

**ESTUDIO DE ABSORCIÓN ÓPTICA Y ESPECTROS RAMAN DE UN MODELO
ELECTROLÍTICO DE MEDIO EXTRACELULAR.**

EDUARD JAVIER MORENO GÓMEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA

BUCARAMANGA

2016

**ESTUDIO DE ABSORCIÓN ÓPTICA Y ESPECTROS RAMAN DE UN MODELO
ELECTROLÍTICO DE MEDIO EXTRACELULAR.**

EDUARD JAVIER MORENO GÓMEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Físico

Directora: PhD. (c) Janeth Fernández Pinto.

Co-directores: PhD. David Alejandro Miranda Mercado.

PhD. (c) Sandra Milena Pinto Bohórquez.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE FÍSICA

BUCARAMANGA

2016

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre han estado desde la distancia apoyando mis proyectos y mis decisiones, por los sacrificios que han hecho para lograr la finalización de mi carrera.

Agradezco a los integrantes del grupo de investigación CIMBIOS por acogerme y sobre todo generar un ambiente de amistad que hizo agradable cada uno de los momentos vividos durante la etapa del desarrollo del proyecto de investigación, en especial a mis directores Janeth Fernandez, David Miranda y Sandra Pinto, quienes me brindaron orientación y apoyo.

A las personas que conocí durante el transcurso de mi carrera con las cuales entable una amistad y camaradería como son: Carlos Barrera, Fabián González, José Herrera, José Echeverry, Diana Rondón, Ivan Ariza y Eladio Silva.

Agradezco especialmente al profesor Rafael Cabanzo por su disposición en el préstamo de los equipos del laboratorio de espectroscopia.

Índice general

INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	12
1.1. MODELO VIBRACIONAL DE UNA MOLÉCULA	12
1.2. ABSORCIÓN	14
1.3. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA EN EL INFRA- ROJO (FTIR-ATR)	16
1.3.1. Proceso Físico	16
1.4. ENSANCHAMIENTO DE BANDAS	17
1.5. DISPERSIÓN RAMAN.	17
1.5.1. Proceso físico	18
1.6. MODELOS PARA LA MOLÉCULA DE AGUA	18
1.7. SOLUCIONES ELECTROLÍTICAS	19
1.8. SOLVATACIÓN DE IONES EN SOLUCIONES ACUOSAS Y EFECTOS SOBRE EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y DISPERSIÓN RAMAN DEL AGUA	19
2. METODOLOGÍA	21
2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	22
2.3. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS	22
2.4. TRATAMIENTO DE ESPECTROS	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. ESPECTROS FTIR ATR DEL MODELO EXPERIMENTAL DE LAS CONCENTRA- CIONES IONICAS DEL MEDIO EXTRACELULAR	25
3.2. ESPECTROS DE DISPERSIÓN RAMAN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE LAS CONCENTRACIONES IONICAS DEL MEDIO EXTRACELULAR	26
3.3. ESPECTROS FTIR ATR PARA SOLUCIONES SALINAS ENTRE UNO Y CUATRO MOLAR	27
3.4. ESPECTROS DE DISPERSIÓN RAMAN PARA SOLUCIONES SALINAS ENTRE UNO Y CUATRO MOLAR	29
4. CONCLUSIONES	33
Bibliografía	34

Índice de tablas

2.1. Cantidad de cada una de las sales en el medio extracelular.	22
2.2. Cantidad de reactivo para soluciones saturadas.	22
3.1. Tabla picos de deconvolución con errores y desviación.	26
3.2. Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros Raman de la SME.	27
3.3. Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros FTIR ATR para el agua y las soluciones salinas.	29
3.4. Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros Raman.	31

Índice de figuras

1.1. Representación gráfica de una molécula de agua utilizando el sistema de coordenadas propias dentro del sistema.	13
1.2. Espectro ATR del agua	15
1.3. Esquema de la reflexión interna en un espectrofotómetro.	16
1.4. Gráfica de intensidades por dispersión tomada de IR and Raman Spectroscopy (Larkin, 2011).	18
1.5. Ilustración de las capas de solvatación alrededor de un electrolitos	20
1.6. Espectro Raman e IR del agua pura y solución de NaCl	20
2.1. Deconvolución gaussiana para el espectro FTIR ATR del agua.	24
3.1. Espectro FTIR ATR del promedio del agua y la SME	25
3.2. Espectro Raman del agua y la SME.	26
3.3. Espectros FTIR ATR de las soluciones de: (a) $CaCl_2$, (b) deconvolución gaussiana $CaCl_2$, (c) KCl , (d) deconvolución gaussiana KCl y (e) $NaCl$ y (f) deconvolución gaussiana $NaCl$, en estos el agua se representa con color negro, la concentración 1 molar de rojo, 2 molar de azul, 3 molar de verde y finalmente 4 molar de naranja.	28
3.4. Espectros Raman de las soluciones de: (a) $CaCl_2$, (b) deconvolución gaussiana $CaCl_2$, (c) KCl , (d) deconvolución gaussiana KCl y (e) $NaCl$ y (f) deconvolución gaussiana $NaCl$, en estos el agua se representa con color negro, la concentración 1 molar de rojo, 2 molar de azul, 3 molar de verde y finalmente 4 molar de naranja.	30

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE ABSORCIÓN ÓPTICA Y ESPECTROS RAMAN DE UN MODELO ELECTROLÍTICO DE MEDIO EXTRACELULAR.¹

AUTOR: MORENO GÓMEZ, Eduard Javier.²

PALABRAS CLAVES: ESPECTROS, DISPERSIÓN, ABSORCIÓN, SOLUCIÓN ELECTROLÍTICA, BANDAS VIBRACIONALES.

DESCRIPCIÓN

Se realizó el estudio de propiedades ópticas de una solución electrolítica que simula el medio extracelular sanguíneo (SME), empleando las técnicas de reflectancia total atenuada FTIR ATR y dispersión Raman. Se comparó el espectro vibracional del agua con el de la solución electrolítica en la región comprendida entre $2700 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, donde se encuentran las bandas de estiramiento del enlace O-H del agua. Como consecuencia de las bajas concentraciones de las sales de cloruro de sodio (NaCl), potasio (KCl) y calcio (CaCl_2) que se emplearon en la preparación de la solución electrolítica, no se observaron cambios significativos en los espectros, por lo anterior, fue necesario estudiar el efecto de cada una de las sales utilizando soluciones acuosas con mayores concentraciones que el medio extracelular. Los resultados evidencian desplazamientos de los picos de intensidad de cada una de las bandas del agua, 3286 cm^{-1} y 3492 cm^{-1} para IR y 3207 cm^{-1} y 3432 cm^{-1} para Raman, con el aumento en la concentración. El efecto en FTIR ATR es más notorio sobre la banda de estiramiento antisimétrico con pico en 3492 cm^{-1} . Para la solución acuosa de cloruro de calcio se observó un corrimiento de 58 cm^{-1} a frecuencias más bajas, mientras que para las soluciones acuosas de cloruro de potasio y sodio se observaron corrimientos menores 44 cm^{-1} y 39 cm^{-1} respectivamente. En espectroscopia Raman se registró el efecto más fuerte en la banda de estiramiento simétrico donde el mayor desplazamiento se observó para la solución acuosa de CaCl_2 con un corrimiento hacia frecuencias más altas de 27 cm^{-1} , seguido por soluciones acuosas de cloruro de sodio y calcio con 21 cm^{-1} y 14 cm^{-1} respectivamente.

¹Trabajo de grado

²Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: Janeth Fernández Pinto, Físico. David Alejandro Miranda Mercado, Físico. Sandra Milena Pinto Bohórquez, Química .

ABSTRACT

TITLE: OPTICAL ABSORPTION AND RAMAN SPECTRA STUDY OF AN ELECTROLYTIC EXTRACELULAR MEDIUM MODEL¹

AUTHOR: MORENO GÓMEZ, Eduard Javier.²

KEYWORDS: ESPECTRUM, SCATTERING, ABSORTION, ELECTROLITIC SOLUTION, VIBRATIONAL BAND.

DESCRIPTION

The optic properties of an electrolytic solution were studied. This solution simulates the sanguineous extracellular medium (SME), using both attenuated total reflectance (FTIR ATR) and Raman scattering techniques. Water vibrational spectrum and electrolytic solution vibrational spectrum were compared in the 2700-4000 cm^{-1} region, where the OH-bond stretching bands are found. In order to prepare the electrolytic solution, three low concentrated salts were used: sodium chloride ($NaCl$), potassium chloride (KCl) and calcium chloride ($CaCl_2$). As a result of the low salt concentration employed, there was no found significant spectrum changes. Because of this, it was necessary to study the effect of each salt, using aqueous solutions with higher concentrations than in the extracellular medium. Results show shifts on the intensity peaks as the concentration increase: from 3286 cm^{-1} to 3492 cm^{-1} with IR and from 3207 cm^{-1} to 3432 cm^{-1} in the case of Raman. The effect in FTIR ATR is more evident on the asymmetric stretching band, showing a peak in 3492 cm^{-1} . The sodium chloride solution showed a 58 cm^{-1} -shift at low frequencies; while potassium chloride and calcium chloride solutions exhibited lower shifts 44 cm^{-1} and 39 cm^{-1} respectively. The strongest effect, using Raman spectroscopy, was found in the symmetric stretching band, where the calcium chloride solution showed the largest shift toward 27 cm^{-1} frequencies, followed by the sodium chloride and potassium chloride solutions, which exhibited 21 cm^{-1} and 14 cm^{-1} shifts, respectively.

¹Trabajo de grado

²Facultad de Ciencias. Escuela de Física. Directores: Janeth Fernández Pinto, Físico. David Alejandro Miranda Mercado, Físico. Sandra Milena Pinto Bohórquez, Química .

INTRODUCCIÓN

La tendencia al crecimiento en los índices de incidencia y mortalidad del cáncer en el mundo han generado un reto científico que conllevó al crecimiento de investigaciones enfocadas en el diagnóstico temprano, la comprensión de la evolución de esta enfermedad y posibles técnicas o terapias para su cura (Breastcancer.org, 2014; Backman et al., 2000). Bajo este enfoque el grupo de investigación CIMBIOS desde hace más de una década se dedica a estudiar la Biofísicoquímica del cáncer y a desarrollar técnicas para realizar detección temprana de los tipos de cáncer de mayor incidencia en Colombia, el cáncer de mamas y cuello uterino (Miranda et al., 2014, 2013) .

Actualmente, se conoce que las propiedades eléctricas y ópticas son diferentes en el tejido normal y cancerígeno (Backman and Roy, 2013). Por ejemplo, para cáncer de cuello uterino en el grupo de investigación CIMBIOS la técnica más usada para estudiar sus características es la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIS), porque permite observar como las propiedades eléctricas de los tejidos varían a medida que la enfermedad altera de forma estructural y fisiológica al tejido. Bajo esta premisa, Miranda y colaboradores encontraron que la resistividad del medio extracelular entre otros parámetros esta correlacionada con el grado de lesión (Miranda et al., 2013), los cuales se clasifican en tejido normal, bajo grado de malignidad (LSIL), alto grado de malignidad (HSIL) y cáncer de cuello uterino (CC). Posteriormente, Pinto y colaboradores simularon las concentraciones iónicas del medio extracelular de plasma sanguíneo para cada uno de estos estados del tejido (Pinto et al., 2016), encontrando una variación de las concentraciones de sodio y potasio con el grado de malignidad .

Dado que el medio extracelular de plasma sanguíneo está compuesto principalmente de agua , sales de cloruro de potasio, sodio y calcio (Hall, 2010), en esta investigación se busco observar los efectos del cambio en las concentraciones iónicas en el medio sobre el espectro Raman e IR de este modelo. Sin embargo, debido a que las concentraciones de estas sales son del orden de milimolar mM, se estudió por separado el efecto que cada sal produce sobre el espectro Raman e IR del principal componente del medio extracelular, el agua. Este proceso se realizó con el interés de relacionar los cambios en las concentraciones iónicas con algunas propiedades ópticas de dicho modelo, que como se ha mencionado antes, están directamente relacionados con grados de malignidad en cáncer (Prevarskaya et al., 2010).

Con base en lo anterior, se presenta en este documento primero un marco teórico en el cual se describen conceptos relacionados con esta investigación, segundo la metodología y los materiales, tercero los resultados y su discusión y quinto las conclusiones.

Capítulo 1

MARCO TEÓRICO

La espectroscopia estudia la interacción de las ondas electromagnéticas con la materia, por medio del análisis de espectros, que permiten caracterizar la interacción de una determinada muestra en un rango de longitudes onda. Para esto es necesario un dispositivo que actúe como sensor y registre el fenómeno físico que se presenta, en el caso específico de los modos vibracionales de una molécula, se puede en este tipo de estudio se emplea un espectrofotómetro IR para detectar los cambios en la intensidad o un espectrómetro Raman que detecte la radiación dispersada, los dos fenómenos son completamente diferentes y por tanto su instrumentación varía. Para poder estudiar estos dos fenómenos, a continuación se presenta un modelo clásico que permite determinar los modos vibracionales de una molécula los cuales pueden visualizarse a través del espectro medido por infrarrojo (IR) y Raman, posteriormente se describen clásicamente los fenómenos de absorción y dispersión y la instrumentación necesaria para su medición experimental, por último, se presenta la teoría de solvatación y como afecta estas interacciones el espectro del agua.

1.1. MODELO VIBRACIONAL DE UNA MOLÉCULA

Para estudiar el comportamiento de algunas sustancias, se han creado modelos sencillos que permiten visualizar el comportamiento general de todo el sistema. Este modelo vibracional de una molécula, consiste en la unión de uno o más átomos por medio de un enlace. Estos átomos se encuentran en un movimiento continuo, alejándose y acercándose a partir de un punto de equilibrio. Este movimiento es denominado vibración molecular. Clásicamente, este enlace entre átomos se modela como un sistema de masa resorte que oscila en una posición de equilibrio descrito por la siguiente expresión:

$$\mu \frac{d^2 \vec{q}}{dt^2} - k \vec{q} = 0, \quad (1.1)$$

la expresión 2.1 evidencia que el movimiento de la molécula se describe como un movimiento armónico periódico con una frecuencia natural de vibración dada por:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (1.2)$$

en donde ν_0 representa la frecuencia de vibración de la molécula, sin la presencia de fuerzas o energías externas que la perturben. Estas frecuencias son propias de cada sistema en estudio, es decir, cada molécula tiene su frecuencia característica dependiendo de los elementos que la conformen.

Para el análisis de los modos vibracionales de moléculas con más de dos átomos, existen modelos avanzados como el desarrollado por Wilson o de la matrices GF (Wilson, 1955), Este método consiste

en construir la molécula en el espacio de coordenadas cartesianas y luego se transforma a una base de coordenadas internas, en este nuevo sistema se toman en cuenta únicamente los cambios de las distancias entre enlaces y los ángulos que estos forman (Colthup, 2012). Para la matriz GF, se realiza

primero una construcción de la molécula poliatómica en coordenadas cartesianas y luego se pasa a un conjunto base de coordenadas internas (Requena and Román, 2004), como se observa en la figura 1.1, con esto se busca describir todos los posibles desplazamientos atómicos internos, de tal forma que se toman únicamente los cambios en las distancias y los ángulos entre los átomos enlazados.

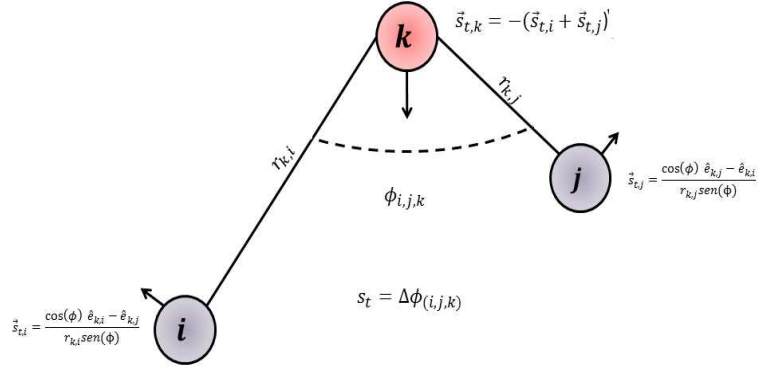


Figura 1.1: Representación gráfica de una molécula de agua utilizando el sistema de coordenadas propias dentro del sistema.

En este desarrollo, la matriz G está relacionada con la energía cinética de las vibraciones moleculares, la cual depende de parámetros estructurales de la molécula. La matriz F se construye teniendo en cuenta un conjunto de valores relacionados con la fuerza entre cada uno de los átomos, que vienen a ser un conjunto de constantes de fuerza (Requena and Román, 2004), relacionadas con la energía potencial del sistema. Los parámetros mencionados para los cálculos matriciales corresponden a datos empíricos.

Bajo el contexto de esta teoría, si se suponen N partículas que vibran con una amplitud pequeña respecto de la posición de equilibrio en el sistema ponderado de coordenadas. La energía cinética total será:

$$2T = \sum_{i=1}^{3N} \dot{q}_i^2, \quad (1.3)$$

donde $q_i = \sqrt{m_\alpha} \Delta x_\alpha$, $q_{i+1} = \sqrt{m_\alpha} \Delta y_\alpha$ y $q_{i+2} = \sqrt{m_\alpha} \Delta z_\alpha$, corresponden a cada una de las coordenadas ponderadas para un átomo α de la molécula, teniendo en cuenta que estos realizan un movimiento cerca del punto de equilibrio, se puede asociar una energía potencial relacionada con todo el conjunto de partículas.

$$2V = \sum_{i,j}^{3N} f_{ij} q_i q_j \quad (1.4)$$

donde el término $f_{ij} = \left(\frac{\partial V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0$ corresponde a las constantes de fuerza. A partir, de estas expresiones para la energía cinética y potencial d, se puede utilizar el formalismo de Euler-Lagrange para estudiar la evolución temporal de este sistema a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{d}{dt} \frac{\partial T}{\partial \dot{q}_k} + \frac{\partial V}{\partial q_k} = 0 \quad (1.5)$$

donde $k = 1, 2, \dots, 3N$, al realizar las respectivas operaciones se obtiene una ecuación diferencial de la forma:

$$\ddot{q}_k + \sum_{i=1}^{3N} f_{ik} q_i = 0 \quad (1.6)$$

Esta expresión corresponde a un sistema acoplado de ecuaciones diferenciales que puede desarrollarse después de un proceso algebraico como la multiplicación de las matrices G y F. De este proceso se obtiene la ecuación secular 1.7 que permite determinar los valores propios del sistema, que corresponden a los modos normales de vibración.

$$\sum_{i=1}^{3N} (f_{ik} - \lambda \delta_{i,j}) A_i = 0 \quad (1.7)$$

El estudio de estos modos vibracionales se realiza a través de dos fenómenos de interés en este trabajo de investigación, que son la absorción y la de dispersión Raman, los cuales serán estudiados a continuación.

1.2. ABSORCIÓN

El fenómeno de absorción se explica clásicamente como la pérdida de la intensidad de luz cuando interactúa con la materia (Griffiths and College, 1999), el campo eléctrico de la onda electromagnética ocasiona un cambio en el momento dipolar de las moléculas presentes sin posterior emisión, como consecuencia de esto las moléculas incrementan su energía cinética la cual es disipada por colisiones intermoleculares, es decir, aumenta la temperatura del medio sin emitir.

La relación de esta pérdida de intensidad de la radiación fue estudiada por Beer - Lambert, quienes postularon la ley que lleva sus nombres (Larkin, 2011; Ferraro, 2003), por lo tanto para un medio con absorción pura se cumple:

$$I = I_o \exp(-\mu_a(\lambda)l), \quad (1.8)$$

en esta ley se expresa una disminución exponencial de la intensidad incidente I , relacionada con el espesor del medio l , para una concentración c y un coeficiente de extinción molar ϵ . Donde la luz incidente debe ser monocromática y el medio debe ser puro y uniformemente absorbente.

De acuerdo con la ley de Lamber-Beer se puede establecer una relación entre las intensidad inicial y final:

$$T(\%) = \frac{I}{I_o} * 100, \quad (1.9)$$

donde $T(\%)$ corresponde al porcentaje de transmisión en función del número de onda, muy útil para análisis cualitativos (Ferraro, 2003), sin embargo, para análisis cuantitativos se realizan medidas de absorbancia, que corresponde a la relación:

$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon cd \quad (1.10)$$

La absorbancia se emplea frecuentemente en espectroscopia porque permite realizar medidas cualitativas, relacionadas directamente con la concentración en una solución por medio para esto se emplean generalmente curvas de calibración . En la figura 1.2 se presenta como ejemplo el espectro de absorbancia del agua.

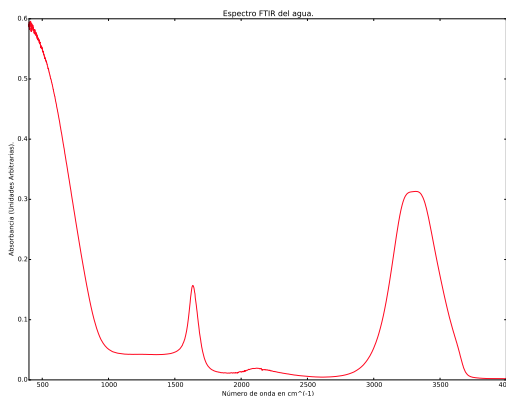


Figura 1.2: Espectro ATR del agua

En esta figura se muestra el espectro ATR del agua, tomado con el espectrofotómetro FTIR Nicolet IS 50, del laboratorio de espectroscopia (LE) de la Universidad Industrial de Santander.

En este tipo de espectros se gráfica la absorbancia en función del número de onda donde se observan dos bandas bien definidas la primera entre $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la banda de flexión de las moléculas de agua, la siguiente que se encuentra entre $2700\text{ - }3800\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente , que corresponde a las bandas de estiramiento (Eisenberg and Kauzmann, 2005).

Por medio del infrarrojo se pueden hacer estudios de tipo cuantitativo y de tipo cualitativo, esto gracias a que en cada una de las regiones del infrarrojo permiten realizar este tipo de estudios, de acuerdo a las propiedades que se deseen medir (Skoog D.A., 1992). Estas regiones son:

- Infrarrojo medio: en esta región espectral se emplean técnicas que permiten análisis cuantitativos y cualitativos, se realiza la adquisición de espectros de absorción, reflexión y emisión. se extiende entre los 670 y los 4000 cm^{-1} .
- Infrarrojo cercano: Es de especial interés por que en esta se hacen estudios cuantitativos de especies como el agua, dióxido de carbono, azufre, hidrocarburos de bajo peso molecular, nitrógeno amínico y compuestos de interés para la agricultura y la industria mediante reflectancia difusa. Esta región se extiende entre $4000\text{ - }1400\text{ cm}^{-1}$.
- Infrarrojo lejano: empleado para estudio de especies inorgánicas y organometálicas empleando absorción.

1.3. ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA EN EL INFRARROJO (FTIR-ATR)

Este tipo de espectroscopia permite un análisis cuantitativo y cualitativo de la absorbancia, además sirve para el análisis de muestras líquidas pequeñas y tejidos difíciles de manipular. Los espectros obtenidos con esta técnica son similares a los de absorción en el infrarrojo y proporcionan la misma información, la diferencia entre estas dos técnicas es la escala de medición (Skoog D.A., 1992). Existen tres tipos de reflexión:

- Reflexión especular: cuando el medio reflectante es una superficie pulida, en esta los rayos reflejados tienen un ángulo igual al de los rayos incidentes.
- Reflexión difusa: se emplea principalmente sobre muestras pulverizadas con un mínimo de preparación.
- Reflectancia total atenuada (ATR): Esta técnica permite un análisis cuantitativo y cualitativo de una muestra, además que no es necesario una preparación.

1.3.1. Proceso Físico

El proceso físico de ATR se basa en que un haz de luz al atravesar de un medio a otro en la interfaz cambia el ángulo de propagación (Skoog D.A., 1992; Griffiths and Colledge, 1999), de esta forma se aprovecha que si emplea un medio ópticamente denso y cuyo índice de refracción es alto y posteriormente se coloca otro medio con un menor índice de refracción y se hace atravesar un haz de luz por ese camino óptico se puede presentar el fenómeno de reflexión total atenuada, siempre y cuando el ángulo de propagación mayor al ángulo crítico (Griffiths and Colledge, 1999; Griffiths and De Haseth, 2007). La figura 1.3 representa el fenómeno de reflectancia total atenuada.

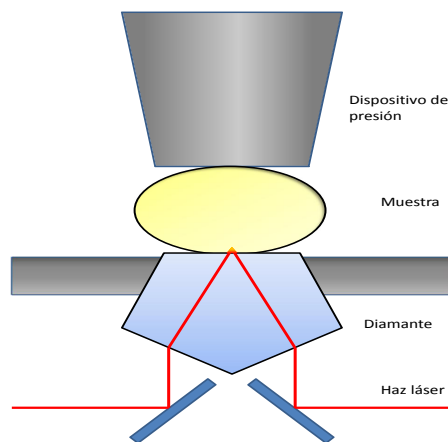


Figura 1.3: Esquema de la reflexión interna en un espectrofotómetro. .

En la figura se muestra el camino óptico de un haz, primero atraviesa el diamante que es un material ópticamente denso a una muestra, en la interfaz se da el fenómeno de reflexión total, para luego pasar al detector. Una parte del campo eléctrico penetra la muestra pero esta onda se absorbe rápidamente.

1.4. ENSANCHAMIENTO DE BANDAS

Es de esperarse que al tomar un espectro se encuentren picos estrictamente en la frecuencia en la cual se presenta un modo vibracional, sin embargo, esto no sucede sino que es un proceso paulatino en la medida que la energía de la onda se aproxima al valor de un pico de intensidad inicia un proceso de absorción que va aumentando en la medida que la frecuencia de la onda se aproxima a la frecuencia de vibración normal del objeto en estudio, posteriormente disminuye al alejarse de este valor formando así una banda espectral la cual tiene un ancho natural, esta puede ser afectada por otros procesos como son efecto Doppler y colisiones Requena and Román (2004); los procesos son:

Efecto doppler: las moléculas de una muestra no se encuentran estáticas, por el contrario están en continuo movimiento de tal forma que cuando emiten se produce un cambio en la frecuencia, esto hace una contribución en el ensanchamiento el cual se caracteriza por ser no homogéneo.

Colisiones entre moléculas: esto sucede cuando la moléculas no emiten radiación y transfieren su energía a otras por choques, lo cual demora el proceso de emisión y por tanto se produce un ensanchamiento que se caracteriza por ser homogéneo.

1.5. DISPERSIÓN RAMAN.

El fenómeno de dispersión se da cuando la luz cambia su energía o la dirección de propagación al interactuar con la materia (Griffiths and College, 1999), esto se explica en un modelo clásico de la siguiente manera: el campo eléctrico $E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ asociado a la luz, que varía en el tiempo con una frecuencia ν_0 , produce un cambio en el estado vibracional de las moléculas cuyos átomos oscilan con una frecuencia ν_m , es decir, estos últimos se reorientan de acuerdo a la dirección del campo eléctrico. En este proceso las cargas oscilan y emiten una onda cuya energía depende del cambio en la polarizabilidad α ; la cual se puede desarrollar en series de Taylor y tomar la aproximación lineal para pequeñas amplitudes que dependen de la coordenada ponderada q . De este modo el momento dipolar inducido por esta interacción viene dado por la siguiente relación:

$$\vec{P} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_m)] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_m)] \} \quad (1.11)$$

el primer término de esta ecuación corresponde a la dispersión de Rayleigh, cuya frecuencia de la onda que emite el dipolo no cambia con respecto al de la onda incidente, por este motivo se denomina dispersión elástica.

El siguiente termino corresponde a la dispersión inelástica o dispersión Raman, en esta se encuentra la dispersión Raman Stokes que corresponde a la onda que es dispersada con pérdida de energía y por tanto lleva una frecuencia menor ($\nu_0 - \nu_m$) y la dispersión Raman anti-Stokes que corresponde al caso en el que la onda se dispersa con una energía mayor cuya frecuencia es mayor ($\nu_0 + \nu_m$). En la figura 1.4 se puede observar estos tipos de dispersión.

Una de las características es que la onda emitida por la dispersión de Rayleigh tiene una intensidad que supera varios ordenes de magnitud la Intensidad de la dispersión Raman Stokes y esta a su vez a la anti Stokes (Larkin, 2011), la explicación a esto se encuentra en que la mayoría de las moléculas que componen la materia se encuentran en su estado de vibración natural y en la interacción con la luz aumentan su frecuencia y rápidamente pasan a su estado inicial, lo cual sucede con mayor probabilidad, sin embargo, algunas veces en el último paso quedan vibrando con una frecuencia mayor

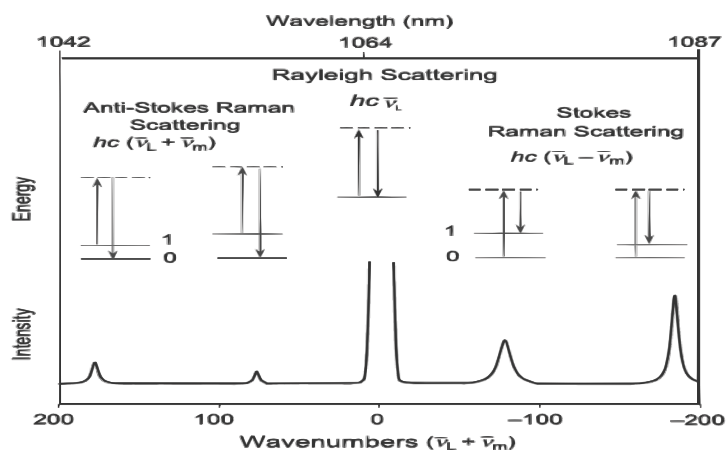


Figura 1.4: Gráfica de intensidades por dispersión tomada de IR and Raman Spectroscopy (Larkin, 2011).

y se mantienen en ese estado y en muy pocos casos las moléculas se encuentran inicialmente vibrando con una frecuencia mayor a la de su vibración natural y luego de la interacción con la luz pasan a vibrar con frecuencias menores a la inicial.

En esta figura se ilustra la intensidad de la dispersión de Rayleigh, Raman Stokes y Raman anti-Stokes, la principal característica es que el primer tipo de dispersión supera en varios ordenes de magnitud a la dispersión Raman Stokes, que incluso es más intensa que la dispersión anti-Stokes.

1.5.1. Proceso físico

Los espectros Raman se obtienen al irradiar una muestra con un haz láser con una potencia alta (Skoog D.A., 1992), el láser se caracterizan por ser una fuente monocromática, para este caso se emplea luz en el rango del visible o en el infrarrojo, en la interacción con una muestra esta última dispersa en todos los sentidos, sin embargo, la mayoría de espectroscopios registran la luz dispersada a 90° respecto de la dirección inicial del haz (Griffiths and De Haseth, 2007). De igual forma la medición resulta un proceso complejo como consecuencia de que la probabilidad de ocurrencia de dispersión Raman es tan baja que corresponde a una entre mil partes de la radiación de la fuente. La principal característica de la espectroscopia Raman es que se toma como cero la frecuencia en la cual se presenta el máximo de intensidad de la dispersión Rayleigh que se caracteriza por ser la frecuencia de la fuente de excitación de un lado está la dispersión Raman estos con valores positivos y de otro lado están los valores Raman anti-Stokes con valores negativos, asumiendo que el origen está en la frecuencia de Rayleigh (Griffiths and De Haseth, 2007).

1.6. MODELOS PARA LA MOLÉCULA DE AGUA

Para el estudio de los espectros Raman y los espectros IR del agua existen dos modelos que explican las interacciones a nivel intramolecular e intermolecular. El primero se denomina modelo mixto, en este modelo se contemplan múltiples especies en las que cada molécula de agua tiene una cantidad diferente de enlaces respecto de las moléculas circundantes, estos enlaces son de corto alcance y sus enlaces débiles comparados con los enlaces de hidrógeno (Falk and Ford, 1966; Li et al., 2015), teniendo en cuenta estos enlaces al realizar la descomposición del espectro del agua se hace una asignación de una gaussiana por cada uno (Eisenberg and Kauzmann, 2005; Riemenschneider, 2011).

Por otra parte se encuentra el modelo continuo el cual explica la interacción de las moléculas de agua como una red con enlaces que si bien se rompen y reordenan constantemente se mantiene una estructura similar a la de una red, la característica principal es una geometría bien definida para las moléculas del agua la cual viene dada por un tetraedro en los cuales los enlaces se distorsionan, pero no se rompen por tanto las fuerzas entre enlaces son variables (Falk and Ford, 1966; Sun et al., 2010).

Estos modelos hasta el momento se encuentran en discusión a pesar de aportar una explicación con los suficientes argumentos que se evidencian en diferentes técnicas como difracción de rayos X , dispersión de neutrones, dispersión Raman de rayos X , entre otras, que brindan suficiente información para sustentar cada modelo (Auer and Skinner, 2008). El único hecho que no pasa desapercibido es que la banda de estiramiento es sensible al entorno molecular, es decir que la presencia de los iones que son sollevados por el agua generan cambios en el espectro del agua, que se atribuyen a la interacción electrostática de los iones. De cualquier manera encuentra que la interpretación de datos no es sensible al modelo que se tome.

El espectro del agua presenta dos modos de estiramiento fundamentales uno simétrico en 3657 cm^{-1} otro antisimétrico en 3756 cm^{-1} los cuales han sido calculados en fase gaseosa y se encuentran reportados en la bibliografía (Ratcliffe and Irish, 1982; Walrafen, 1962), sin embargo, se encontró que estos tienen corrimiento hacia el rojo, basados en estos datos y teniendo en cuenta que el contorno de la banda comprendida entre 2700 y 4000 cm^{-1} ; se realizó una deconvolución con dos gaussianas puesto que se observa un pico principal cerca de los 3400 cm^{-1} ; más la contribución de otro cerca de 3200 cm^{-1} .

1.7. SOLUCIONES ELECTROLÍTICAS

Es de interés para la comprensión de los efectos estudiados en este trabajo entender el concepto de soluciones electrolíticas acuosas, las cuales son mezclas homogéneas formadas por un soluto que puede ser: un ácido, una sal o una base, que se disuelve en agua (Chan, 2002). Las moléculas polares del agua atraen cargas contrarias del solvente debilitando y rompiendo el enlace iónico de este, el cual se disocia en especies libres cargadas (aniones y cationes) que terminan inmersos en medio acuoso. Los iones por el hecho de tener carga interactúan de forma electrostática con las moléculas de agua, es decir, las atraen de tal forma que terminan rodeados por estas a esto se le denomina capa de hidratación.

1.8. SOLVATACIÓN DE IONES EN SOLUCIONES ACUOSAS Y EFECTOS SOBRE EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y DISPERSIÓN RAMAN DEL AGUA

Dado que el componente principal de esta investigación es el agua, la cual se caracterizan por ser una sustancia cuya moléculas son polares, donde un átomo de oxígeno con carga neta positiva, esta enlazado con dos átomos de hidrógeno cada uno con carga neta negativa, además los hidrógenos forman enlaces con las moléculas vecinas, a esto se le llama “puentes de hidrógeno”, los cuales no son permanentes, por el contrario se rompen y reagrupan con otras moléculas vecinas (Sun et al., 2010). Cuando se disocia una sal en cada una de sus especies iónicas en agua, los iones atraen a las moléculas de agua de acuerdo a su polaridad, es decir si son cationes atraen al oxígeno y los aniones atraen por tanto los átomos de hidrógeno como se observa en la figura 1.5 .

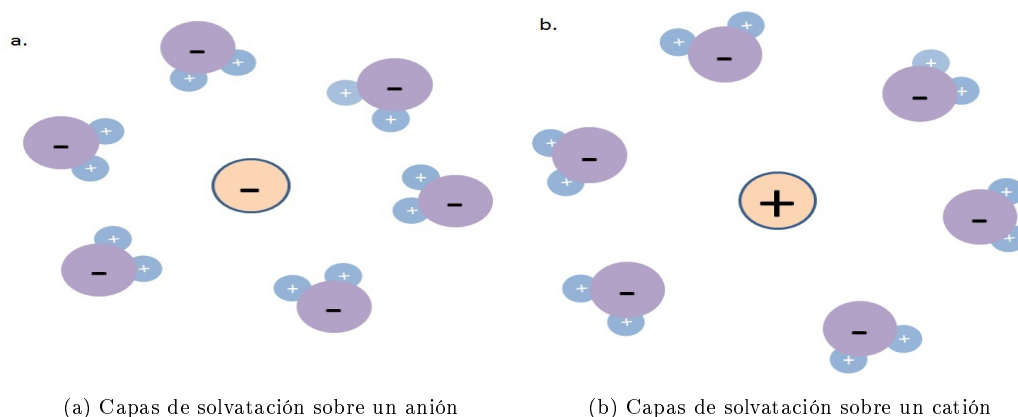
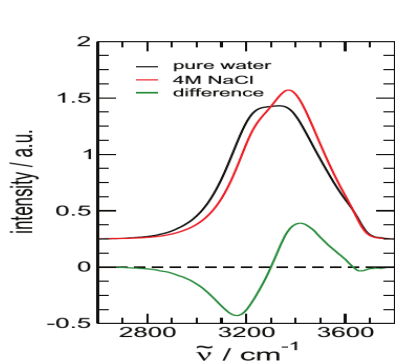
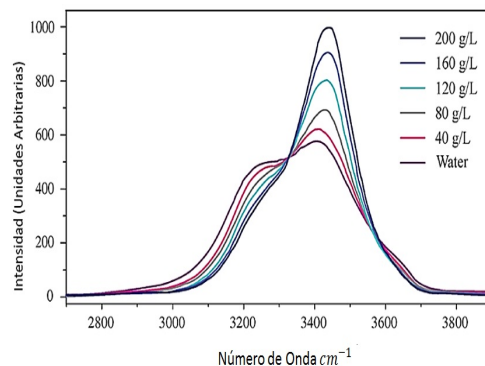


Figura 1.5: Ilustración de las capas de solvatación alrededor de un electrolitos

En estas figuras se puede ver como se agrupan las moléculas de agua alrededor de un ión de acuerdo a su polaridad, a esto se le denomina capa de solvatación en el caso específico de soluciones acuosas se denominan capas de hidratación. Esto origina cambios en las propiedades físicas del agua, por esto muchos estudios se han enfocado al estudio de las propiedades y variaciones al disolver una sal y variar su concentración, entre estos estudios se encuentran propiedades eléctricas, absorción en el infrarrojo (Riemenschneider, 2011; Subramanian and Fisher, 1972; Wei et al., 2005; Buijs and Choppin, 1963) y dispersión Raman (Li et al., 2015; Rull, 2002; Rull and De Saja, 1986; Wall and Hornig, 1967; Cappa et al., 2005). Además los iones no absorben en el IR, hecho que ha sido estudiado con anterioridad, sin embargo si perturban las moléculas vecinas (Max and Chapados, 2001).



(a) Espectro IR del agua pura comparado con solución de NaCl Riemenschneider (2011).



(b) Espectro Raman del agua para diferentes concentraciones de NaCl Đuričković et al. (2010)

Figura 1.6: Espectro Raman e IR del agua pura y solución de NaCl

Algunos autores como Riemenschneider y Đuričković han estudiado el efecto del cloruro de sodio (*NaCl*) sobre el espectro del agua (Riemenschneider, 2011; Đuričković et al., 2010), como se evidencia en la figura 1.6. De estos espectros se puede inferir cambios en el espectro del agua debido a la presencia de los iones sodio y cloro, que generan un corrimiento de la banda de absorción y la dispersión a bajas frecuencias.

Capítulo 2

METODOLOGÍA

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en cuatro etapas metodológicas: en la primera etapa se formuló el diseño experimental, la segunda etapa consistió en la preparación de la SME, junto con esta se realizó soluciones a diferentes concentraciones con cada una de las sales que fueron empleadas en su elaboración, durante la tercera etapa se hizo la adquisición de los espectros FTIR ATR y Raman de cada una de las soluciones y por último se realizó un tratamiento de los datos con su posterior análisis. A continuación se describe detalladamente cada etapa.

2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se elaboraron dos diseños experimentales; el primero aplicado a la búsqueda de parámetros que permitieran la repetitividad en los espectros del agua, este es de tipo factorial con tres niveles de estudio para la técnica FTIR ATR (Resolución, velocidad de barrido y Números de escáner) y el segundo consistía en un diseño experimental con un solo factor (concentración) el cual fue aplicado a las soluciones salinas. A continuación se hace una descripción de los diseños.

Parámetros de medición

Se realizó la adquisición de 8 espectros FTIR ATR de agua tipo I (Milli-Q), para cada posible combinación, donde se variaron:

- **Resolución:** 2, 4, 8 cm^{-1}
- **Velocidad de barrido del espejo del interferómetro:** (0.3165, 0.4747 y 0.6262) cm^{-1}/s
- **Número de barridos:** 50, 70, 90, 110, 150, 200, 250 y 300.

A los espectros adquiridos se les realizó un estudio estadístico, donde se le prestó especial atención al área bajo la curva y al pico de intensidad y su corrimiento tomando los parámetros que presentaron menor desviación. Estos fueron:

- **Resolución:** 8 cm^{-1}
- **Velocidad de barrido del espejo del interferómetro:** 0,6262 cm^{-1}/s
- **Número de barridos:** 110
- **Rango:** 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}

- **Temperatura:** laboratorio aproximada 19 °C

Los parámetros de medición de los espectros Raman fueron seleccionados con base en una búsqueda bibliográfica, de acuerdo con esto se utilizó una longitud de onda de 532 nm, con el fin de evitar efectos como fluorescencia y otros. Adicionalmente se realizó la adquisición de espectros con muestras saturadas para establecer los parámetros de medidas:

- **Longitud de onda del Láser:** 532 nm.
- **Intensidad:** 100 %
- **Tiempo de exposición de la muestra:** 10 segundos
- **Acumulaciones:** 10
- **Rejilla:** de 600 gr/mm

2.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La elaboración de la SME se realizó en 100 mL de agua tipo I (MilliQ), con las cantidades de sales que se observan en la tabla 2.1.

Sal	Cantidad (mg.)
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	2760,0 ± 0,1
Na_2HPO_4	2840,0 ± 0,1
$NaCl$	490,0 ± 0,1
KCl	3,7 ± 0,1
$CaCl_2$	3,7 ± 0,1

Tabla 2.1: Cantidad de cada una de las sales en el medio extracelular.

En preparación de las soluciones, se tuvo en cuenta que el aporte iónico lo hacen principalmente las sales de $NaCl$, KCl y $CaCl_2$, ya que los dos primeras sales mencionadas en la tabla 2.1, actúan como amortiguadoras, es decir, mantienen el pH básico y su aporte electrolítico es muy bajo, por lo cual no afectaron en gran medida el espectro del agua. Cada una de las soluciones saturadas se realizaron con las concentraciones especificadas en la tabla 2.2 en 25 mL de agua tipo I, posteriormente de cada una de las muestras se extrajo la cantidad necesaria para preparar soluciones de 3, 2 y 1 molar en un matraz de 5 mL.

sal	Concentración (M)	Cantidad de soluto (g.) / 25 mL de solución
$NaCl$	4	5,84 ± 0,01
KCl	4	7,45 ± 0,01
$CaCl_2$	4	14,70 ± 0,01

Tabla 2.2: Cantidad de reactivo para soluciones saturadas.

2.3. ADQUISICIÓN DE ESPECTROS

La adquisición de los espectros se realizó en el laboratorio de espectroscopia (LE), ubicado en el parque tecnológico Guatiguara (PTG), se empleó un espectrofotómetro Nicolet IS-50 y un espectrómetro

Labram HR Evolution marca Horiba Scientific, equipos a cargo del laboratorio de espectroscopia (LE) de la vicerrectoría de investigación y extensión (VIE). A continuación se presenta la serie de pasos que se siguen con cada uno de estos instrumentos de medición.

Adquisición de espectros FTIR- ATR.

1. Ajustar los parámetros de medida.
2. Limpiar de la celda ATR para evitar impurezas que puedan generar errores en la medición.
3. Realizar la adquisición de ruido de fondo.
4. Depositar una cantidad de agua suficiente para que cubra la celda, evitando que queden burbujas.
5. Realizar la adquisición del espectro.
6. Guardar el archivo, especificando el contenido, la concentración y los parámetros de medición.
7. Posteriormente se hace los pasos del número 2 al 5 con las otras muestras.

Adquisición de los espectros Raman.

1. Ajustar los parámetros de medida.
2. Realizar una calibración la cual se guarda para posteriores medidas y garantizar la reproducibilidad de las mediciones bajo las mismas condiciones.
3. Limpiar la celda de medición.
4. Depositar una muestra de 0,5 mL en la celda de medición.
5. Limpiar las caras de la celda de cuarzo evitando que queden huellas o motas del papel con el que realiza la limpieza.
6. Colocar la celda en el porta objetos.
7. Guardar cada uno de los archivos con el contenido, la concentración y los parámetros de medición
8. Repetir los pasos del numeral 3 al 7, con cada una de las muestras.

2.4. TRATAMIENTO DE ESPECTROS

Luego de la adquisición de los espectros, se realizó un tratamiento sobre los datos que consiste en dos procesos: Primero, se hace una corrección de línea base con dos puntos, con el fin de eliminar efectos dispersivos, reflexivos o anomalías instrumentales (Griffiths and De Haseth, 2007), que resultan en la adquisición de los espectros. Segundo, se realizó una deconvolución gaussiana con dos curvas de cada uno de los espectros FTIR ATR y Raman, con las cuales se obtuvo un coeficiente de determinación cercano a uno, el cual indica que los datos experimentales están relacionados con el modelo. Algunos trabajos presentan una mayor cantidad de gaussianas atribuidas a otras interacciones, que hasta el momento se encuentran en discusión (Riemenschneider, 2011). Para realizar estos dos procesos se construyeron algoritmos de programación en Python.

La deconvolución gaussiana permitió observar que la banda de estiramiento O-H del agua está compuesta por dos modos vibracionales que corresponden a las frecuencias donde se encontraron los valores máximos de intensidad de cada una de las curvas, esto se realizó con el fin de calcular el corrimiento

que se presentó en las soluciones, comparándolas con el agua. En la figura 2.1 se muestra un espectro con su respectiva deconvolución.

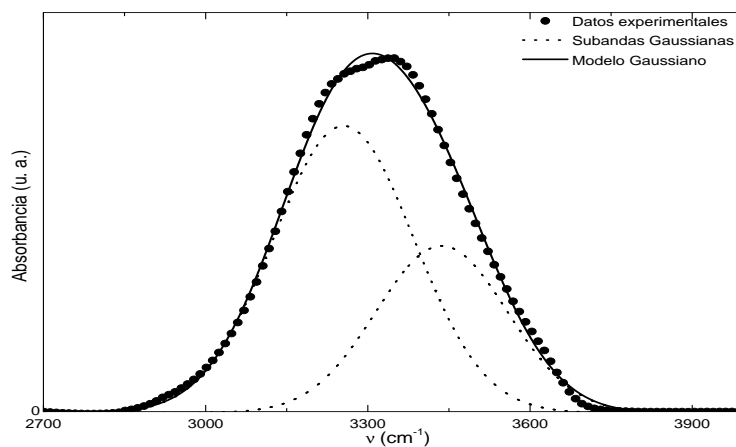


Figura 2.1: Deconvolución gaussiana para el espectro FTIR ATR del agua.

En la figura los puntos circulares corresponden a los datos experimentales tomados con el espectrómetro IR NICKOLET IS-50, las líneas punteadas representan las gaussianas que permitieron un ajuste de los datos, los cuales se asignaron a los modos de vibración de estiramiento O-H del agua y la línea continua el modelo gaussiano que se obtuvo para modelar los datos. La región de interés se encuentra entre los 2700 y 4000 cm^{-1} que corresponde a región donde se encuentran los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico del agua los cuales son afectados por las especies iónicas libres, ya que estas no tienen espectro vibracional en esta región Li et al. (2015).

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base a la metodología presentada en el capítulo 3, se presentan a continuación los resultados obtenidos en cada experimento en este proceso de investigación:

3.1. ESPECTROS FTIR ATR DEL MODELO EXPERIMENTAL DE LAS CONCENTRACIONES IONICAS DEL MEDIO EXTRACELULAR

Para estudiar los efectos de los iones sobre el agua en el medio extracelular y como estos influyen en las propiedades ópticas, se realizó una comparación de la absorción de agua con el medio extracelular. En la figura 3.1 se presentan los promedios de los espectros del agua en rojo y la SME en azul. El espectro de absorbancia del agua obtenido coincide con el reportado en la literatura por Eisenberg y colaboradores (Eisenberg and Kauzmann, 2005). En esta figura, se presenta una ampliación en el máximo de absorción entre 3200 y 3400 cm^{-1} , donde se muestran una serie de puntos de la media de los espectros junto con la desviación, en estos se observa un aumento leve de la absorbancia de la SME, sin embargo, estos se solapan con la desviación de los valores de obtenidos en el agua, este cambio puede interpretarse como la interacción de las moléculas de agua con los iones presentes en la solución.

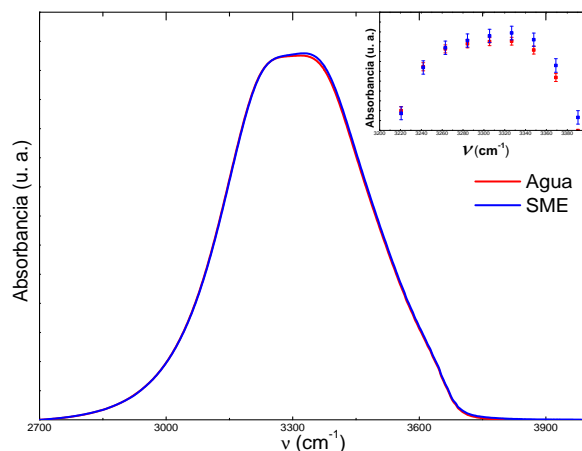


Figura 3.1: Espectro FTIR ATR del promedio del agua y la SME

Se realizó un promedio con el respectivo error, a cinco adquisiciones espectrales de la SME y del agua, cuyos resultados se encuentran en azul y en rojo respectivamente, posteriormente, se realizó una deconvolución con dos gaussianas, los datos obtenidos se encuentran condensados en la tabla 3.1. Este procesamiento de datos permitió obtener dos picos de interés que son útiles para estudiar los efectos de iones sobre las moléculas de agua (Bakker et al., 2005; Max et al., 2007) y son la base para explicar los cambios espectrales. En esta tabla se presentan los valores de las frecuencias en las que se presentan los máximos de la absorbancia de las bandas de la figura 3.1, estos se encuentran en 3279 cm^{-1} que corresponde a la banda de estiramiento simétrico y otro en 3485 cm^{-1} a la banda de estiramiento antisimétrico del agua. Se puede observar que el promedio de los desplazamientos de los picos de la SME no supera la desviación de las medidas hechas en agua, ni superan la sensibilidad del instrumento de medición que corresponde a 8 cm^{-1} , por lo tanto, esta variación puede hacer parte de errores sistemáticos en las medidas.

	Pico (cm^{-1})	Error	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	σ	Ancho (cm^{-1})	COD R^2
Agua	1	3279	± 1	-	$0,5$	$0,998$
	2	3485	± 2	-	$2,3$	
Medio	1	3282	± 1	3	-	$0,998$
	2	3488	± 2	3	-	

Tabla 3.1: Tabla picos de deconvolución con errores y desviación.

3.2. ESPECTROS DE DISPERSIÓN RAMAN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE LAS CONCENTRACIONES IONICAS DEL MEDIO EXTRACELULAR

En la figura 3.2 se presenta el espectro de dispersión Raman para el agua en rojo y una muestra tomada de la misma solución en azul. En esta figura se observa que no hay un cambio significativo entre el espectro de la solución comparado con el del agua, no se presenta un cambio en el ancho de la banda, ni variación en la frecuencia o la intensidad en el máximo. Lo anterior no se puede concluir acerca de la caracterización del medio empleando esta técnica, de esto se deduce que el efecto de la solvatación de las moléculas de agua sobre los iones a bajas concentraciones es muy débil.

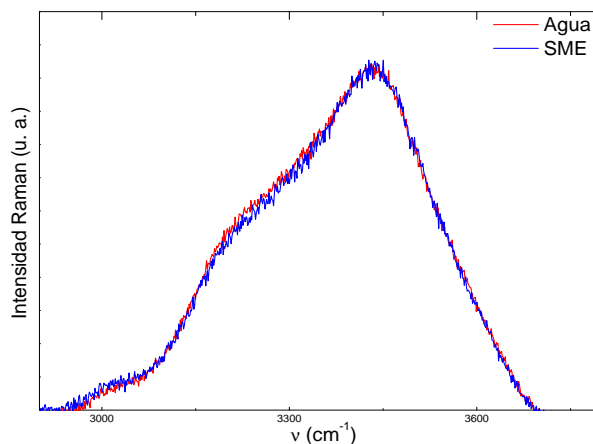


Figura 3.2: Espectro Raman del agua y la SME.

Se realizó una deconvolución con dos gaussianas para realizar una mejor interpretación de los resultados,

tabla 3.2. La deconvolución gaussiana con dos curvas no muestra corrimiento en los picos a 3223 cm^{-1} y 3441 cm^{-1} correspondientes a los modos de estiramiento simétrico y antisimétrico respectivamente, tampoco se presentó cambio en el ancho de las curvas. Por lo cual se deduce que las concentraciones de las sales empleadas en la preparación de la SME, no son suficientes para observar cambios en el espectro del agua debido al efecto de la solvatación de los iones.

sal	Pico 1 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Ancho medio	Pico 2 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Ancho medio	COD R ²
Agua	3223	-	192	3441	-	210	0,996
Medio	3223	0	192	3441	0	210	0,996

Tabla 3.2: Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros Raman de la SME.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se procedió a realizar un estudio de los efectos de cada una de sales con concentraciones entre uno molar y cuatro molar, las cuales son altas, comparadas con las empleadas en la solución que simuló medio el medio extracelular sanguíneo, de esta forma determinar los efectos que producen y observar un mínimo efecto de la solvatación.

3.3. ESPECTROS FTIR ATR PARA SOLUCIONES SALINAS ENTRE UNO Y CUATRO MOLAR

Para estudiar los efectos de los iones que aportan cada una de las sales a diferentes concentraciones sobre el espectro del agua por la técnica FTIR ATR se ha ordenado la presentación así: la figura 3.3 donde se ubica al lado izquierdo el espectro obtenido y al derecho la respectiva deconvolución, en el siguiente orden: CaCl_2 , KCl y NaCl , y posterior mente una tabla con los valores de los máximos de la absorbancia para cada solución salina y el agua obtenidos de la deconvolución.

En la figura 3.3 se muestra el cambio en la forma del espectro del agua con el aumento en la concentración de las sales. Se observa un leve disminución del ancho de la banda comprendida entre los 2700 cm^{-1} y los 3800 cm^{-1} , de igual manera el primer pico de absorbancia que se presenta cerca de 3200 cm^{-1} tiende a disminuir, el efecto más notorio es con el cloruro de potasio (KCl) y sodio (NaCl), al mismo tiempo, el pico cercano a los 3450 cm^{-1} aumenta y se desplaza a frecuencias más altas, en este caso la solución de cloruro de calcio (CaCl_2) produce un cambio mayor.

Teniendo en cuenta que trabajos similares han demostrado que la interacción ion-agua es de corto alcance, ya que principalmente afecta la primera capa de hidratación (Collins et al., 2007; Li et al., 2015) se deduce que a medida que se presenta una mayor cantidad de iones, más moléculas de agua los solvatan, por esta interacción se presentan los cambios en la absorbancia y corrimientos de picos, como resultado de variaciones en las vibraciones normales de las moléculas del agua (Max et al., 2007; Kitadai et al., 2014).

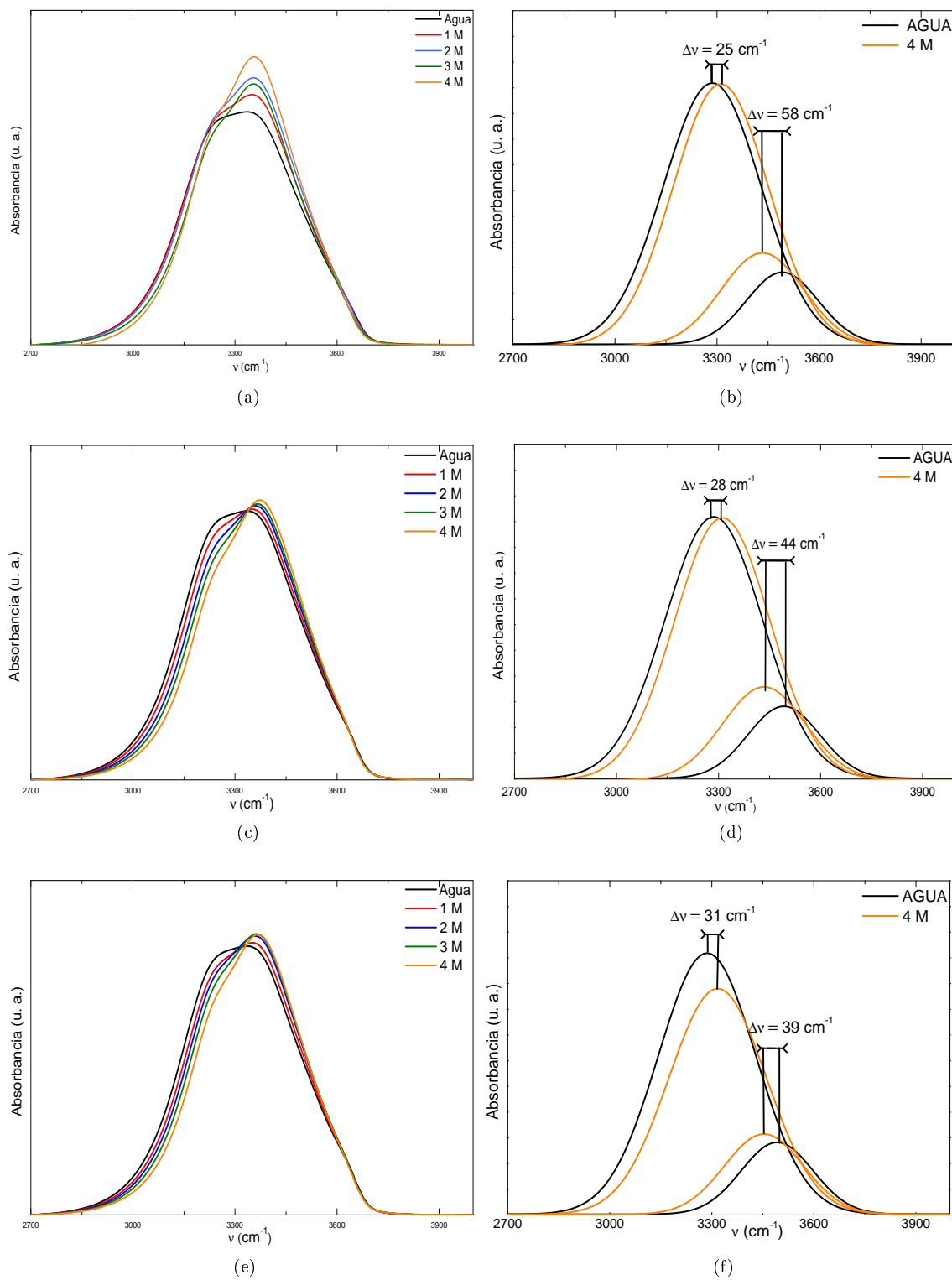


Figura 3.3: Espectros FTIR ATR de las soluciones de: (a) $CaCl_2$, (b) deconvolución gaussiana $CaCl_2$, (c) KCl , (d) deconvolución gaussiana KCl y (e) $NaCl$ y (f) deconvolución gaussiana $NaCl$, en estos el agua se representa con color negro, la concentración 1 molar de rojo, 2 molar de azul, 3 molar de verde y finalmente 4 molar de naranja.

En cuanto a la deconvolución los resultados se presentan en la tabla 3.3. Se observa un ajuste de dos gaussianas, estas muestran que todas las soluciones se correlacionan muy bien con los datos, además muestra que para cada una de las soluciones hay un desplazamiento que se incrementa con la concentración de cada una de las sales. El efecto más notorio se observa sobre la banda de estiramiento antisimétrico (3492 cm^{-1} para el agua), con un corrimiento a frecuencias bajas, con las máximas concentraciones estos son: 58 cm^{-1} para el CaCl_2 , 44 cm^{-1} para el KCl y 39 cm^{-1} para NaCl , en menor medida se ve el corrimiento del primer pico encontrado que corresponde a la banda de estiramiento simétrico (3286 cm^{-1}) con corrimiento a frecuencias más altas, los valores obtenidos son: 25 cm^{-1} para el CaCl_2 , 28 cm^{-1} para el KCl y 31 cm^{-1} para NaCl , en este comportamiento confirma que la presencia de los iones afecta los modos vibracionales del agua. Los resultados de los corrimientos se explican en cambios en la fuerza de los enlaces O-H del agua, por último reflejan el corto alcance de la interacción electrostática que solo afecta la primera capa de hidratación, esto se hace evidente en que a concentraciones bajas no hay un cambio notorio en el espectro del agua. De esta forma se confirma que la cantidad de sales en la SME tiene efectos tan pequeños difícilmente pueden ser observados por esta técnica.

sal	Concentración (M)	Pico 1 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Pico 2 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	COD R ²
Agua	-	3286 ± 8	-	3492 ± 8	-	0,998
CaCl_2	1	3295 ± 8	9	3479 ± 8	13	0,998
	2	3301 ± 8	15	3462 ± 8	30	0,998
	3	3308 ± 8	22	3443 ± 8	49	0,998
	4	3311 ± 8	25	3434 ± 8	58	0,998
KCl	1	3297 ± 8	11	3488 ± 8	4	0,998
	2	3307 ± 8	21	3479 ± 8	13	0,998
	3	3311 ± 8	25	3467 ± 8	32	0,998
	4	3314 ± 8	28	3448 ± 8	44	0,998
NaCl	1	3298 ± 8	12	3488 ± 8	4	0,998
	2	3306 ± 8	20	3480 ± 8	12	0,998
	3	3313 ± 8	27	3472 ± 8	20	0,998
	4	3317 ± 8	31	3453 ± 8	39	0,998

Tabla 3.3: Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros FTIR ATR para el agua y las soluciones salinas.

3.4. ESPECTROS DE DISPERSIÓN RAMAN PARA SOLUCIONES SALINAS ENTRE UNO Y CUATRO MOLAR

A continuación se presentan los espectros Raman empleando cada una de las soluciones estudiadas anteriormente por espectroscopia FTIR ATR. Se presenta el espectro obtenido del lado izquierdo de la figura, seguido la deconvolución realizada, tercero el análisis de las gráficas y cuarto las tablas de resultados, en el siguiente orden: CaCl_2 , KCl y NaCl .

En la gráfica 3.4 se observa el cambio en la forma del espectro del agua con el incremento de la concentración de las sales. Los principales efectos se reflejan en una disminución en el ancho de la banda comprendida entre los 2800 cm^{-1} y los 3900 cm^{-1} , además de una tendencia a la disminución en la intensidad del primer pico que se encuentra cerca de 3200 cm^{-1} , mientras que el pico cerca de los 3450 cm^{-1} aumenta la intensidad. Estos cambios se han discutidos en otros trabajos (Sun et al., 2010; Walrafen, 1962; Đuričković et al., 2010), se atribuyen a diferentes especies de las moléculas de agua y los cambios espectrales se atribuyen a cambios en su entorno. Para ratificar los resultados se realiza la respectiva deconvolución de la cual se obtuvo la información de la tabla 3.4.

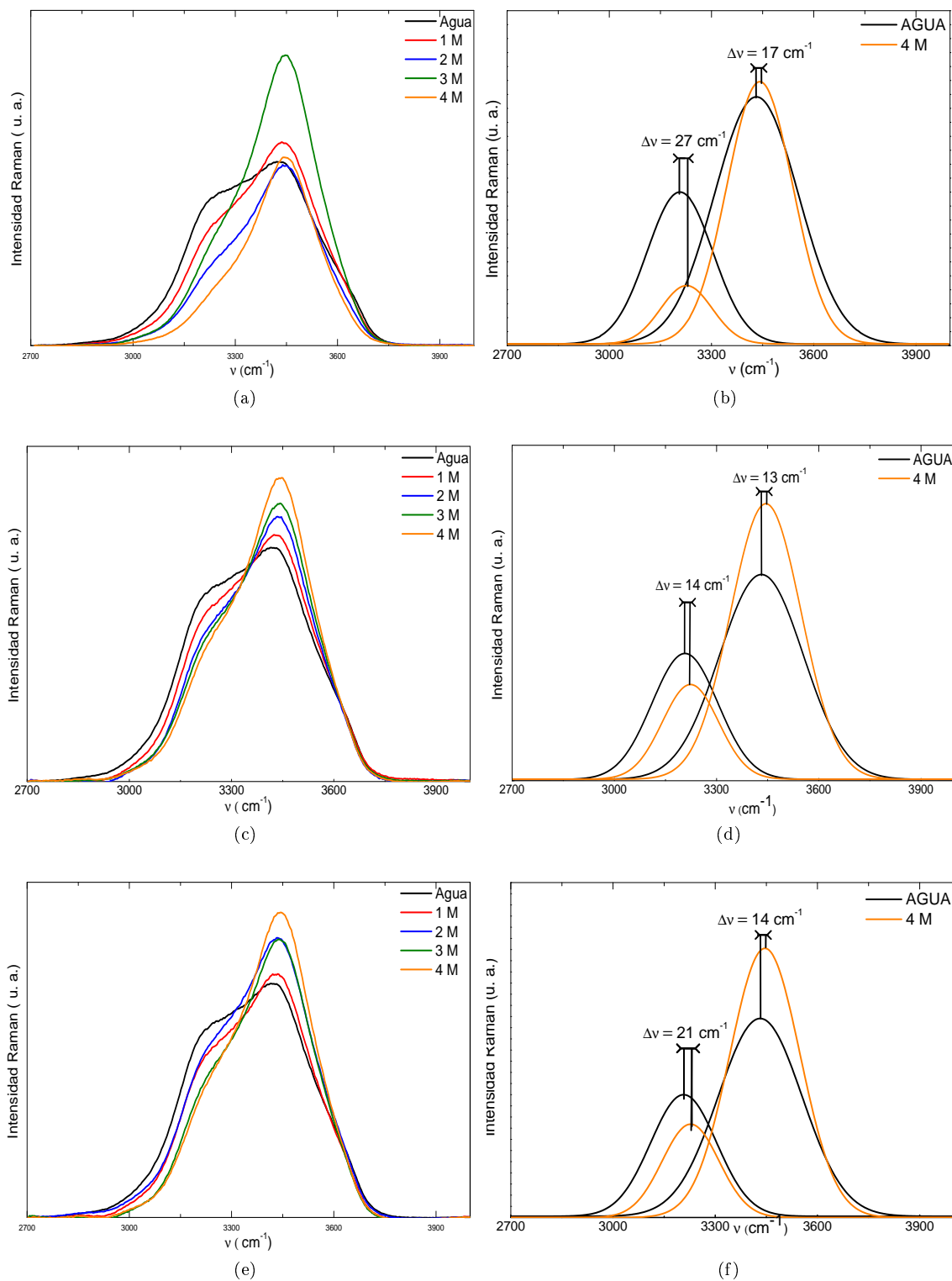


Figura 3.4: Espectros Raman de las soluciones de: (a) $CaCl_2$, (b) deconvolución gaussiana $CaCl_2$, (c) KCl , (d) deconvolución gaussiana KCl y (e) $NaCl$ y (f) deconvolución gaussiana $NaCl$, en estos el agua se representa con color negro, la concentración 1 molar de rojo, 2 molar de azul, 3 molar de verde y finalmente 4 molar de naranja.

En la tabla 3.4 se observa en primer lugar que el ajuste de los datos con dos curvas gaussianas se correlacionan muy bien, puesto que los valores están muy cerca a uno. Por otra parte los máximos de intensidad para el agua se presentan en 3207 cm^{-1} que se atribuye al modo de estiramiento simétrico, el cual sufre el efecto más fuerte con corrimiento hacia frecuencias más altas con las mayores concentraciones de la siguiente forma 27 cm^{-1} en la solución acuosa con CaCl_2 , el siguiente con 21 cm^{-1} en NaCl y 14 en KCl . El otro máximo se encuentra en 3432 cm^{-1} el cual se le asigna al estiramiento antisimétrico, igualmente se desplaza hacia frecuencias más altas en el mismo orden al del anterior, con los siguientes valores: 17 , 14 y 13 cm^{-1} respectivamente. Esto se explica como consecuencia de la interacción de los iones con el agua en esta se afecta la fuerza del enlace O-H, por este motivo se presenta el cambio en el espectro.

sal	Concentración (M)	Pico 1 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	Pico 2 (cm^{-1})	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	COD R ²
Agua	-	3207 ± 1	-	3432 ± 1	-	0,997
CaCl_2	1	3224 ± 1	14	3448 ± 1	16	0,998
	2	3227 ± 1	17	3449 ± 1	17	0,999
	3	3232 ± 1	22	3449 ± 1	17	0,999
	4	3234 ± 1	27	3449 ± 1	17	0,998
KCl	1	3207 ± 1	0	3432 ± 1	0	0,998
	2	3215 ± 1	8	3438 ± 1	6	0,999
	3	3219 ± 1	12	3443 ± 1	11	0,999
	4	3224 ± 1	14	3445 ± 1	13	0,998
NaCl	1	3214 ± 1	7	3436 ± 1	4	0,998
	2	3222 ± 1	15	3444 ± 1	12	0,998
	3	3223 ± 1	16	3443 ± 1	11	0,999
	4	3228 ± 1	21	3446 ± 1	14	0,999

Tabla 3.4: Picos obtenidos mediante deconvolución Gaussiana para los espectros Raman.

Tanto en las figuras de los espectros FTIR-ATR como en los espectros Raman, se presenta un corrimiento y un cambio en la región espectral observada, de esto se deduce que un cambio en la forma del espectro del agua es ocasionado por las interacciones entre los iones disueltos con las moléculas de agua, esto indica que la vibración normal de la molécula se ve afectada, un aspecto fundamental es que a bajas concentraciones estos efectos son leves, mientras que a concentraciones altas de sales se presentan efectos lo suficientemente fuerte para ser observados por estas técnicas, esto resulta del hecho que al disociarse la sal entre menor sea su cantidad, menos se ven afectadas las moléculas de agua por la presencia de los iones.

En las figuras de la deconvolución gaussiana para los espectros FTIR- ATR se muestra una mayor absorbancia para la primer curva, mientras que la segunda es menor, sin embargo para los espectros Raman se encuentra que la primer curva tiene una intensidad débil, mientras la segunda curva tiene una intensidad más alta, esto se explica por el hecho que mientras en IR se observa la absorción óptica en Raman se observala activación de los modos vibracionales.

Una característica interesante en las dos técnica aplicadas es que los picos que corresponden a los modos vibracionales se desplazan en mayor medida a concentraciones altas, es decir que si se toma como referencia el espectro del agua, en la medida que se incrementa la concentración de la sal, el pico de intensidad se desplaza levemente. Teniendo en cuenta que en todos los espectros se encuentra un patrón de corrimiento se llega a la conclusión que las especies iónicas de las sales afectan a una mayor cantidad de moléculas en la medida que aumenta la cantidad a concentraciones bajas, la cantidad de iones afectan muy levente a las moléculas y no es posible observar cambios espectrales del agua.

De acuerdo a los resultados obtenidos por la deconvolución se puede observar que el efecto más marcado en el corrimiento de las bandas lo aporta el cloruro de calcio $CaCl_2$, en ambas técnicas espectroscópicas, mientras que el KCl y el $NaCl$, presentan comportamientos casi iguales en los cambios del espectro del agua.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

Se desarrolló un diseño experimental tipo factorial de tres factores, que permitió establecer los parámetros experimentales de la técnica FTIR ATR y un diseño con un solo factor para la técnica de dispersión Raman, posteriormente se realizó un diseño con un solo factor para el estudio de la solución electrolítica que simula el medio extracelular sanguíneo (SME) y el agua. A partir de este diseño, se obtuvieron los espectros de absorción y dispersión Raman de SME y el agua. Al comparar la banda de absorción de estas dos soluciones, se observó un cambio en la morfología del espectro para el SME, mientras que para el espectro de dispersión Raman no se observó diferencia. Dado que el corrimiento de la banda del espectro de absorción del SME está por debajo de la sensibilidad del equipo, se propuso estudiar por separado el efecto de las principales sales a concentraciones iónicas más altas sobre el espectro de absorción y dispersión Raman del agua.

Se midieron los espectros de absorción y dispersión Raman para las soluciones acuosas de cloruro de sodio, calcio y potasio, a diferentes concentraciones y se compararon con los espectros de absorbancia y dispersión Raman del agua. A partir de los datos obtenidos se observó un corrimiento en la banda de absorción y dispersión Raman, y un cambio en la morfología, que dependen de las fracciones molares utilizadas y de la naturaleza del fenómeno utilizado para estudiar las diferentes soluciones acuosas.

Los espectros de absorción y dispersión Raman para el SME y el agua fueron analizados mediante la deconvolución de dos contribuciones gaussianas. Se encontraron dos picos de interés para el agua en 3286 cm^{-1} y 3492 cm^{-1} en IR, 3207 cm^{-1} y 3432 cm^{-1} en Raman. Se calcularon los corrimientos respecto al agua de las bandas de absorción y dispersión Raman para cada solución acuosa a diferentes concentraciones. Se observó un corrimiento de la banda de estiramiento anti-simétrico hacia bajas frecuencias para el espectro de absorción del agua, mientras que para el espectro de dispersión Raman se observó un corrimiento de la banda de estiramiento simétrico del agua hacia altas frecuencias. Este corrimiento se hace más fuerte a concentraciones mayores de las soluciones acuosas, afectando los estiramiento de enlaces O-H.

Los resultados obtenidos para las diferentes soluciones acuosas variando sus fracciones molares están en concordancia con resultados similares publicados por otros autores usando la técnica Raman. Destacando que en este estudio se presentaron medidas de absorbancia por la técnica FTIR ATR para las soluciones acuosas de cloruro de sodio, potasio y cloro, no reportadas aun en la literatura científica.

Bibliografía

- Auer, B. and J. Skinner (2008). Ir and raman spectra of liquid water: Theory and interpretation. *The Journal of chemical physics* 128(22), 224511.
- Backman, V. and H. K. Roy (2013). Advances in biophotonics detection of field carcinogenesis for colon cancer risk stratification. *Journal of Cancer* 4(3), 251.
- Backman, V., M. Wallace, L. Perelman, J. Arendt, R. Gurjar, M. Müller, Q. Zhang, G. Zonios, E. Kline, T. McGillican, et al. (2000). Detection of preinvasive cancer cells. *Nature* 406(6791), 35–36.
- Bakker, H., M. Kropman, and A. Omta (2005). Effect of ions on the structure and dynamics of liquid water. *Journal of Physics: Condensed Matter* 17(45), S3215.
- Breastcancer.org (2014, 21 june). Análisis para detectar el cáncer de mama: detección, diagnóstico y control. *Breastcancer.org*.
- Buijs, K. and G. Choppin (1963). Near-infrared studies of the structure of water. i. pure water. *The Journal of Chemical Physics* 39(8), 2035–2041.
- Cappa, C. D., J. D. Smith, K. R. Wilson, B. M. Messer, M. K. Gilles, R. C. Cohen, and R. J. Saykally (2005). Effects of alkali metal halide salts on the hydrogen bond network of liquid water. *The Journal of Physical Chemistry B* 109(15), 7046–7052.
- Chan, R. (2002). *Química*. McGraw Hill.
- Collins, K. D., G. W. Neilson, and J. E. Enderby (2007). Ions in water: characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophysical chemistry* 128(2), 95–104.
- Colthup, N. (2012). *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Elsevier.
- Eisenberg, D. and W. Kauzmann (2005). *The structure and properties of water*. Oxford University Press on Demand.
- Falk, M. and T. A. Ford (1966). Infrared spectrum and structure of liquid water. *Canadian Journal of Chemistry* 44(14), 1699–1707.
- Ferraro, J. R. (2003). *Introductory raman spectroscopy*. Academic press.
- Griffiths, D. J. and R. College (1999). *Introduction to electrodynamics*, Volume 3. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Griffiths, P. R. and J. A. De Haseth (2007). *Fourier transform infrared spectrometry*, Volume 171. John Wiley & Sons.
- Hall, J. E. (2010). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier Health Sciences.

- Kitadai, N., T. Sawai, R. Tonoue, S. Nakashima, M. Katsura, and K. Fukushi (2014). Effects of ions on the oh stretching band of water as revealed by atr-ir spectroscopy. *Journal of Solution Chemistry* 43(6), 1055–1077.
- Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman spectroscopy; principles and spectral interpretation*. Elsevier.
- Li, F., J. Yuan, D. Li, S. Li, and Z. Han (2015). Study on the structure of aqueous potassium chloride solutions using the x-ray diffraction and raman spectroscopy methods. *Journal of Molecular Structure* 1081, 38–43.
- Max, J.-J. and C. Chapados (2001). Ir spectroscopy of aqueous alkali halide solutions: pure salt-solvated water spectra and hydration numbers. *The Journal of Chemical Physics* 115(6), 2664–2675.
- Max, J.-J., V. Gessinger, C. van Driessche, P. Larouche, and C. Chapados (2007). Infrared spectroscopy of aqueous ionic salt solutions at low concentrations. *The Journal of Chemical Physics* 126(18).
- Miranda, D. A., S. P. Corzo, and C. G. Correa (2013). Cervical cancer detection by electrical impedance in a colombian setting. In *Journal of Physics: Conference Series*, Volume 434, pp. 012056. IOP Publishing.
- Miranda, D. A., R. K. L. Cristiano, and D. A. Triana (2014). Design, assembly and calibration of an optoelectronic device that measures three wavelengths in the near infrared for breast cancer early detection. In *Circuits and Systems (CWCAS), 2014 IEEE 5th Colombian Workshop on*, pp. 1–4. IEEE.
- Pinto, S. M., S. P. Corzo, S. C. Méndez-Sánchez, and D. A. Miranda (2016). Electrolytic extracellular phantom to study the low-frequency conductivity of cervical neoplasia. In *II Latin American Conference on Bioimpedance*, pp. 9–11. Springer.
- Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine* 16(3), 107–121.
- Ratcliffe, C. and D. Irish (1982). Vibrational spectral studies of solutions at elevated temperatures and pressures. 5. raman studies of liquid water up to 300. degree. c. *The Journal of Physical Chemistry* 86(25), 4897–4905.
- Requena, A. and J. Z. Román (2004). *Espectroscopía*. Pearson Educación.
- Riemenschneider, J. (2011). *Spectroscopic investigations on pure water and aqueous salt solutions in the mid infrared region*. Ph. D. thesis, University of Rostock.
- Rull, F. (2002). Structural investigation of water and aqueous solutions by raman spectroscopy. *Pure and applied chemistry* 74(10), 1859–1870.
- Rull, F. and J. De Saja (1986). Effect of electrolyte concentration on the raman spectra of water in aqueous solutions. *Journal of Raman spectroscopy* 17(2), 167–172.
- Skoog D.A., Holler F. J., N. T. A. (1992). *Principios de análisis instrumental* (5^ª ed.). McGraw Hill.
- Subramanian, S. and H. F. Fisher (1972). Near-infrared spectral studies on the effects of perchlorate and tetrafluoroborate ions on water structure. *The Journal of Physical Chemistry* 76(1), 84–89.
- Sun, Q., L. Zhao, N. Li, and J. Liu (2010). Raman spectroscopic study for the determination of cl⁻ concentration (molarity scale) in aqueous solutions: Application to fluid inclusions. *Chemical Geology* 272(1), 55–61.
- Đuričković, I., M. Marchetti, R. Claverie, P. Bourson, J.-M. Chassot, and M. D. Fontana (2010). Experimental study of nacl aqueous solutions by raman spectroscopy: Towards a new optical sensor. *Applied spectroscopy* 64(8), 853–857.

- Wall, T. T. and D. F. Hornig (1967). Raman spectra of water in concentrated ionic solutions. *The Journal of Chemical Physics* 47(2), 784–792.
- Walrafen, G. E. (1962). Raman spectral studies of the effects of electrolytes on water. *The Journal of Chemical Physics* 36(4), 1035–1042.
- Wei, Z.-F., Y.-H. Zhang, L.-J. Zhao, J.-H. Liu, and X.-H. Li (2005). Observation of the first hydration layer of isolated cations and anions through the ftir-atr difference spectra. *The Journal of Physical Chemistry A* 109(7), 1337–1342.
- Wilson, E. B. (1955). *Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra*. Courier Dover Publications.