

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 óptimas 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

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.

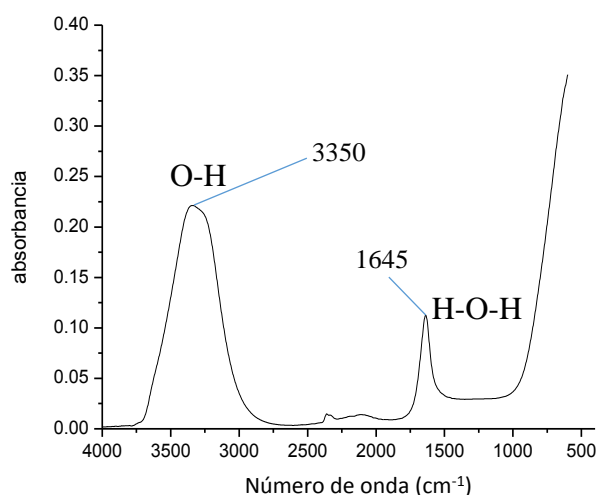


Figura 7.1 El espectro de FTIR-ATR del agua

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^{-1} aparece 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.

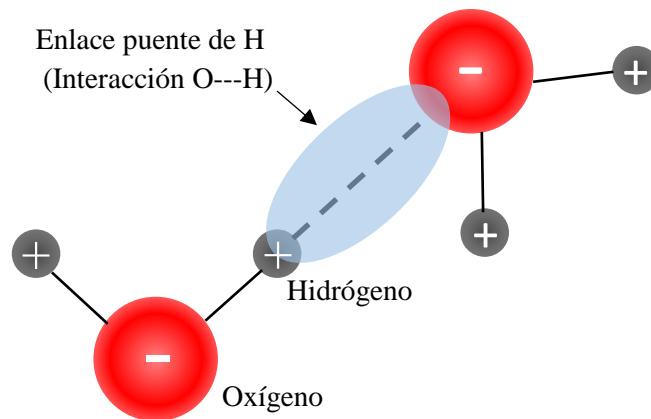


Figura 7.2 Representación del enlace puente de hidrógeno producido en una molécula de agua.

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 ($\sim 3350\text{ cm}^{-1}$) 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.

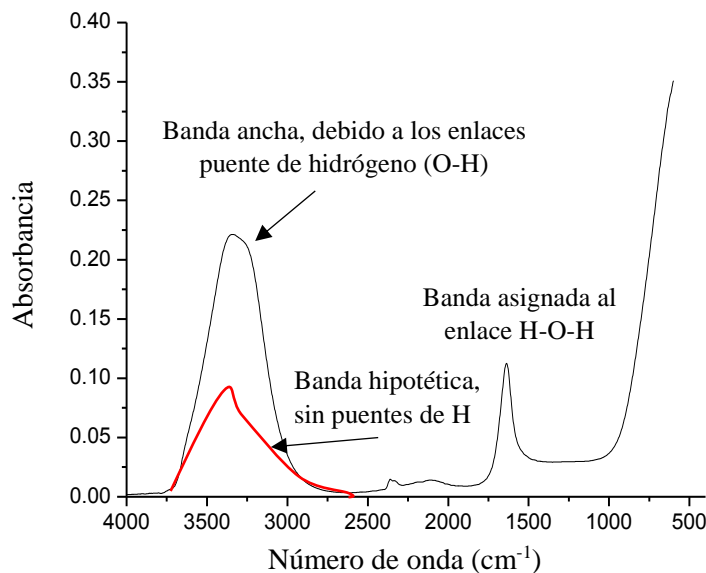


Figura 7.3 Espectro de infrarrojo del agua y la forma del espectro sin interacciones puentes de hidrógeno ($3700\text{-}2750\text{ cm}^{-1}$).

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.

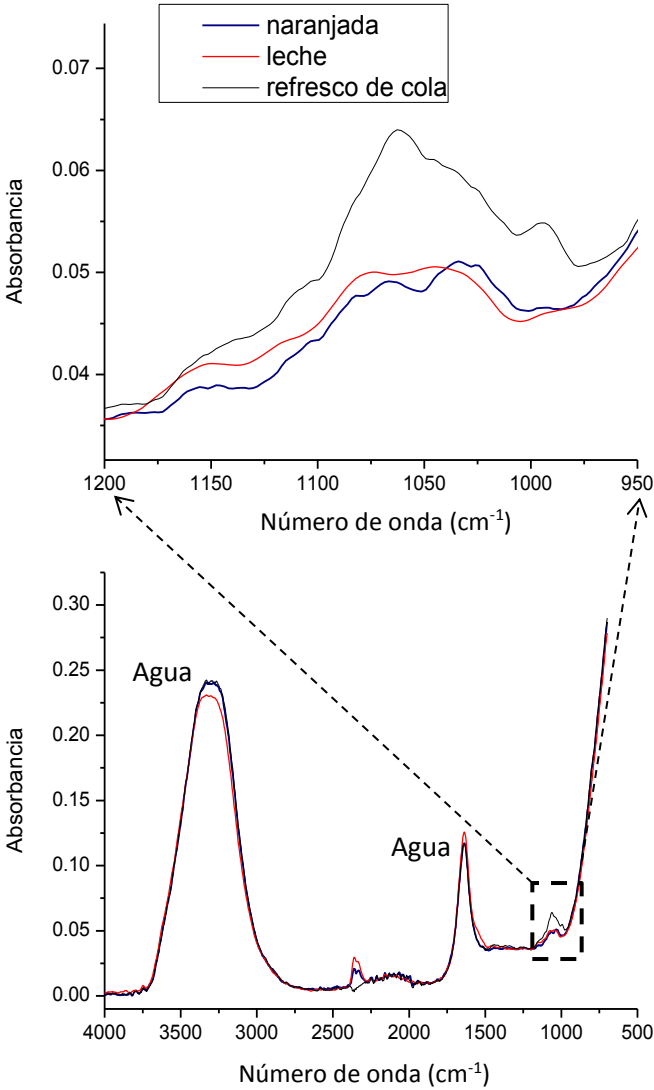


Figura 7.4 Espectros de FTIR-ATR de muestras de alimentos ricos en agua

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.

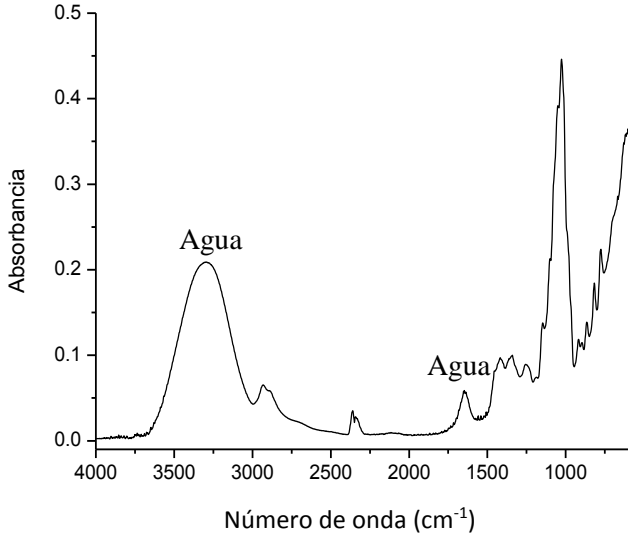


Figura 7.5 Espectro de FTIR-ATR de miel de abeja

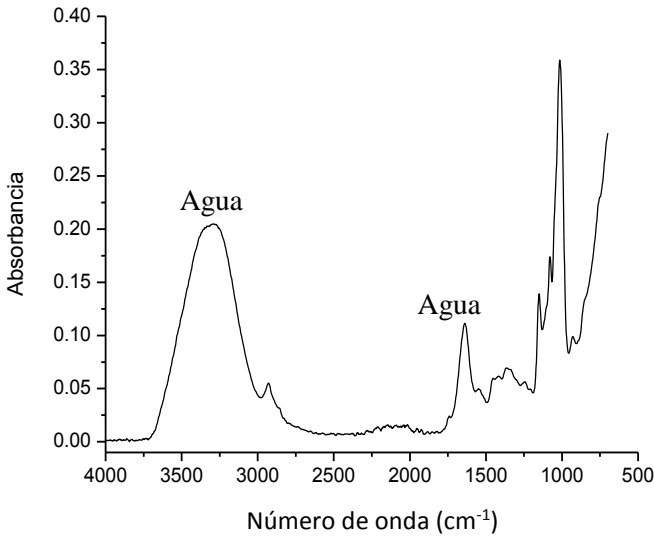


Figura 7.6 Espectro de FTIR-ATR de tortilla de maíz

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 contiene, lo cual hace que la configuración de los picos cambie en amplitud.

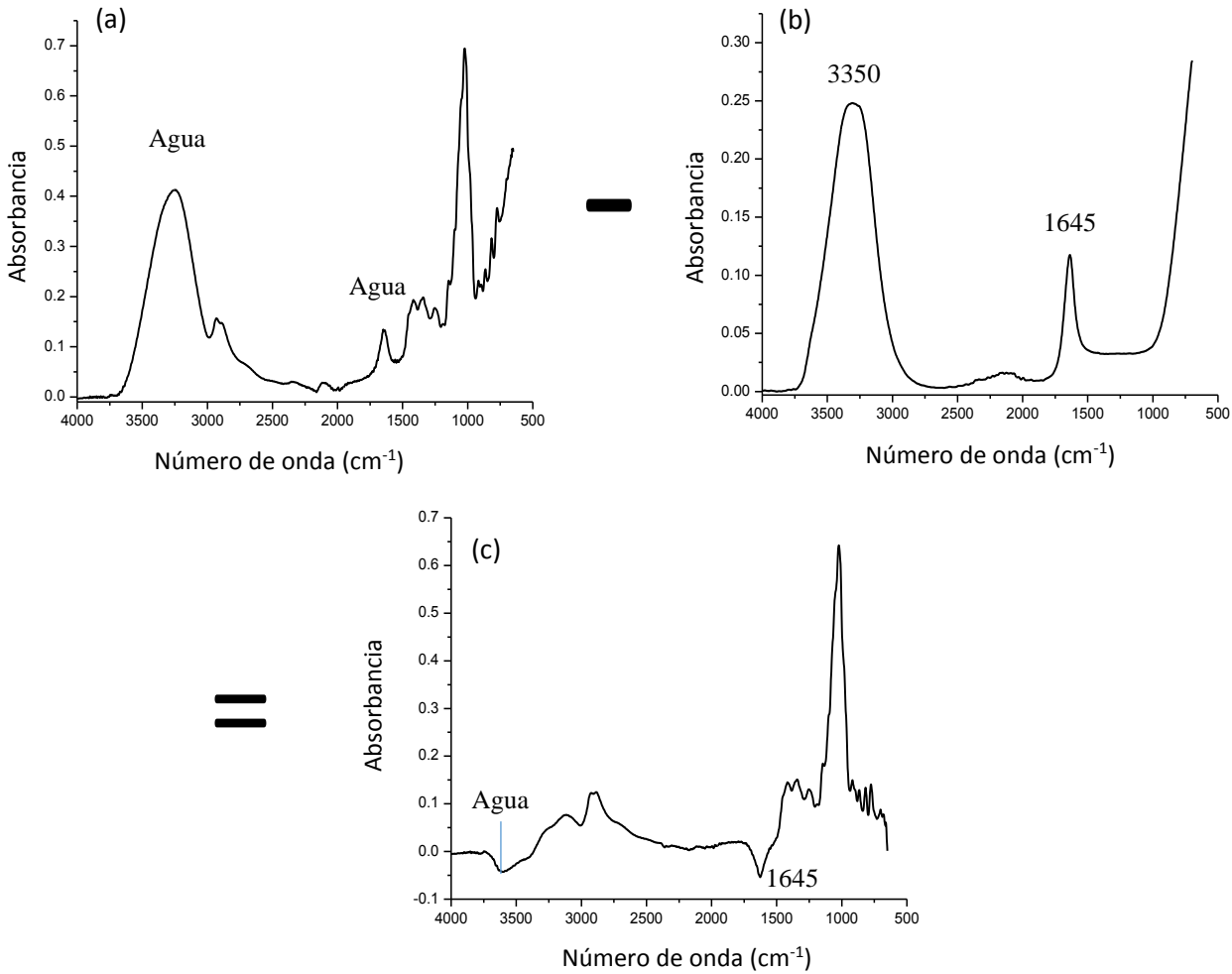


Figura 7.7 Secuencia de eliminación de los picos del agua de un espectro FTIR-ATR de miel de abeja, (a) espectro original de miel de abeja, (b) espectro del agua y (c) espectro de miel de abeja con sustracción espectral del agua.

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.

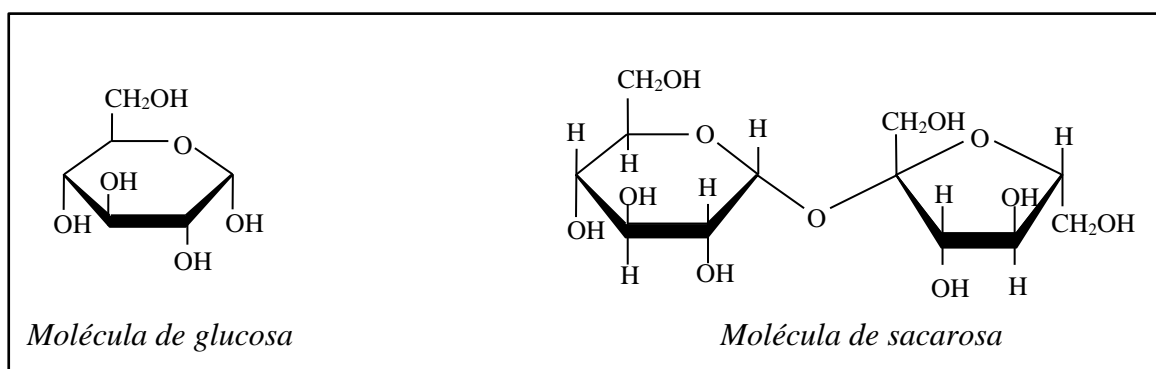


Figura 7.8 Tipos de carbohidratos (moléculas de glucosa y sacarosa)

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.

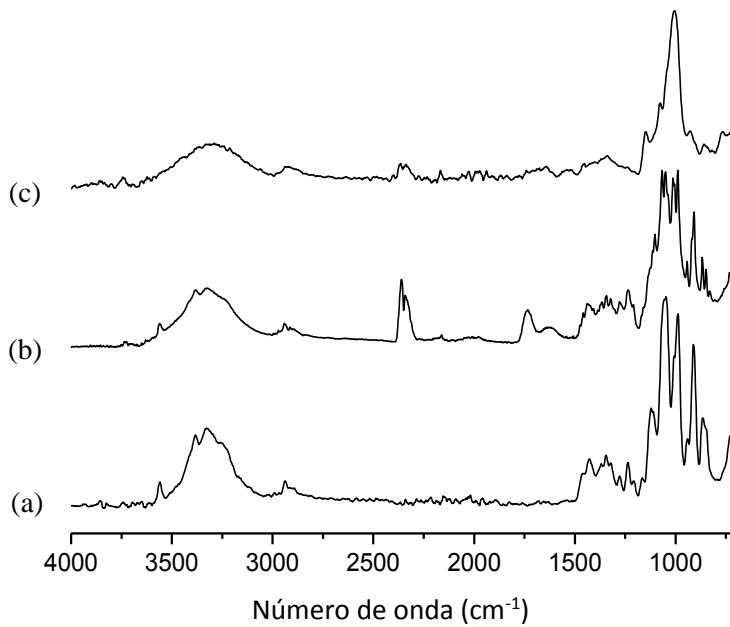


Figura 7.9 Espectros de FTIR-ATR de varios tipos de carbohidratos en polvo: (a) sacarosa, (b) pectina y (c) almidón de maíz.

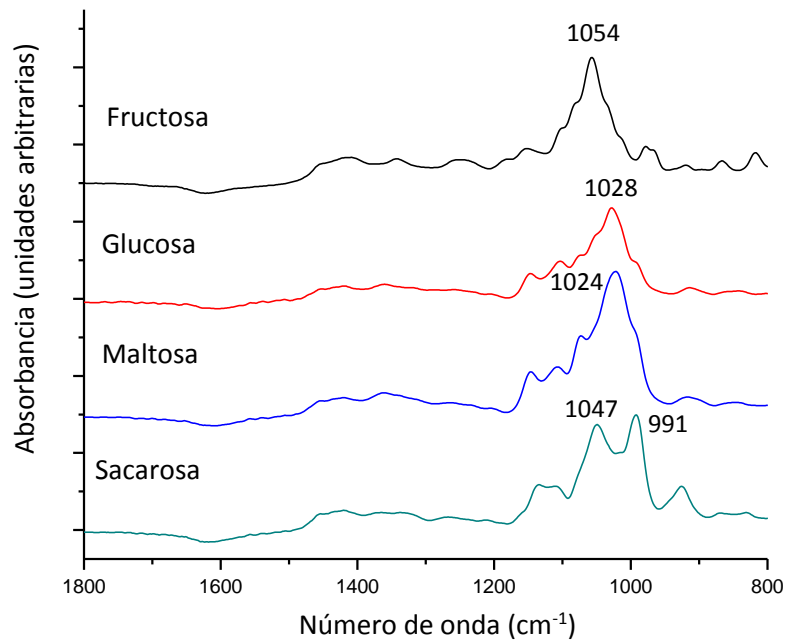


Figura 7.10 Espectros de FTIR-ATR de estándares de diferentes tipos de azúcares disueltos en agua entre el intervalo de 1800 y 800 cm^{-1} , después de la sustracción del espectro del agua. En la Tabla 1 se muestra la asignación de los principales picos. Nótese la diferencia en la posición de los picos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

En la Figura 7.10 son mostrados los espectros de FTIR-ATR de muestras acuosas de cuatro tipos de azúcares 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.

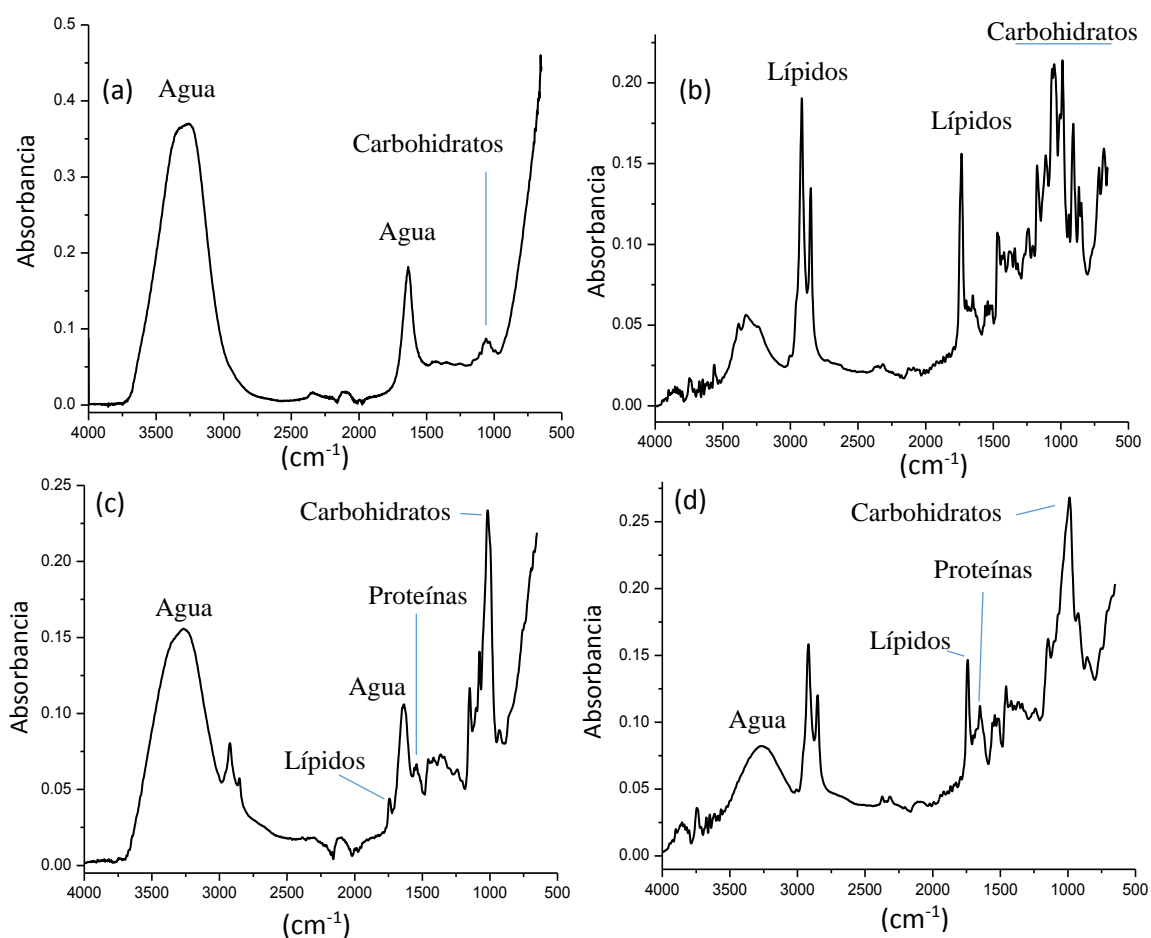


Figura 7.11 Espectros de FTIR-ATR de varios tipos de alimentos: refresco de cola (a), chocolate (b), pan de caja (c) y galleta (d). En estos espectros se puede apreciar claramente el pico de los carbohidratos en el intervalo de $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, a pesar de la aparición de picos asociados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

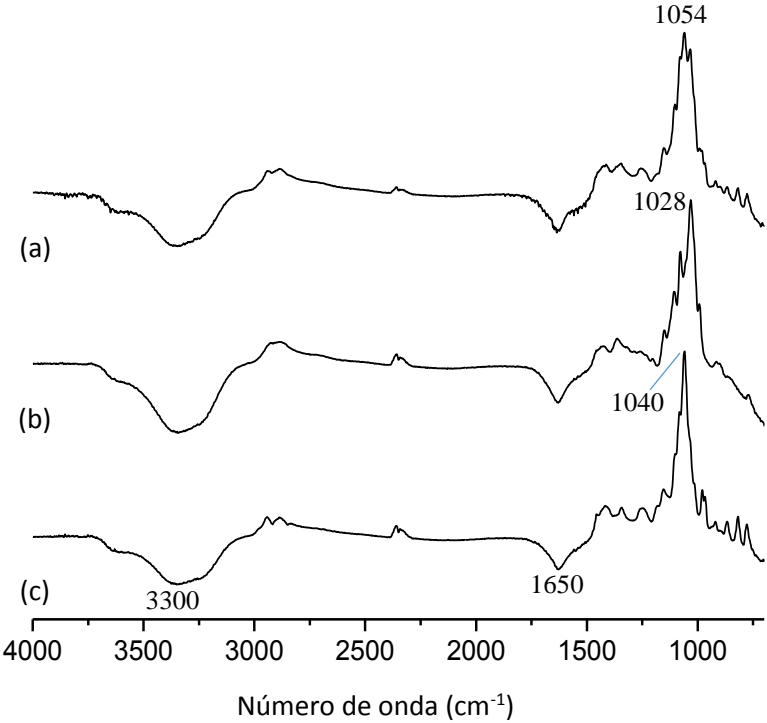


Figura 7.12 Espectros de FTIR-ATR de soluciones acuosas de (a) fructosa, (b) glucosa y (c) fructosa + glucosa, después de la extracción del espectro del agua.

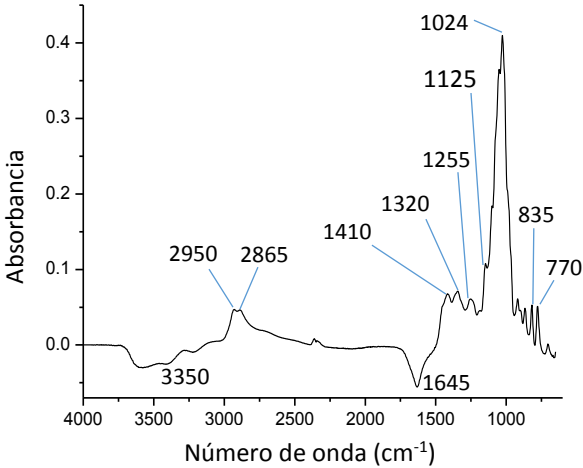


Figura 7.13 Espectro de FTIR-ATR de miel de abeja procedente del estado de Nayarit, después de la extracción del espectro del agua.

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 (NH_3^+) perteneciente a los amino 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^{-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).

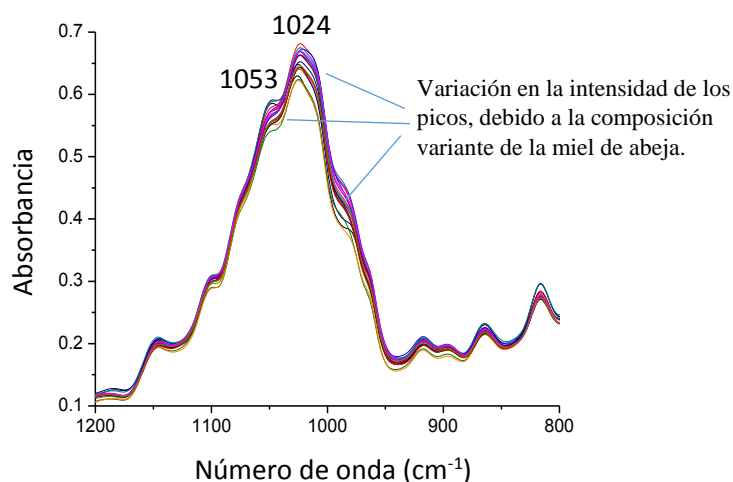


Figura 7.14 Superposición de espectros FTIR-ATR en el intervalo entre 1200 y 800 cm^{-1} de muestras de miel de abeja procedente de varias regiones del Estado de Jalisco.

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

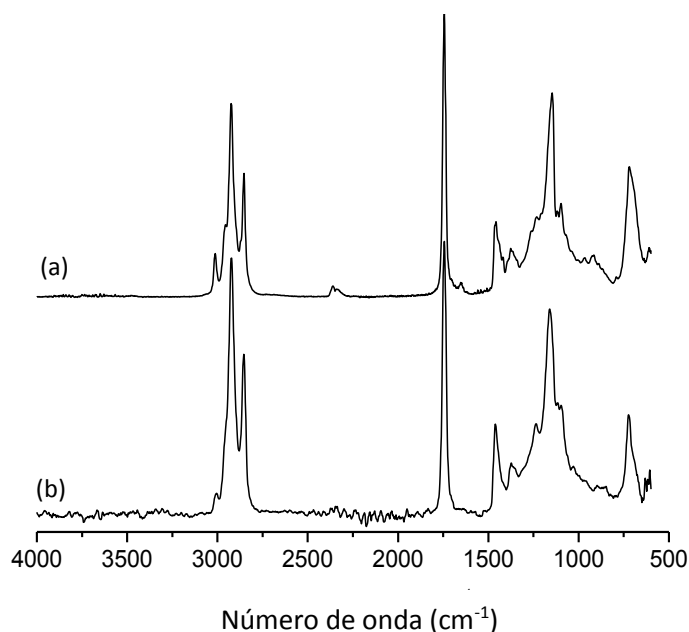


Figura 7.15 Espectros de FTIR-ATR de muestras de aceite, (a) de oliva y (b) de pescado

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.

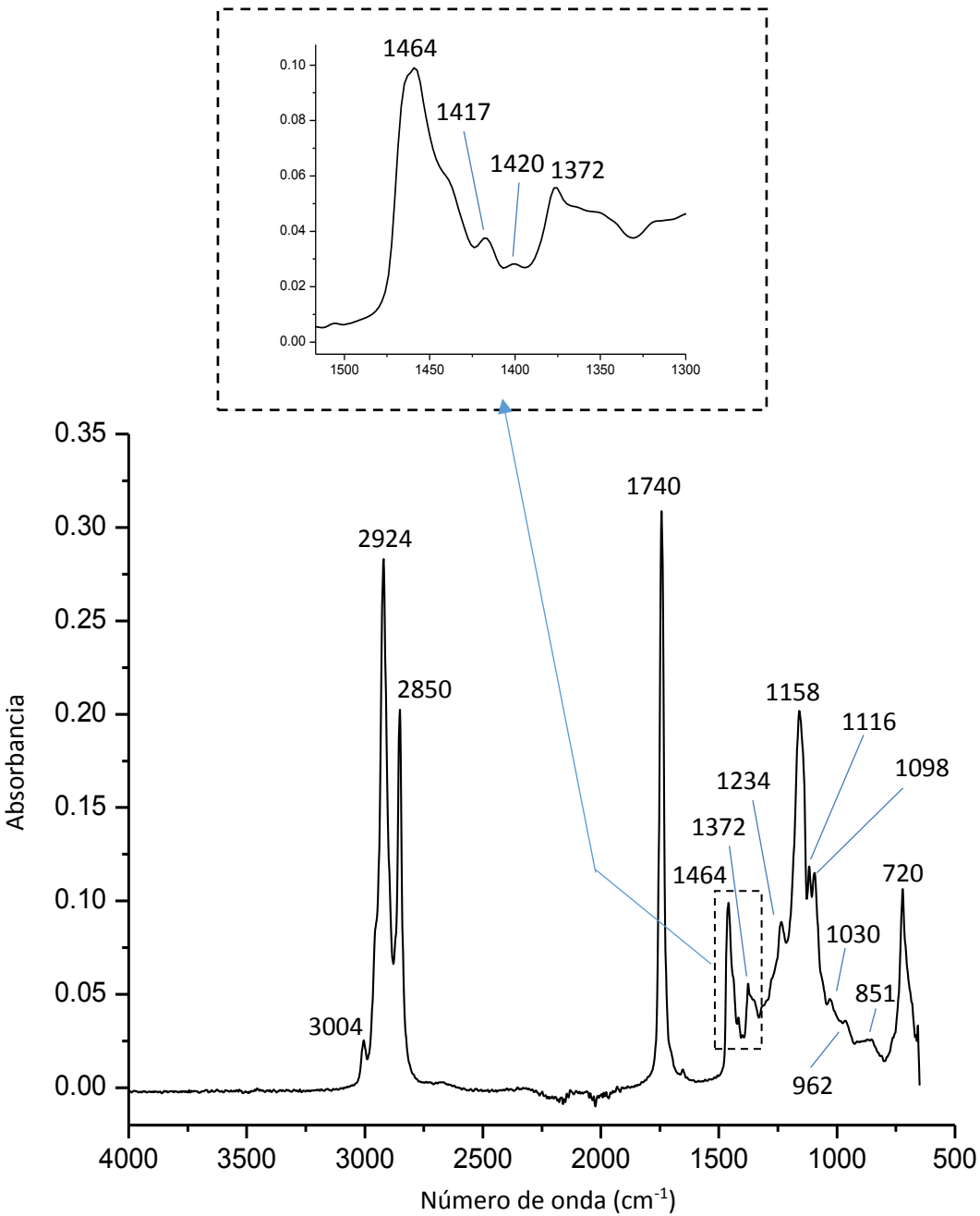


Figura 7.16 Espectro de FTIR-ATR de un aceite de oliva extra virgen

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.

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

| 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, flexión. |
| 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) |

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.

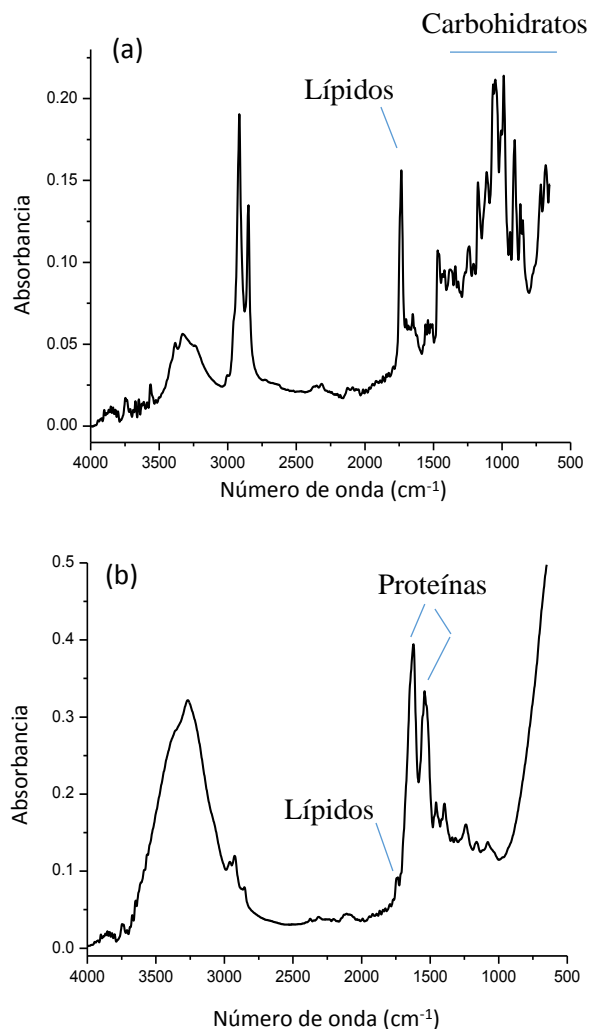


Figura 7.17 Identificación de los lípidos en espectros de FTIR-ATR de dos tipos de alimentos: chocolate (a) y carne asada (b).

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.

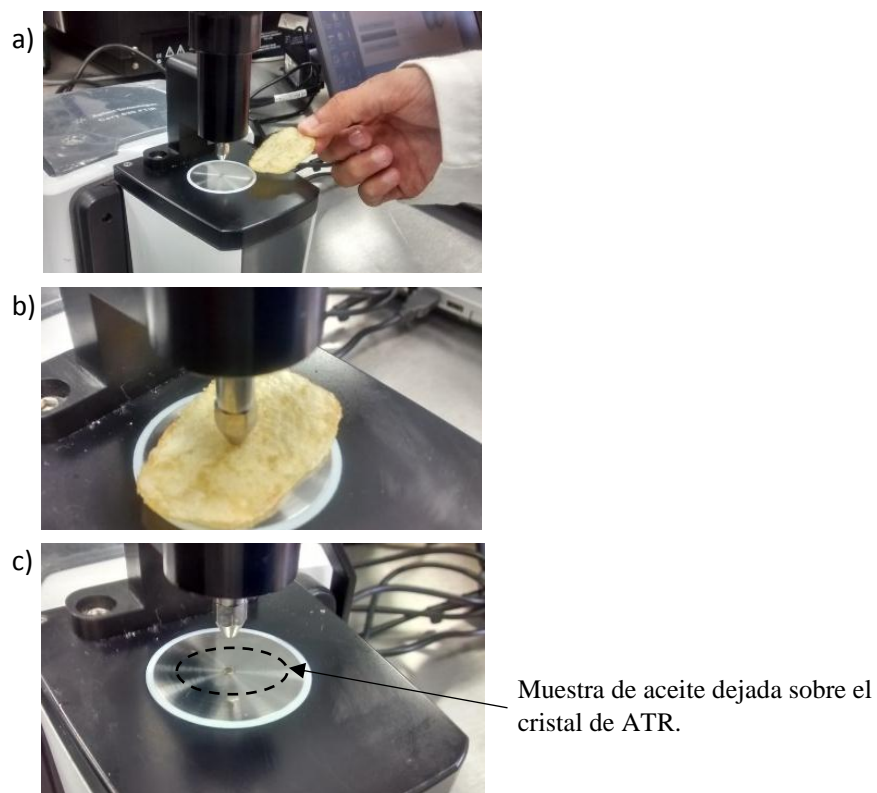


Figura 7.18. Secuencia de colocación en el accesorio de ATR de una papa frita para la obtención del espectro de FTIR del aceite contenido en la superficie de la papa.

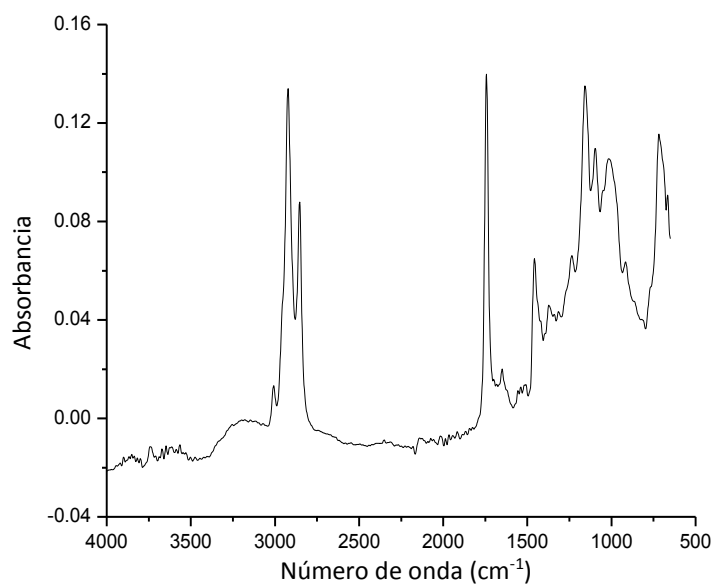


Figura 7.19. Espectro de FTIR-ATR de una muestra de aceite proveniente de la superficie de una papa frita comercial.

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 trioleína (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 trioleína/trielaidina. La curva de calibración se realiza leyendo la absorbancia a 966 cm^{-1} para cada una de las mezclas seleccionadas (Figura 7.21).

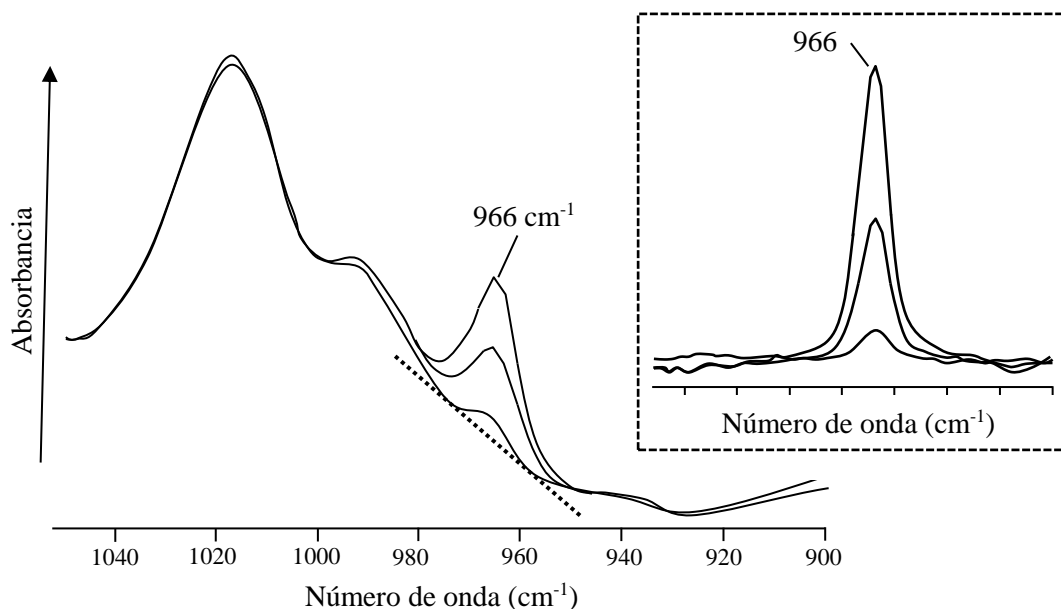


Figura 7.20 Espectro FTIR-ATR de un aceite vegetal en la región entre 1050 y 900 cm^{-1} . El recuadro muestra la zona del pico a 966 cm^{-1} con ajuste a línea base.

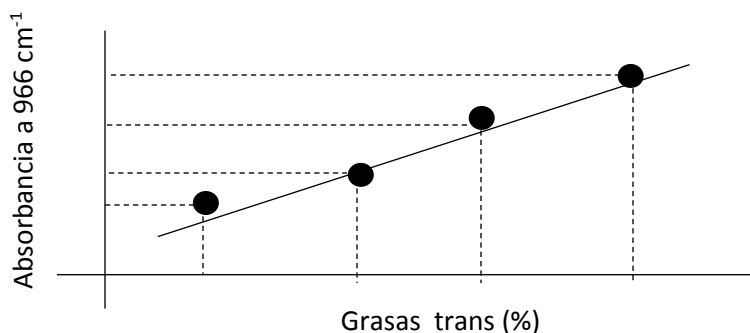


Figura 7.21. Ejemplo de curva de calibración para determinar grasas trans en alimentos

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.

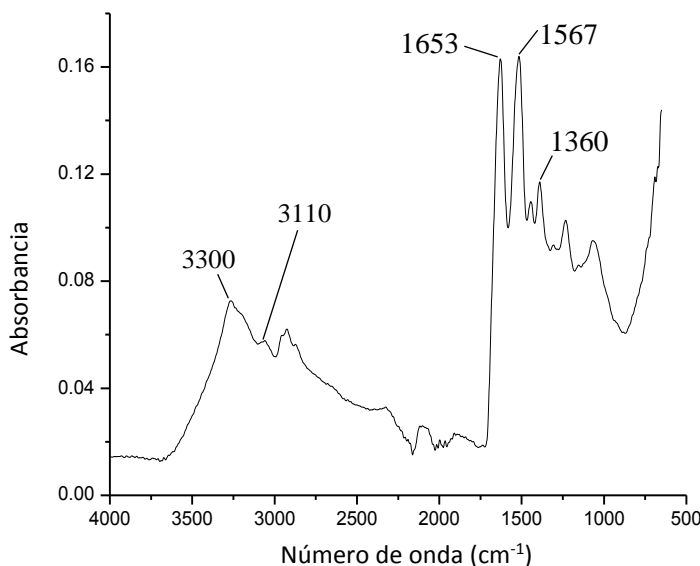
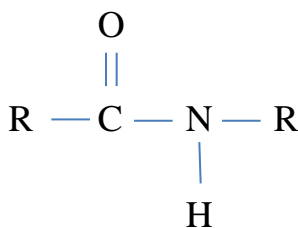


Figura 7.22 Espectro FTIR-ATR de una muestra de proteína (soya).

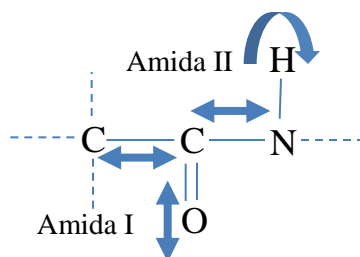
El espectro de infrarrojo de una proteína presenta picos de absorción asociados principalmente con los grupos amida (Figura 7.23).

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

| Designación (Amida) | Número de onda (cm ⁻¹) | Asignación |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | 3300 | N-H, estiramiento |
| B | 3110 | N-H, estiramiento |
| I | 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. |
| III | 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. |

**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.

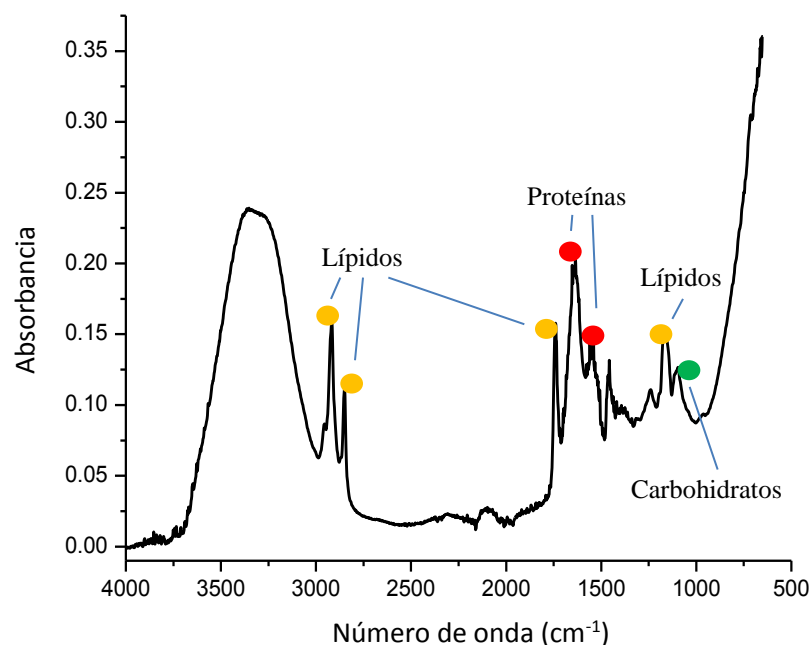


Figura 7.25 Espectro FTIR-ATR de una muestra de queso, en donde se pueden observar los picos asociados con las proteínas, pero también picos asociados con los lípidos y carbohidratos, principalmente.

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 picos de las proteínas tipo amida I y II, situados en el intervalo entre 1750 y 1500 cm^{-1} , respectivamente.

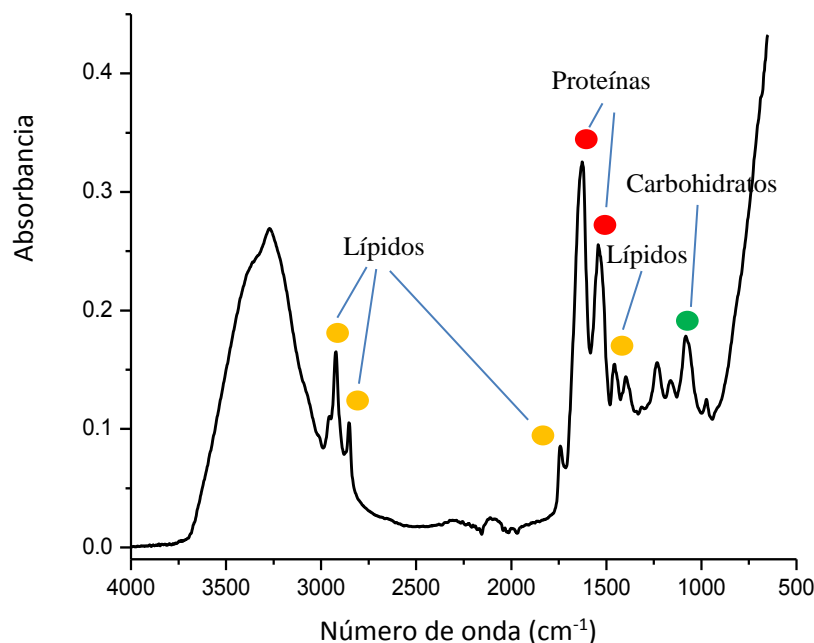


Figura 7.26 Espectro FTIR-ATR de una muestra de yema de huevo de gallina, en donde se pueden observar picos asociadas con las proteínas, pero también picos provenientes de lípidos y carbohidratos, principalmente.

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 $\text{C}=\text{O}$ 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.

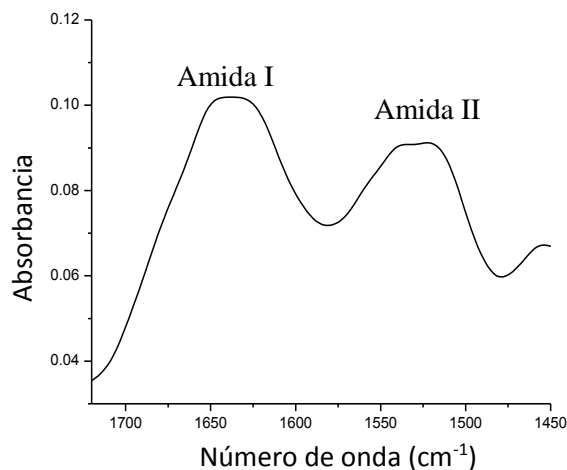


Figura 7.27 Picos de la amida I y II en el espectro de infrarrojo de una proteína.

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.

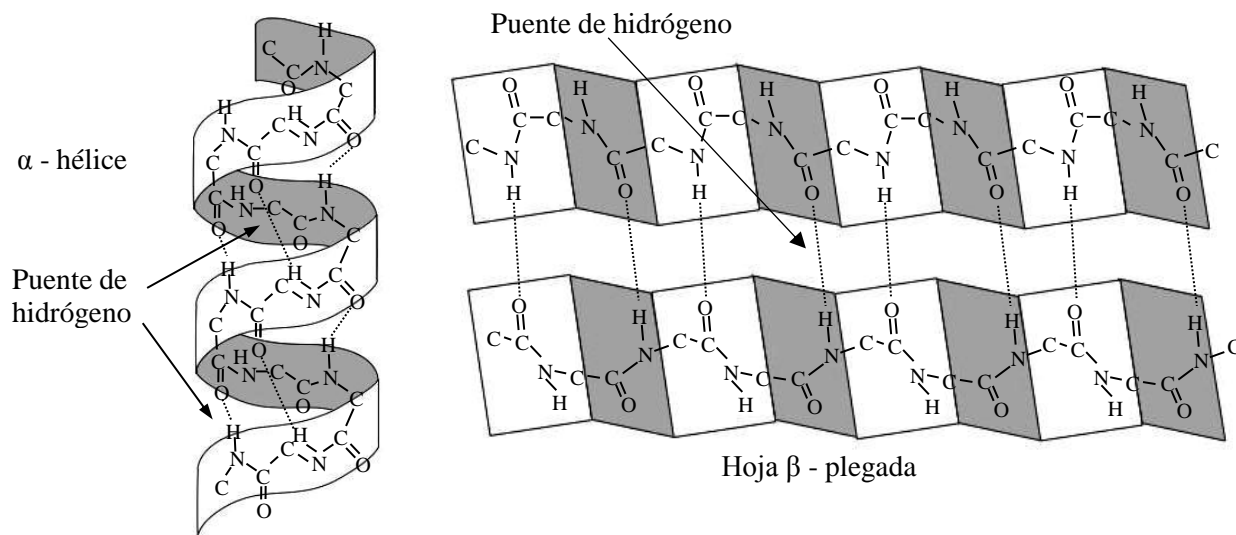


Figura 7.28 Representación gráfica de las estructuras secundarias alfa y beta de una proteína

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.

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.

| Proteína | % de estructura beta | | | % de estructura helicoidal | | |
|-------------------|----------------------|---------|------------|----------------------------|---------|------------|
| | FTIR | Rayos X | Diferencia | FTIR | Rayos X | Diferencia |
| Carboxipeptidína | 33 | 30 | +3 | 40 | 39 | +1 |
| Quimotripsinógeno | 49 | 46 | +3 | 13 | 11 | +2 |
| Elastína | 45 | 47 | -2 | 11 | 10 | +1 |
| Papaína | 32 | 29 | +3 | 27 | 29 | -2 |
| Ribonucleasa A | 50 | 46 | +4 | 21 | 22 | -1 |
| Tripsinógeno | 54 | 56 | -2 | 11 | 9 | +2 |

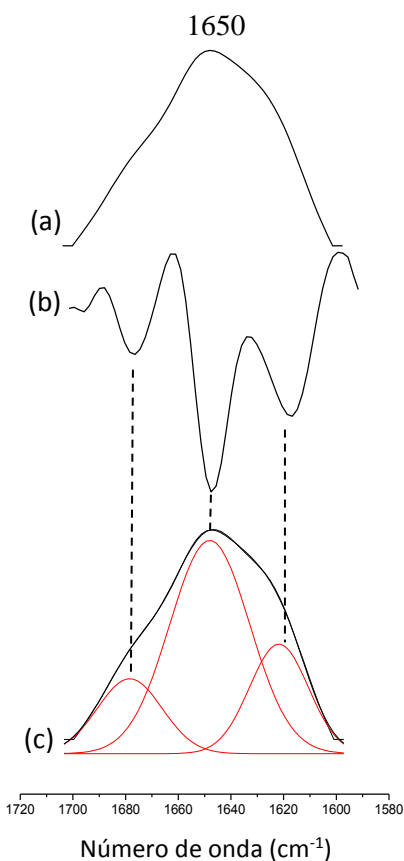


Figura 7.29 Procedimiento gráfico de la obtención de las curvas gaussianas en el pico amida I: a) obtención del espectro de FTIR, b) segunda derivada y c) obtención de las gaussianas.

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].

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

| Número de onda (cm^{-1}) | Tipo de estructura |
|-------------------------------------|----------------------|
| 1691-1696 | Laminar β |
| 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 |

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.

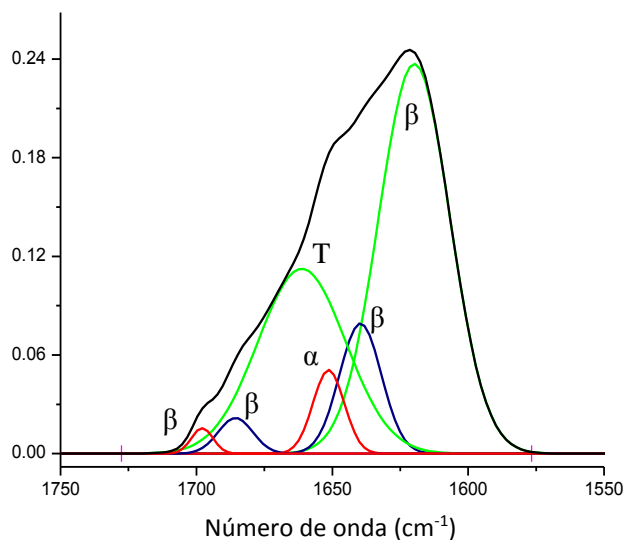


Figura 7.30 Gaussianas del pico amida I del espectro FTIR-ATR del atún.

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

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.

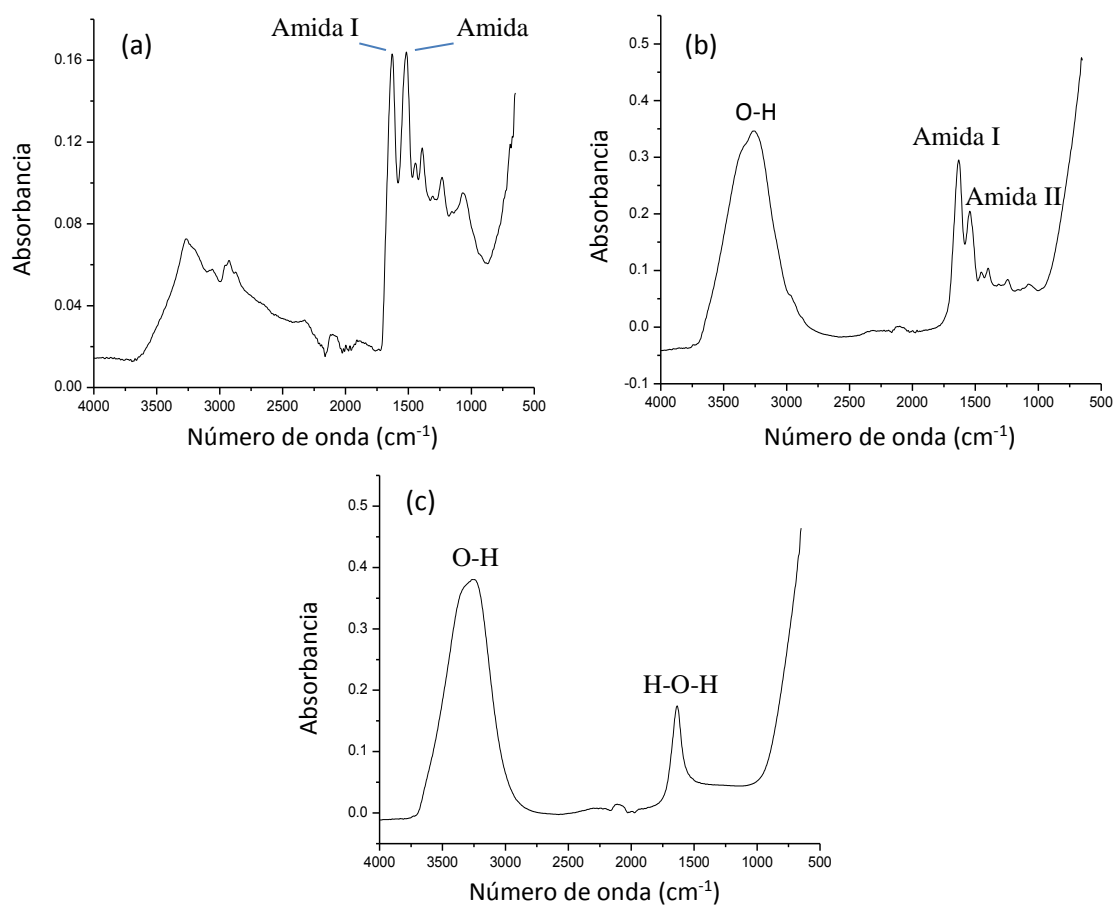


Figura 7.31 Espectro FTIR-ATR de una proteína, sin la presencia de agua (a), el espectro FTIR-ATR del agua (b) y una proteína con agua (c).

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

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 ($\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$) puede obstaculizar la identificación de los picos de absorción correspondientes a la amida I ($\sim 1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$) y II ($\sim 1600\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$).

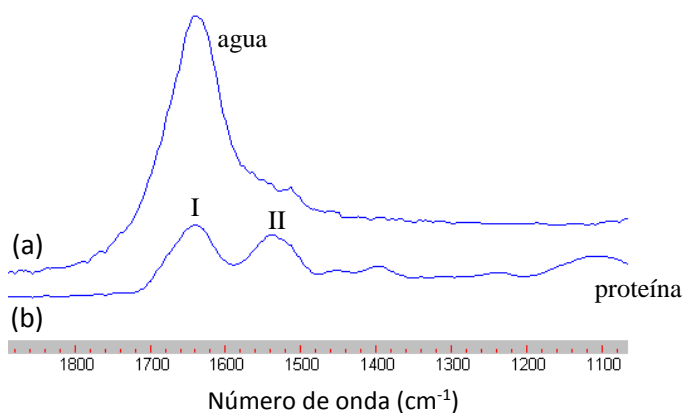


Figura 7.32 Espectro de FTIR-ATR del agua (a) y el de una proteína (b). Nótese la magnitud y posición de la banda del agua con relación a los picos amida I y II.

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 ($\sim 1653\text{-}1645 \text{ cm}^{-1}$), 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 (D_2O) 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 ($^2\text{H}_2\text{O}$), 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.

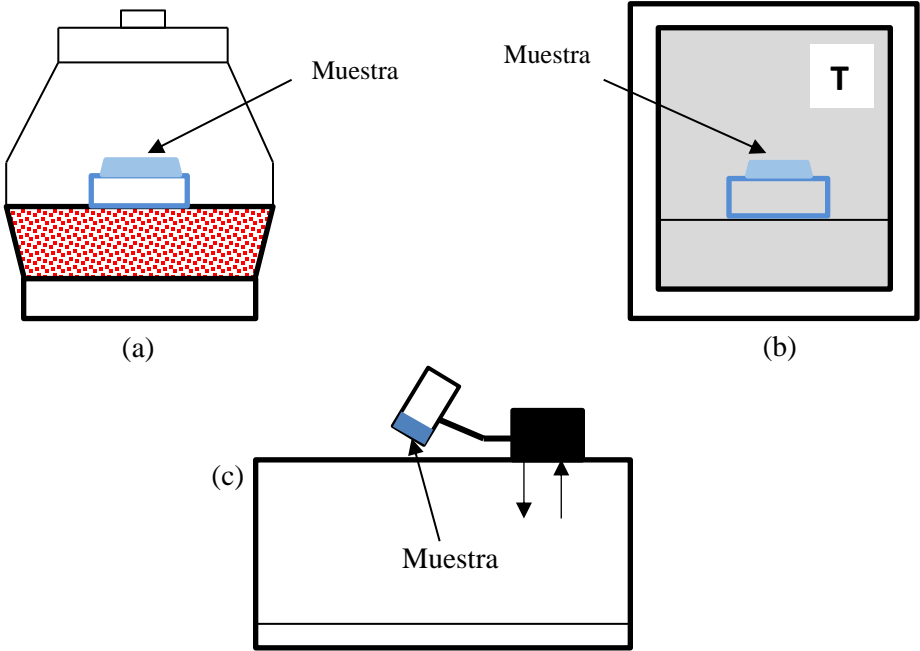


Figura 7.33 Representación de algunas opciones de procesamiento para eliminar el agua en una muestra a base de proteínas: desecación (a), en horno (b) y por liofilizado (c).

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).

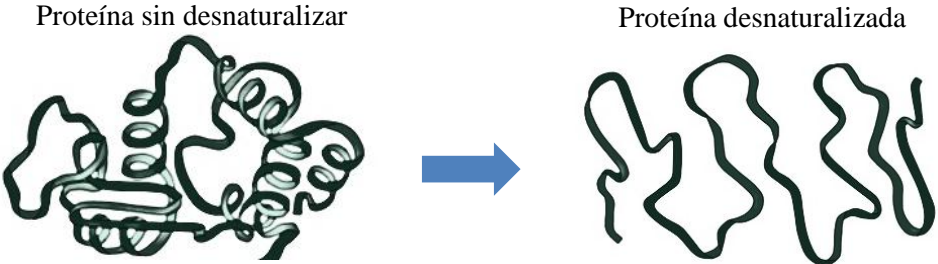


Figura 7.34 Representación de la desnaturalización de una proteína

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 a 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.

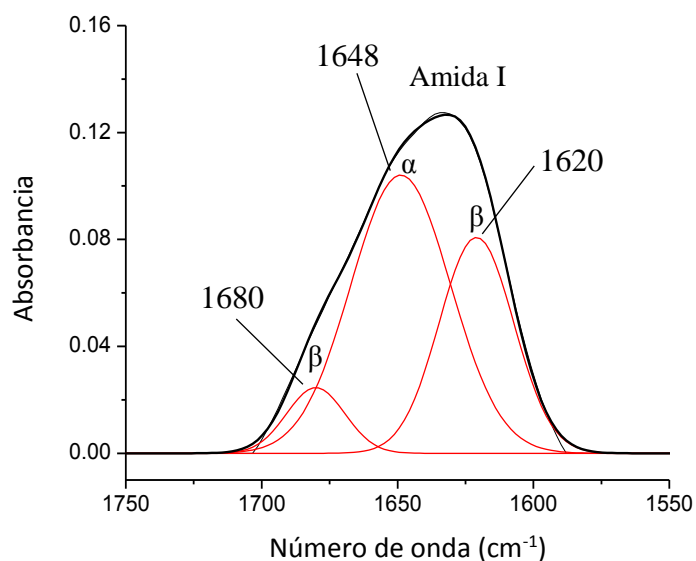


Figura 7.35 Espectro de FTIR-ATR entre 1750 y 1550 cm^{-1} y Gaussianas en la región de amida I de una proteína sin calentar.

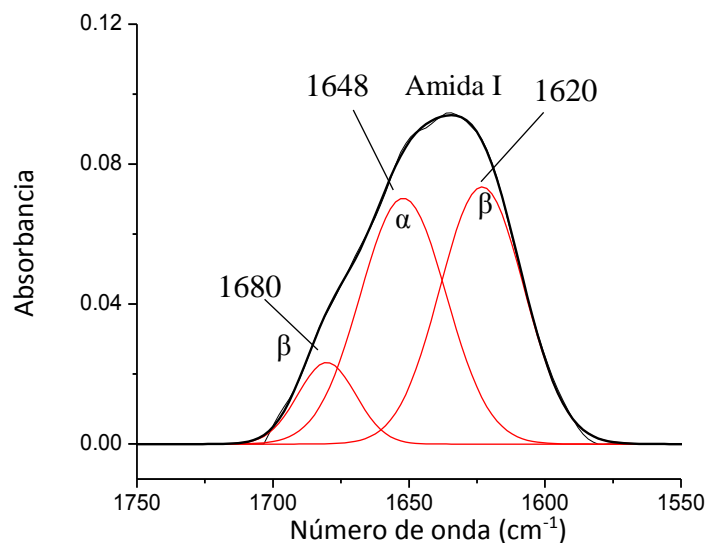


Figura 7.36 Espectro FTIR-ATR entre 1750 y 1550 cm^{-1} y las Gaussianas en la región de la amida I de una proteína calentada.

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.

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

| Número de onda (cm^{-1}) | Área relativa de muestra sin calentar | Área relativa de muestra calentada | Diferencia |
|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| 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 |

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., Szafranec, 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., Garipey, 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).