

# 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.

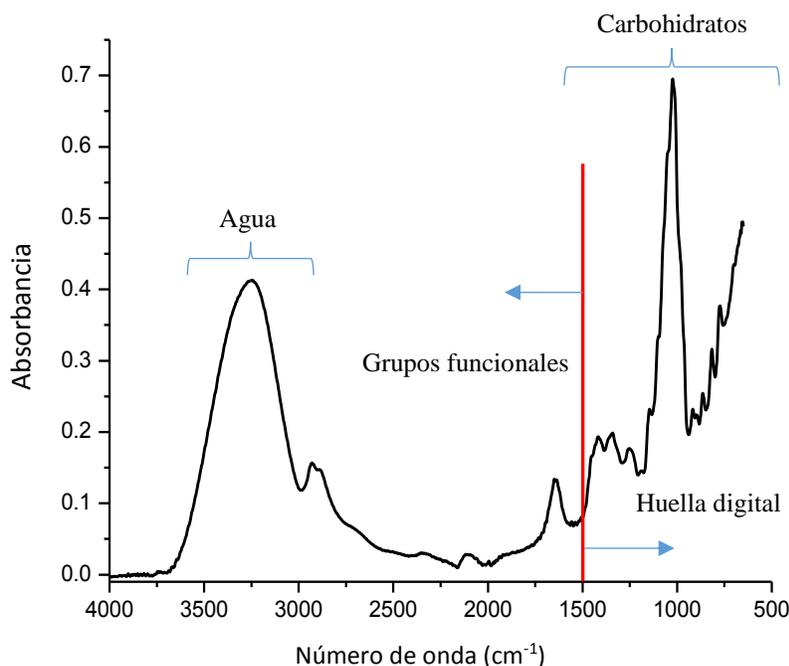


Figura 6.1 Espectro de infrarrojo de la miel de abeja

En el eje de las X's se encuentra indicada la intensidad de la radiación infrarroja, en número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) 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  $4000$  y  $1500 \text{ cm}^{-1}$ , 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  $500 \text{ cm}^{-1}$ , 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 específico 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  $1500 \text{ cm}^{-1}$  puede ser dividida 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 $\text{cm}^{-1}$ .

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  $\text{cm}^{-1}$ . 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 2800  $\text{cm}^{-1}$  con una apariencia menos amplia que el enlace O-H del agua. Entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  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  $\text{cm}^{-1}$ , la cual se debe a vibraciones de estiramiento del enlace O-H.

### 6.3.1.2 La región de 2500-2000 $\text{cm}^{-1}$ .

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,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{O}$  o  $\text{C}\equiv\text{N}$ .

### 6.3.1.3 La región de 2000-1500 $\text{cm}^{-1}$ .

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

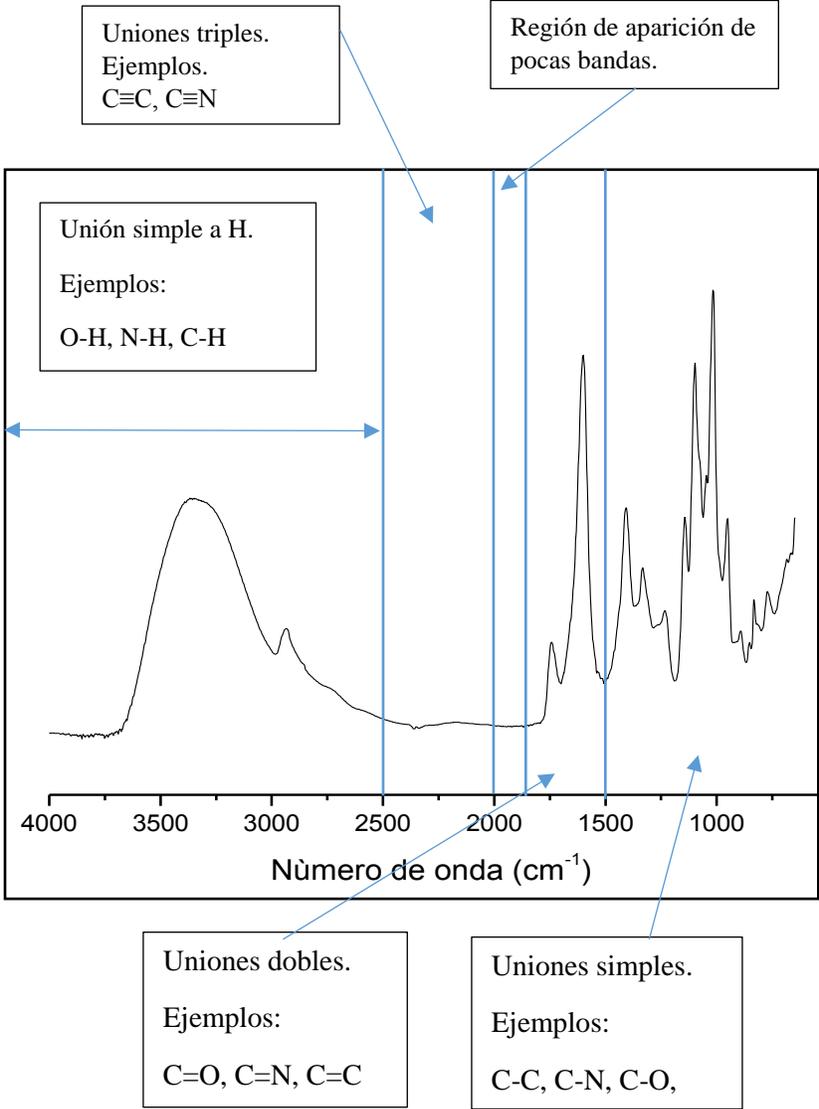
CONSEJO: El agua es un compuesto presente en la mayoría de los alimentos, por lo tanto, si la muestra tiene residuos, en esta zona se presenta una banda ancha alrededor de 1650  $\text{cm}^{-1}$ , la cual se debe a vibraciones de estiramiento del enlace H-O-H. En esta zona la presencia de esta banda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

### 6.3.2 La región de huella digital (1500-600 $\text{cm}^{-1}$ ).

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”.

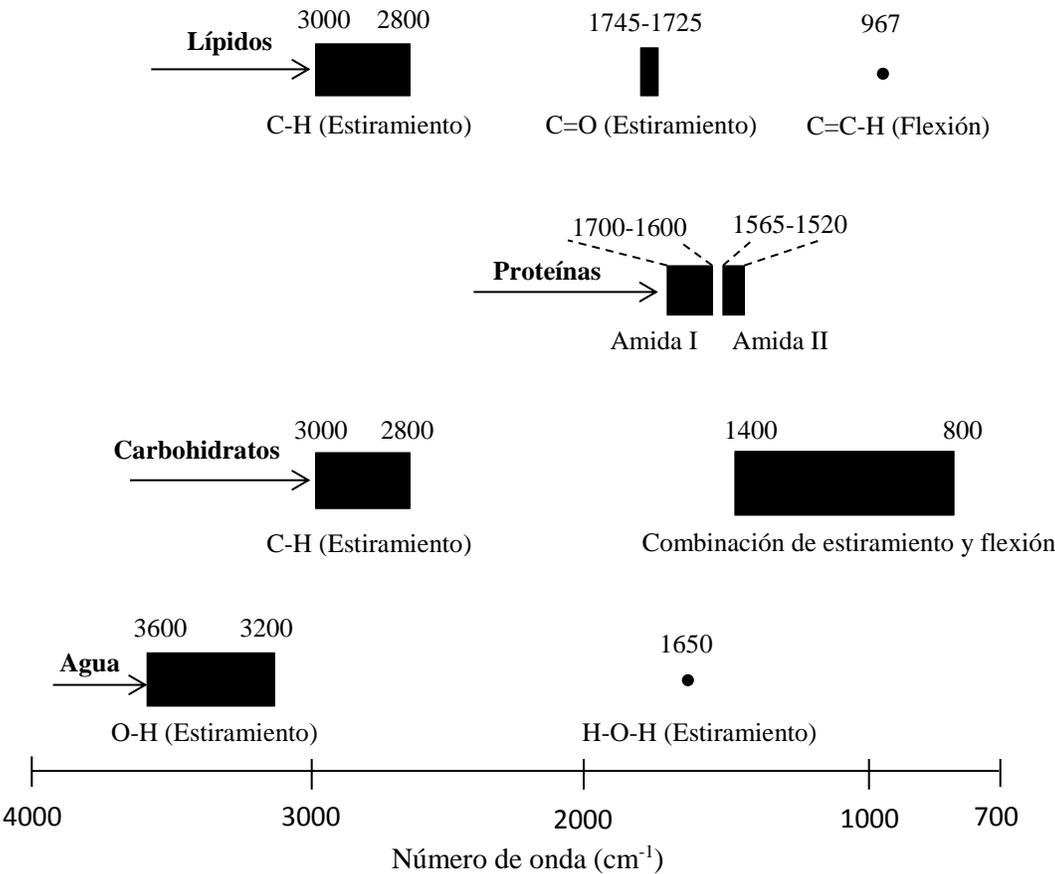
**CONSEJO:** La región de huella digital en muchos espectros es muy importante, ya que permite su identificación en forma rápida y clara. Por ejemplo, en la familia de los carbohidratos aparece un pico muy alto ente los 1100 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ , el cual cambia de posición en función del tipo específico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

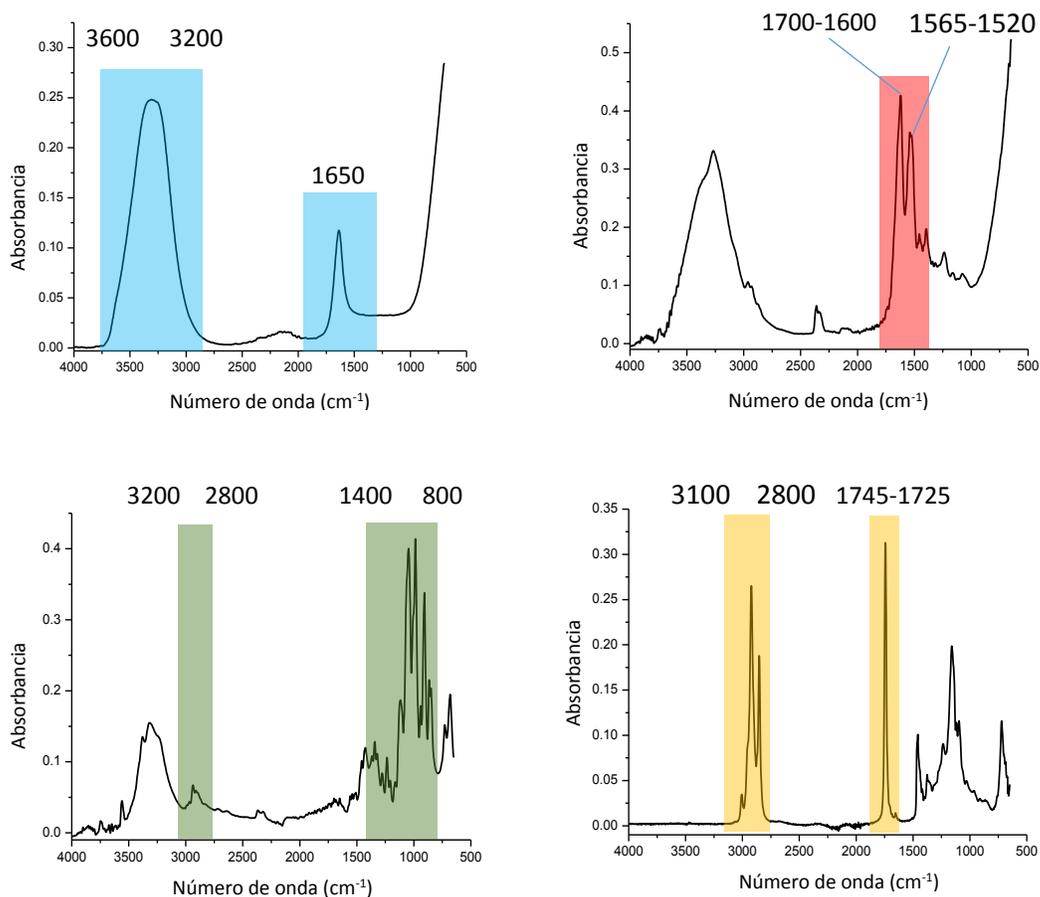
En la Figura 6.3 se muestran las regiones espectrales donde aparecen las bandas asociadas con los componentes mayoritarios en los alimentos (proteínas, carbohidratos y lípidos). También se muestra en la figura la posición de las bandas del agua, compuesto que aparece casi siempre en los alimentos [2-5].



**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).

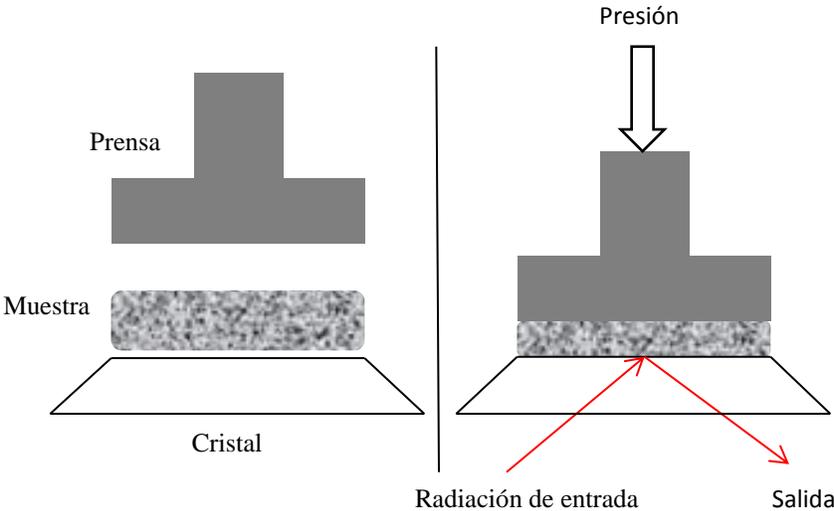
## 6.5 Factores que afectan la calidad de los espectros

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.

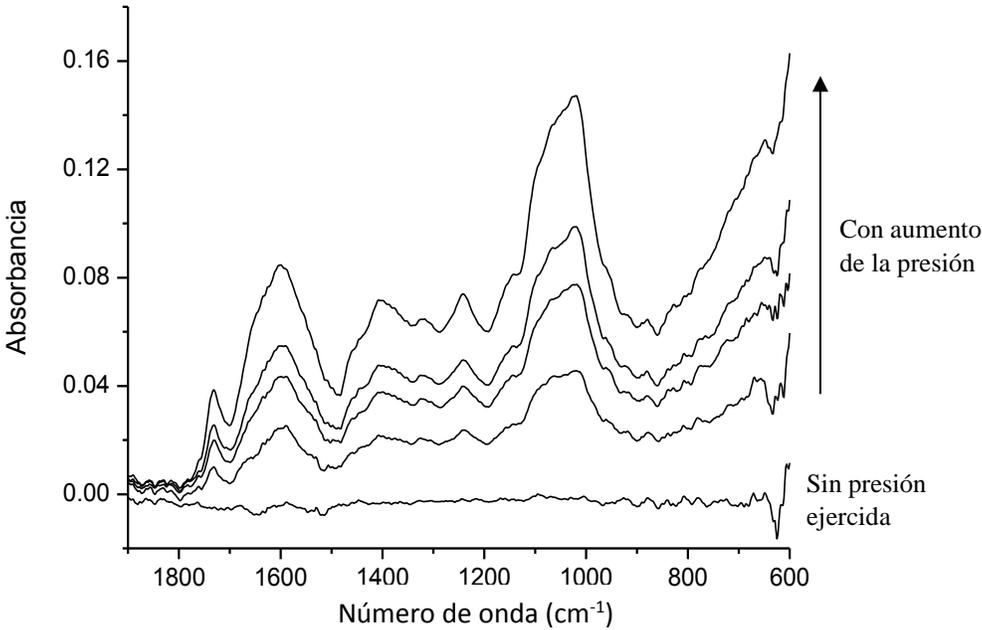
### 6.5.1 Calidad del contacto entre la muestra y el cristal del ATR

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

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.



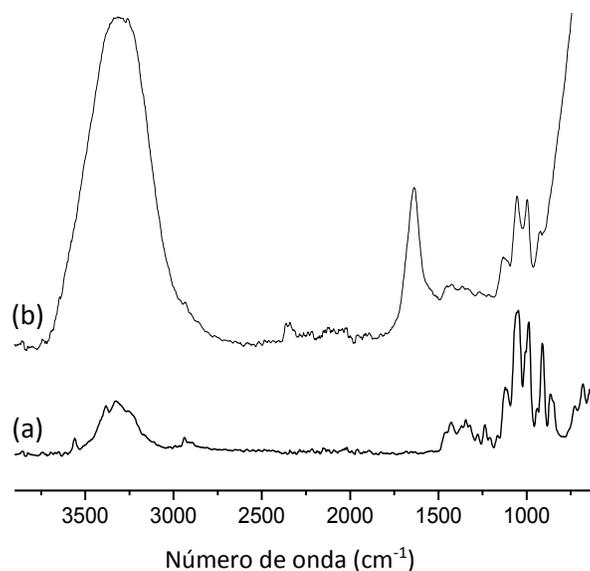
**Figura 6.6** Espectro de FTIR de una muestra de perejil en polvo en donde se observa el efecto de la intensidad de la presión aplicada sobre la muestra colocada en el accesorio de ATR

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  $\text{cm}^{-1}$ . Si comparamos esta región espectral con el espectro de la solución, se puede observar que banda del agua, ubicada aproximadamente a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , “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.

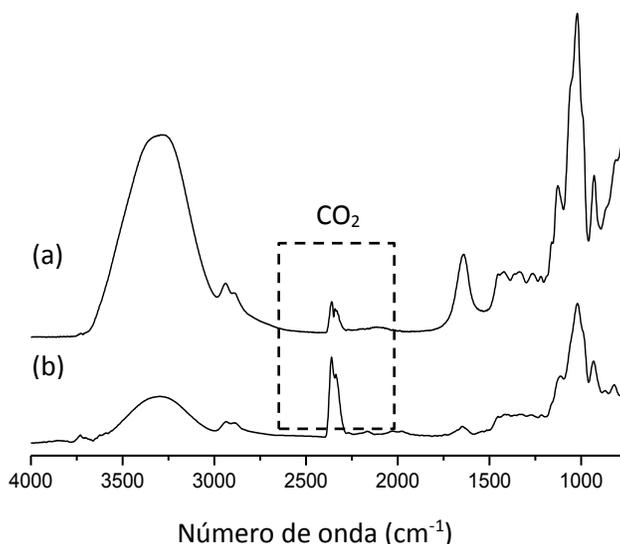


**Figura 6.7** Espectros de FTIR de muestras de sacarosa, (a) en forma de polvo fino y (b) en solución acuosa

En la región comprendida entre 3700 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  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 líquida 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  $\text{cm}^{-1}$ .

### 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

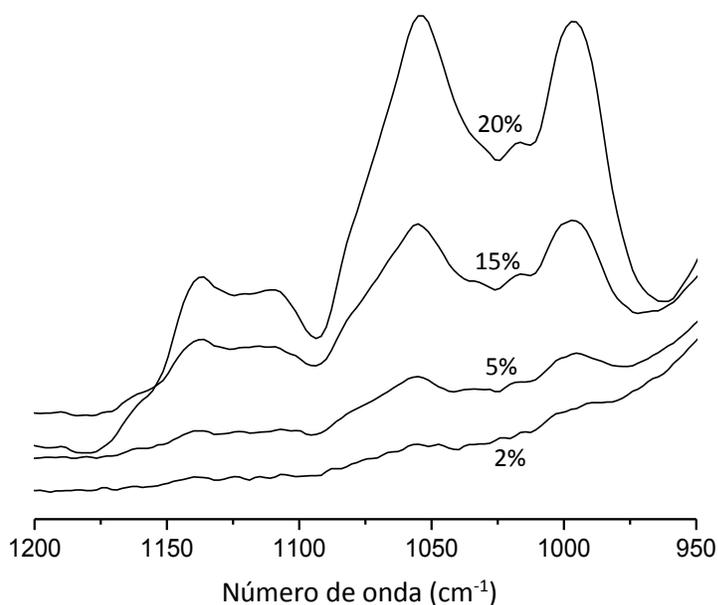
Desde hace tiempo, y en función de los modernos equipos de cómputo acoplados a los espectrómetros el *background* se resta automáticamente del espectro de FTIR de la muestra, y con ello se elimina la interferencia natural que tiene el haz de infrarrojo con el aire ambiente cada vez que se realiza la 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  $\text{cm}^{-1}$  (del  $\text{CO}_2$ ) sobre todo en muestras en forma de polvo, tal y como se puede observar en la Figura 1, debido principalmente a que parte del  $\text{CO}_2$  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 CO<sub>2</sub> 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.

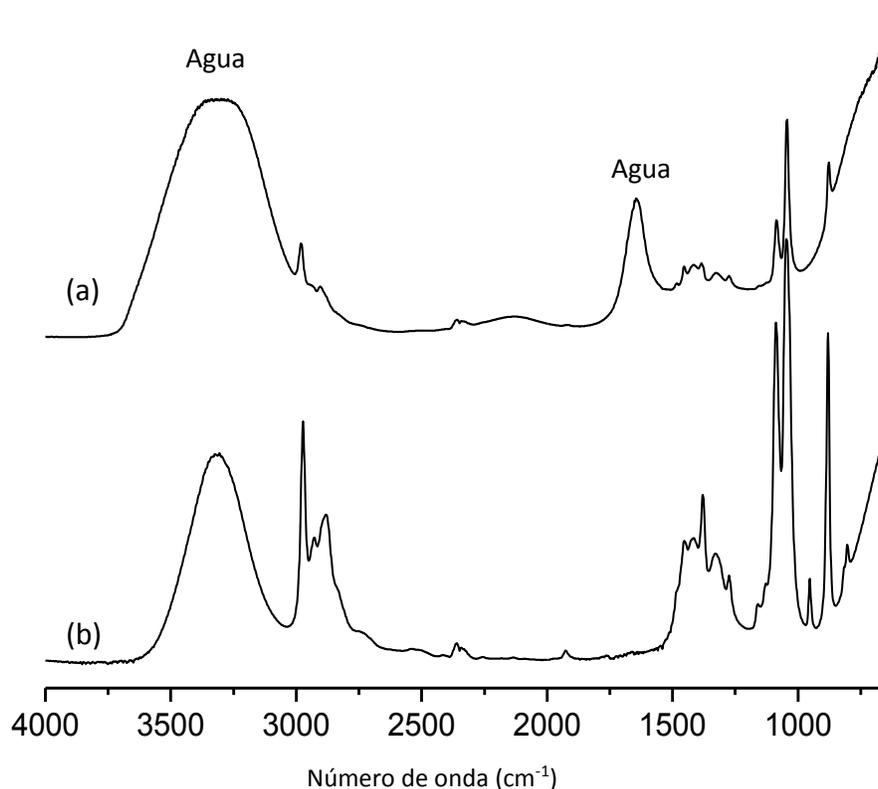


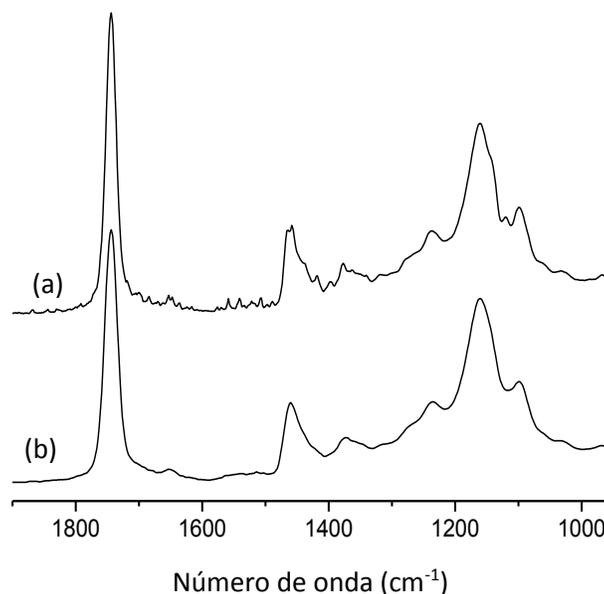
Figura 6.10 Espectros de FTIR de tequila (a) y etanol puro (b)

## 6.6 Tratamiento de los espectros obtenidos

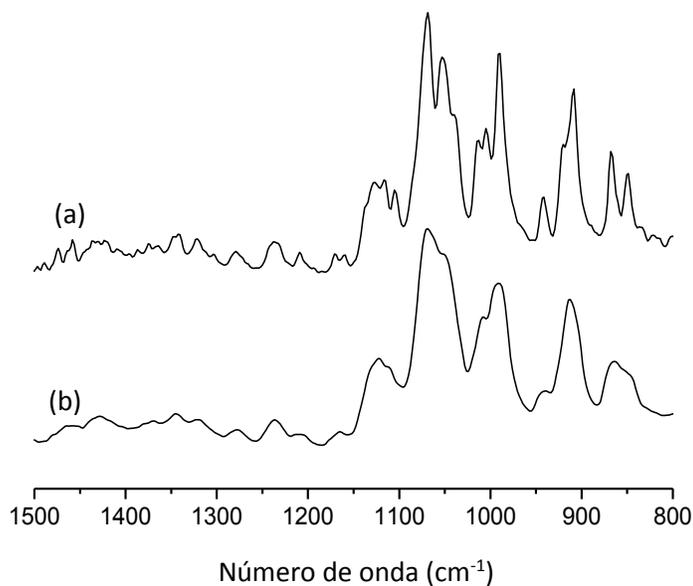
Hoy en día existen muchas técnicas de análisis disponibles para mejorar la interpretación de espectros de FTIR. A menudo los espectrómetros son manejados a través de un software de computadora. Este software tiene varias instrucciones para ayudar a resolver un espectro ya sea para un análisis cualitativo 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.



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

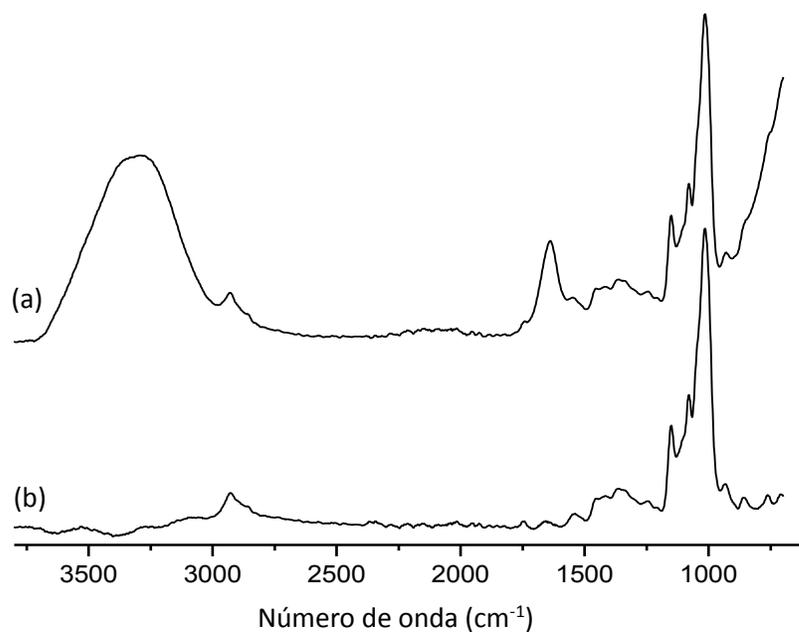


**Figura 6.12** Suavizado incorrecto de espectro de FTIR. (a) espectro original, (b) espectro suavizado incorrectamente

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

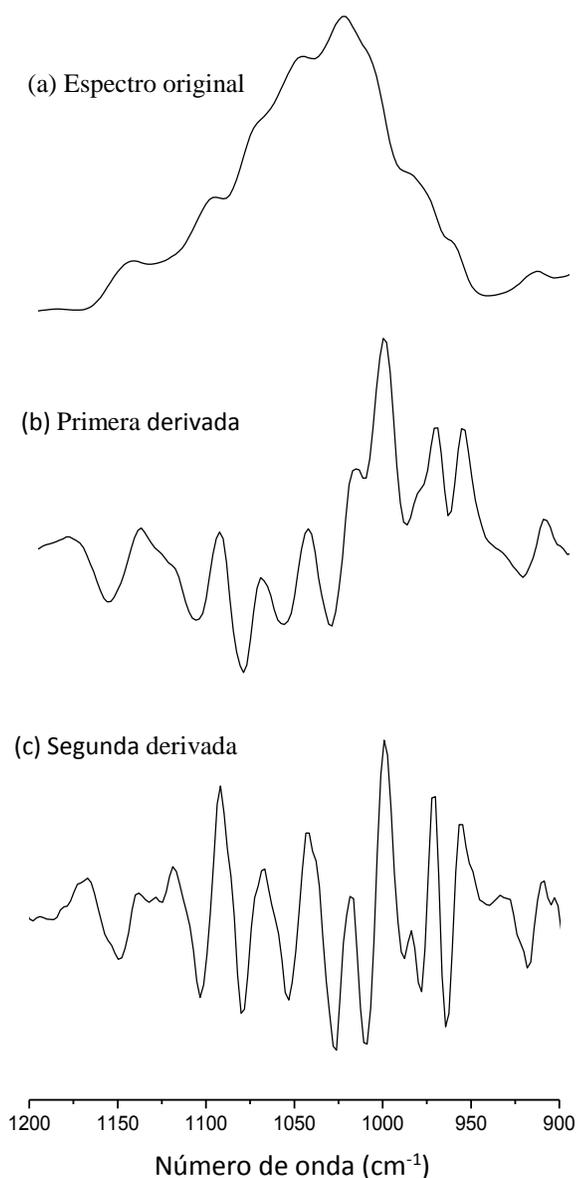
Este método consiste en extraer del espectro original de la muestra, la cual está formada por multi-componentes, el espectro de uno de los componentes individuales presentes en la muestra, y cuya señal a menudo puede obstruir bandas relacionadas con los otros componentes. El resultado de la sustracción 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) sustracción del espectro del agua

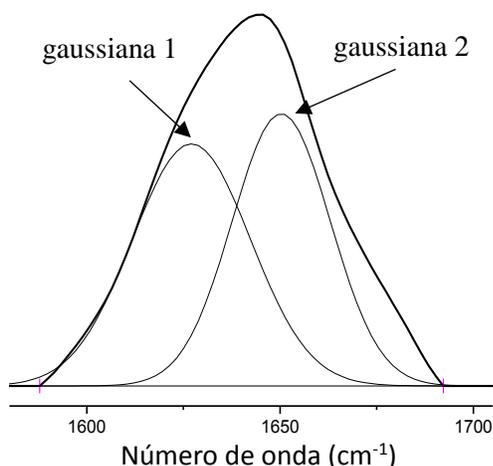
### 6.6.3 Transformación por derivadas

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 o cuantitativa.



**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

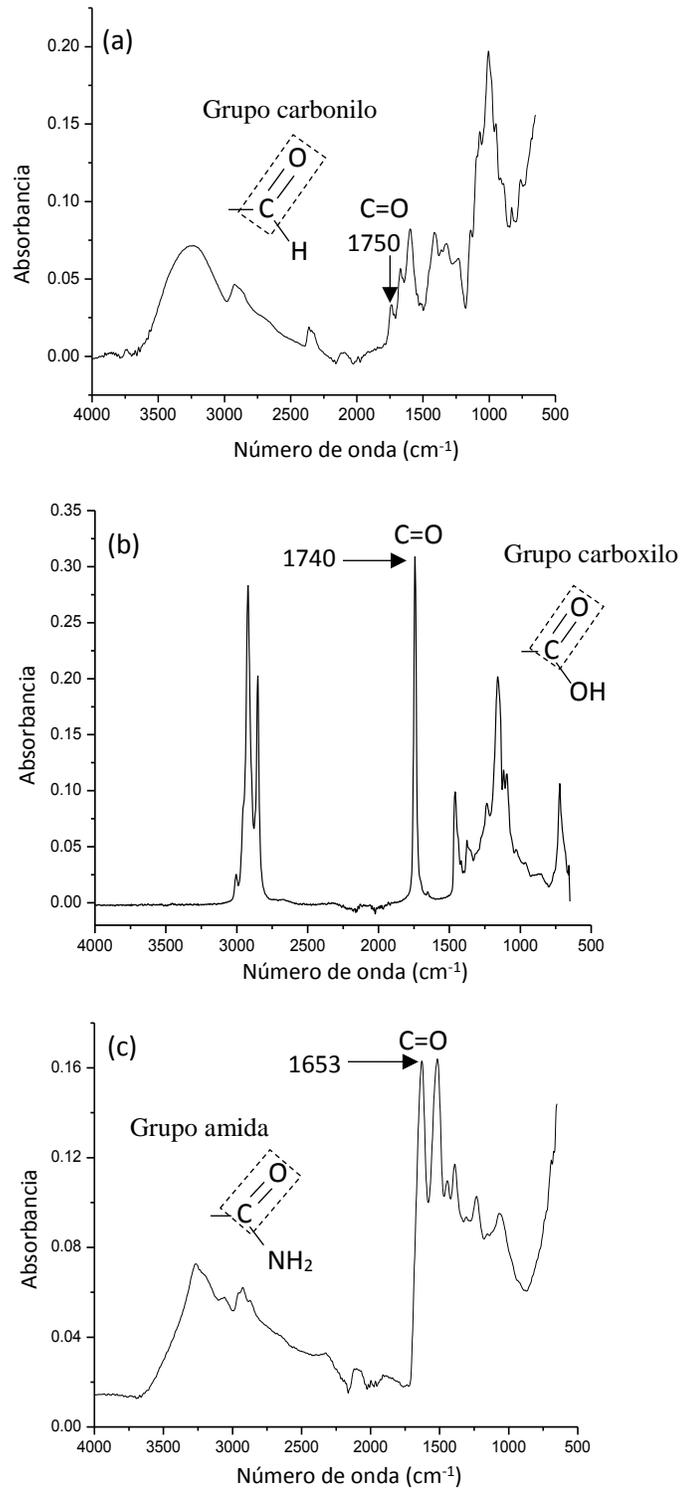


**Figura 6.15** Representación de un ajuste de curva de un pico extraído de un espectro. En este ejemplo se pueden observar dos curvas gaussianas resultantes.

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 en un pico de absorción obtenido en un espectro. En la figura se muestran dos 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  $\text{cm}^{-1}$ , 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).