el ensayo FTIR, y por ende sus picos en el espectro de la muestra, a determinada posición, se modifican con respecto a los picos (o pico, en su caso) en los espectros de los componentes individuales ubicados en la misma posición. En la Figura 8.27 se muestra una representación gráfica de la interacción entre las cargas del quitosano (NH₃⁺) y de la goma arábiga (COO⁻).



Figura 8.26 Espectros de FTIR-ATR de quitosano, goma arábiga y de coacervado de quitosano-goma Arábiga [13].

143



Figura 8.27 Representación de la interacción en solución (pH<6.5) entre quitosano (NH₃⁺) y goma Arábiga (COO⁻).



8.7 Espectros FTIR-ATR de compuestos minoritarios en alimentos

Los alimentos, además de tener en mayor medida carbohidratos, lípidos o proteínas, también contienen varios compuestos en bajas proporciones, incluso algunos alimentos tienen cientos de este tipo de compuestos. Sin embargo, estos compuestos minoritarios les confieren a los alimentos distintas propiedades nutricionales, sensoriales o bioactivas.

En la espectroscopia de infrarrojo es común analizar los compuestos minoritarios encontrados en los alimentos previamente llevando a cabo un proceso de extracción especifico, con el propósito de que no aparezcan en la señal espectral buscada, picos de otros compuestos mayoritarios u otros compuestos minoritarios, lo cual dificultaría su interpretación.

En las Figuras 8.28-8.31 son mostrados espectros de FTIR-ATR de compuestos minoritarios presentes en distintos alimentos: cúrcuma (curcumina), chile (capsaicina) y café (ácido clorogénico) y un compuesto comúnmente encontrado en distintos alimentos procesados en relativamente bajas proporciones: el ácido ascórbico.



Figura 8.28 Fórmula y espectro FTIR-ATR de una muestra de curcumina.

La Figura 8.28 muestra el espectro FTIR-ATR de una muestra de curcumina. Este compuesto proviene de la cúrcuma, la cual es una raíz muy utilizada en la India en la comida tradicional. La curcumina tiene un sabor picante y suele utilizarse como colorante natural. El espectro de la curcumina muestra principalmente en la parte derecha (1750-500 cm⁻¹) los picos más intensos. El pico ubicado alrededor de 1640 cm⁻¹ se encuentra asociado con la vibración de estiramiento del enlace C=O. El pico más intenso se puede observar en 1510 cm⁻¹ y se puede asociar con el enlace C=C (estiramiento). El pico ubicado a 1260 cm⁻¹ se pueden asignar a

los enlaces de estiramiento de C-O y C-C y el pico alrededor de1125 cm⁻¹ con el enlace C-O-C. En la parte izquierda del espectro aparecen en forma poco intensa los picos relacionados con los enlaces de vibración de estiramiento de C-H (2885 y 2765 cm⁻¹) y O-H (3375 cm⁻¹) en la molécula de la curcumina.



Figura 8.29 Fórmula y espectro FTIR-ATR de una muestra de capsaicina en polvo.

En la Figura 8.29 se muestra el espectro FTIR-ATR de la molécula de capsaicina. La capsaicina es el compuesto que le confiere el característico picor a los chiles (*Capsicum*). En el espectro de la capsaicina se pueden observar una serie de picos en la región de huella digital comprendida entre 1700 y 800 cm⁻¹. A 1645 cm⁻¹ se ubica un pico asociado con el enlace C=O (estiramiento). El pico alrededor de 1514 cm⁻¹ se puede asignar al enlace C=C y C-N. Alrededor de 1462 cm⁻¹ aparece un pico que se puede asociar con la vibración de balanceo del enlace C-H. A la derecha del espectro aparecen una serie de señales ubicadas a 1276, 1235, 1152, 1122, 1033 y 969 cm⁻¹, asignadas respectivamente a los siguientes enlaces C=C, C-O y C-C, C-O-C, C-O, C-OH y C=O. En la parte izquierda del espectro, aparecen una serie de picos asociados con la vibración de estiramiento del enlace C-H alrededor de 2995, 2922 y 2858 cm⁻¹. Alrededor de los 3300 cm⁻¹ se encuentra el pico asociado con la vibración de estiramiento del enlace O-H. En la parte central del espectro de la capsaicina aparece entre 2400 y 2300 cm⁻¹ una intensa señal, la cual es considerada residual asociada con la molécula de CO₂, ya que viene del background del aire ambiente y que en este caso en particular fue difícil eliminar totalmente debido a que la muestra fue en forma de polvo. Por otro lado, en la Figura 8.30 se muestra el espectro FTIR-ATR de una muestra de ácido clorogénico de alta pureza. El ácido clorogénico es un compuesto encontrado principalmente en granos de café y en varios tipos de plantas. Es un compuesto considerado como bioactivo por sus notables propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antibacteriales.





Figura 8.30 Fórmula y espectro FTIR-ATR de una muestra de ácido clorogénico.

En el espectro del ácido clorogénico se puede observar entre 1700 y 500 cm⁻¹ los picos más intensos de la molécula. Alrededor de 1680 cm⁻¹ aparece un pico que se puede asociar con el enlace C=O (estiramiento). El pico ubicado en 1627 cm⁻¹ se puede atribuir a la vibración del enlace C=C (estiramiento). El pico alrededor de 1605 cm⁻¹ se puede asignar al enlace C=C (estiramiento). Los picos ubicados a 1120, 1032 y 829 cm⁻¹ están asignados a los siguientes enlaces de vibración: C-O, C-OH y C=O, respectivamente. El pico ubicado a 3320 cm⁻¹ se puede atribuir a la vibración de estiramiento del enlace O-H de la molécula de ácido clorogénico.



Figura 8.31 Fórmula y espectro FTIR-ATR de una muestra de ácido ascórbico.

En la Figura 8.31 se muestra el espectro FTIR-ATR de una muestra de ácido ascórbico. Este compuesto, también conocido como la vitamina C, es un nutriente esencial para el ser humano, y el cual al no ser producido por el organismo debe de consumirse a través de otros alimentos. El ácido ascórbico se utiliza como aditivo en muchos alimentos, por ejemplo, en la industria de la panificación, conservas o confitería. En el espectro del ácido ascórbico los picos ubicados a 3520, 3400, 3315 y 3217 cm⁻¹ pueden ser asignados a la vibración de enlace del O-H (estiramiento). Mientras que el pico ubicado a 3014 cm⁻¹ es posible asignarlo a la vibración de estiramiento del enlace C-H. El pico a 1752 cm⁻¹ puede ser asignado al enlace C=O (estiramiento). A 1668 cm⁻¹ puede ser observado un pico relacionado con el enlace de vibración del enlace C=C (estiramiento). En 1320 cm⁻¹ aparece un pico que se encuentra relacionado con la vibración de balanceo del enlace C-H. Por último, alrededor de 1125 y 1028 cm⁻¹ aparecen picos asignados a los enlaces de vibración C-O-C y C-OH, respectivamente.

Referencias

1. Arvanitoyannis, I. S., Chalhoub, C., Gotsiou, P., Lydakis-Simantiris, N., Kefalas., Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **45**, 193-203, (2005).

2. Davis, A., Fears, T., Back to basic: The principles of principal component analysis, Spectroscopy Europe, 20-23 (2004).

3. Geladi, P., Sethson, B., Nyström, J., Lillhonga, T., Lestander, T., Burger, J., Chemometrics in spectroscopy Part 2. Examples: A Review, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, **59**, 1347-1357 (2004).

4. Geladi, P., Isaksson, H., Lindqvist, L., Esbensen, S., Principal component analysis of multivariate images, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, **5**, 209-220 (1989).

5. López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., Mendoza Díaz, G., Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**, 7835-7840 (2003).

6. Di Egidio, V., Sinelli, N., Giovanelli, G., Moles, A., Casiraghi, E., NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation, Europe Food Research and Technology, **230**, 947-955 (2010).

7. Wu, Z., Xu, E., Long, J., Zhang, Y., Wang, F., Xu, X., Jin, Z., Jiao, A., Monitoring of fermentation process parameters of Chinese rice wine using attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy, Food Control, **50**, 405-412 (2015).

 López Ramírez, J. E., Martín del Campo, S. T., Escalona-Buendía, H., García-Fajardo, J., Estarrón-Espinosa, M., Physicochemical quality of tequila during barrel maturation. A preliminary study, CyTA-Journal of Food, 11, 223-233 (2013).

9. Martín del Campo, S.T., Gómez Hernández, H.E., Gutiérrez, H., Escalona, H., Estarrón, M., Cosío Ramírez, R., Volatile composition of tequila. Evaluation of three extraction methods, CyTA – Journal of Food, 9, 152–159 (2011).

10. Muñoz-Muñoz, A.C., Grenier, A.C., Gutiérrez-Pulido, H., Cervantes-Martínez, J., Development and validation of a high-performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of aging markers in tequila, Journal of Chromatography A, **1213**, 218–223 (2008).

11. Muñoz-Rodríguez, D., Wrobel, K., Wrobel, K., Determination of aldehydes in tequila by high-performance liquid chromatography with 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization, European Food Research and Technology, **221**, 798-802 (2005).

12. Vallejo-Cordova, B., González-Córdova, A. F., Estrada-Montoya, C. M., Tequila volatile characterization and ethyl ester determination by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry analysis, Journal of Agricultural Food Chemistry, **52**, 5567–5571 (2004).

13. Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon, E. J., Lobato-Calleros, C., Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates, Carbohydrates Polymers, **79**, 541-546 (2010).

Glosario de términos

La definición de los términos que aparecen en este glosario involucra solamente algunos conceptos básicos relacionados con la técnica de espectroscopia de infrarrojo, los cuales pueden ser de gran utilidad, sobre todo, al nuevo lector que se interesa por su aplicación en el campo del análisis de alimentos y bebidas.

Bandeo (o balanceo). Vibración molecular originada por un cambio en el ángulo de un enlace.

Enlace covalente. Es la unión que se genera entre dos átomos por compartir dos o más electrones de sus capas más externas con el propósito de formar una molécula estable.

Espectro de infrarrojo. Gráfico donde se presentan las bandas o picos de la absorción en los enlaces de una muestra (eje Y) contra la longitud o número de onda en infrarrojo (eje X).

Espectro electromagnético. Representación organizada de las ondas electromagnéticas en función de su intensidad energética.

Espectrómetro de infrarrojo. Equipo donde se lleva a cabo la medición (interacción) entre una muestra y la radiación infrarroja.

Estiramiento. Vibración molecular originada por un cambio en la longitud de un enlace.

Frecuencia. El número de ciclos por segundo de una onda electromagnética.

La espectroscopia. La palabra viene de la raíz latina *spectrum* (apariencia) y de la palabra griega *skopia* (ver). Por la tanto, por definición la espectroscopia es la ciencia que estudia la interacción entre la luz y la materia.

La transformada de Fourier. Es un método matemático que convierte datos de un dominio a otro. En espectroscopia infrarroja transforma datos de distancia y frecuencia a datos de absorción y longitud de onda.

Longitud de onda. Es la distancia comprendida entre dos picos de una onda electromagnética.

Momento dipolar. Se define como la magnitud de la polaridad en un enlace, el cual se origina cuando dos átomos se encuentran enlazados químicamente, y sus electronegatividades son distintas. Es decir, el átomo de mayor electronegatividad atraerá a los electrones hacia él, dando lugar a la generación de dos cargas opuestas de enlace.

Muestra (para análisis FTIR). Es una parte, pequeña o mínima, que posee las mismas propiedades de homogeneidad que la muestra de donde proviene, a menudo de gran volumen. Esta muestra representativa debe de ser fácilmente colocada en el accesorio del espectrómetro.

Número de onda. Es el número de ondas electromagnéticas en una longitud de 1 cm, su símbolo es cm⁻¹.

Químico-métricos. Es la aplicación de métodos estadísticos al análisis de datos experimentales químicos. En el caso de la espectroscopia de infrarrojo, los datos son las intensidades de las absorbancias a cada frecuencia especifica que aparecen en un espectro.

Radiación infrarroja. Es un tipo de radiación con energía comprendida entre 13,000 y 100 cm⁻¹ (0.77 y 100 μ m) del espectro electromagnético. Para efectos de estudio se divide en tres intervalos: cercano, medio y lejano. Esta luz es invisible al ojo humano.

Región de huella digital. Patrón de picos de absorción en un espectro, en el infrarrojo medio, resultado de una serie de vibraciones originadas por un conjunto de enlaces atómicos pertenecientes a la muestra. En teoría, no habría dos regiones iguales asociadas a una muestra.

Región de grupos funcionales. Región de picos de absorción en un espectro originadas en los enlaces atómicos de los grupos funcionales que definen la naturaleza química de la muestra. Estas bandas tienen una posición especifica en el espectro respectivo.

Región del infrarrojo medio. La región del infrarrojo comprendida en el espectro electromagnético entre 4000 y 400 cm⁻¹

Reflexión total atenuada (ATR). Método de interacción basado en el fenómeno de reflexión interna total de la radiación infrarroja en una muestra líquida o sólida.

ANEXOS

Anexo A. Cartas de asignación de picos en espectros de infrarrojo

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación	
	Alcanos	
2960	Estiramiento C-H simétrico del metilo	
2930	Estiramiento C-H asimétrico del metileno	
2870	Estiramiento C-H asimétrico del metilo	
2850	Estiramiento C-H simétrico del metileno	
1470	Flexión C-H asimétrica del metilo	
1465	Tijereteo del metileno	
1380	Flexión C-H simétrica del metilo	
1305	Aleteo del metileno	
1300	Torsión del metileno	
720	Balanceo del metileno	
	Alquenos	
3100-3000	Estiramiento =C-H	
1680-1600	Estiramiento C=C	
1400	Flexión =C-H en el plano	
1000-600	Flexión =C-H fuera del plano	
	Alquinos	
3300-3250	Estiramiento =C-H	
2260-1200	Estiramiento C=C	
700-600	Flexión =C-H	

Tabla A1.	Bandas	infrarrojas	características	de	hidrocarburos

Tabla A2. Bandas infrarrojas características de compuestos aromáticos.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3100-3000	Estiramiento C-H
2000-1700	Sobre tono y bandas de combinación
1600-1430	Estiramiento C=C
1275-1000	Flexión C-H en el plano
900-690	Flexión C-H fuera del plano

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación		
	Alcohol y fenoles		
3600	Estiramiento O-H del alcohol		
3550-3500	Estiramiento O-H del fenol		
1300-1000	Estiramiento C-O		
	Éteres		
1100	Estiramiento C-O-C		
	Aldehídos y cetonas		
2900-2700	Estiramiento C-H del aldehído		
1740-1720	Estiramiento C=O del aldehído alifático		
1730-1700	Estiramiento C=O de la cetona alifática		
1720-1680	Estiramiento C=O del aldehído aromático		
1700-1680	Estiramiento C=O de la cetona aromática		
	Éteres		
1750-1730	Estiramiento C=O alifático		
1730-1705	Estiramiento C=O aromático		
1310-1250	Estiramiento C-O aromático		
1300-1100	Estiramiento C-O alifático		
	Ácidos carboxílicos		
3300-2500	Estiramiento O-H		
1700	Estiramiento C=O		
1430	Flexión C-O-H en el plano		
1240	Estiramiento C-O		
930	Flexión C-O-H fuera del plano		
	Anhídridos		
1840-1800	Estiramiento C=O		
1780-1740	Estiramiento C=O		
1300-1100	Estiramiento C-O		

Tabla A3. Bandas infrarrojas características de compuestos conteniendo oxígeno.

Tabla A4. Bandas infrarrojas características de las amidas.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3360-3340	Estiramiento asimétrico NH2 de la amida primaria
3300-3250	Estiramiento N-H de la amida secundaria
3190-3170	Estiramiento simétrico NH ₂ de la amida primaria
3100-3060	Sobre tono II de la amida secundaria
1680-1660	Estiramiento C=O de la amida primaria
1680-1640	Estiramiento C=O de la amida secundaria
1650-1620	Flexión NH2 de la amida primaria
1560-1530	Flexión N-H de la amida secundaria, estiramiento C-N
750-650	Aleteo N-H de la amida secundaria

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
2425-2325	Estiramiento P-H del éster y ácido fosfórico
2320-2270	Estiramiento P-H de la fosfina
1090-1080	Flexión PH ₂ de la fosfina
990-910	Aleteo P-H de la fosfina
2700-2100	Estiramiento O-H del éster y ácido fosfórico
1040-930	Estiramiento P-OH del éster fosfórico
1050-950	Estiramiento P-O-C asimétrico alifático
830-750	Estiramiento P-O-C simétrico alifático
1250-1160	Estiramiento P-O aromático
1050-870	Estiramiento P-O aromático
1450-1430	Estiramiento P-C aromático
1260-1240	Estiramiento P=O alifático
1350-1300	Estiramiento P=O aromático
1050-700	Estiramiento P-F
850-500	Estiramiento P=S
600-300	Estiramiento P-Cl
500-200	Estiramiento P-Br
500-200	Estiramiento P-S

 Tabla A5. Bandas infrarrojas características de compuestos fosforados.

Anexo B Posición y asignación de picos en un espectro de infrarrojo de los compuestos mayoritarios en alimentos o bebidas.

Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación
	Agua
3600-3200	Estiramiento del enlace O-H
~1645	Estiramiento de H-O-H
	Proteínas
1700-1600	Amida I. Estiramiento del enlace C=O (80%).
1565-1520	Amida II. Balanceo del enlace N-H (60%) y
	estiramiento del enlace C-N (40%).
	Lípidos
3000-2800	Estiramiento del enlace C-H
1745-1725	Estiramiento del enlace C=O
~967	Balanceo del enlace C=C-H
	Carbohidratos
3000-2800	Estiramiento del enlace C-H
1400-800	Acoplamiento de vibraciones de estiramiento
	y balanceo de enlaces C-C, C-O, C-O-C, etc.

Tabla B1. Resumen de los picos principales en los espectros de FTIR-ATR de los componentes mayoritarios en alimentos y bebidas.

Anexo C Momentos dipolares, enlaces de vibración y grupos funcionales de algunas moléculas.

Tipo de molécula	Estructura	Momento dipolar (D)*
Agua	на∽↓	1.83
Acetona	H₃C ↓ CH₃	2.72
Metanol	н <u></u> с_о_н	1.66
Dióxido de carbono	O = C = O	0
Monóxido de carbono	← C=0	0.12

Tabla C1.	Momentos	dipolares	de algunas	moléculas

 \ast Las unidades del momento dipolar son los debye (D), el cual es igual a 3.33564 x 10^{-30} coulomb metro.

Enlace	Momento dipolar (D)
С-Н	0.3
N-H	1.3
О-Н	1.5
C-0	0.7
C-N	0.4
C=O	2.4
C=N	1.4

Momentos dipolares de enlace

Enlace	~Posición (cm ⁻¹)	Intensidad y anchura de
		pico
C=O	1715	Fuerte
О-Н	3400	Fuerte y ancho
N-H	3500	Medio
C-0	1100	Fuerte
C=C	1650	Fuerte
С-Н	2900	Medio
C≡C	2150	Débil y aguda
C≡N	2250	Media y aguda

 Tabla C3. Algunas características de los picos espectrales asociados a grupos de enlace.



Figura C1. Algunos enlaces de vibración y su posición en un espectro de infrarrojo. Los enlaces ubicados en las regiones: 3500-2700, 1800-1600 y 1400-600 cm⁻¹ son comunes en muchos alimentos y bebidas.

Grupo funcional	Función o compuesto	Estructura
Hidroxilo	Alcohol	RH
Carbonilo	Aldehído	R H
	Cetona	R_1 C R_2 R_2
Carboxilo	Ácido carboxílico	
Grupo amino	Amina	— N
	Amida	H NH2

Tabla C4. Grupos funcionales de alguno compuestos comunes



Hoy en día la técnica de espectroscopia de infrarrojo es ampliamente usada en laboratorios de todo el mundo para la identificación de moléculas contenidas en una muestra, principalmente de naturaleza orgánica. Este libro abarca los principios fundamentales de la técnica de espectroscopia de infrarrojo y su aplicación en el análisis de alimentos y bebidas. Se hace énfasis en el uso del accesorio de reflexión total atenuada (ATR), como medio de interacción entre la muestra alimenticia y la radiación infrarroja proveniente del espectrómetro. Los capítulos que contiene el presente libro son los siguientes:

La química analítica

Las técnicas de análisis y la actualidad ambiental verde

Los principios de la espectroscopia de infrarrojo

El espectrómetro de infrarrojo

El accesorio de reflexión total atenuada (ATR)

Análisis de los espectros de infrarrojo

La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas

Aplicaciones selectas de la espectroscopia FTIR-ATR

El objetivo de la escritura de este libro fue con la intensión de plasmar un documento que sirviera de base para los estudiantes que se inician en el estudio de la química analítica, en el campo de la espectroscopia. También, se pensó que este libro fuera de utilidad para aquellos investigadores o profesionistas cuyo quehacer está relacionado con el análisis de alimentos y bebidas, pero que no conocen todavía los alcances de la espectroscopia de infrarrojo. Mi deseo es que sea de utilidad para todos ellos y, también, para el público en general interesado en temas científicos o tecnológicos.

Pedro Mondragón Cortez Unidad de Tecnología Alimentaria-CIATEJ, pmondragon@ciatej.mx

