

Detección de contaminantes en la agricultura mediante espectroscopia Raman





Detección de contaminantes en la agricultura mediante espectroscopia Raman

Roberto Ysacc Sato Berrú

Tesis presentada en parcial cumplimiento de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias (Óptica)

Asesor de Tesis: Dr. Jorge Medina Valtierra

Centro de Investigaciones en Optica

Universidad de Guanajuato

León, Gto.
Aguascalientes, Ags.

México
Diciembre 2003

Dedicado con mucho cariño:

A mis padres: Enrique Sato y Graciela Berrú

a mis hermanos: Walter, Felix, Miguel, Diry, Martín y Augusto

y

a mi musa: Elsi

**La superación... se encuentra
al alcance de
nuestras propias posibilidades.**

Agradecimiento

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido en la realización de mis estudios de Doctorado, así también, agradecer a las personas que me ayudaron en la culminación del presente trabajo de tesis.

Agradezco a los doctores del Centro de Investigaciones en Optica por los conocimientos brindados durante el desarrollo de los cursos, un agradecimiento especial al Dr. Jorge Medina Valtierra, asesor de la tesis, por su total apoyo en la realización de la presente tesis y al Dr. Claudio Frausto Reyes por su gran apoyo como Jefe del Laboratorio de Espectroscopia Raman.

Agradezco al Centro Latinoamericano de Física (CLAF), que por intermedio de su distinguido Director, Dr. Luis Másperi, me brindaron con el apoyo económico para dichos estudios y al Centro de Investigaciones en Optica, que por intermedio de sus autoridades me brindaron las condiciones necesarias para desarrollar y llevar a cabo los estudios, así como el trabajo de tesis.

Agradezco a la Dra. Sofía Acosta y al Dr. Alberto Arellano por su amistad, por el amplio apoyo brindado para mis estudios y por sus consejos.

Un agradecimiento muy especial al amigo y profesor, Cirilo Medina Gutiérrez, y por supuesto a su estimada familia que me han soportado estos años.

También agradezco al Dr. Llamas Miramontes, al Dr. Rodolfo Velásquez y al técnico José León por su amplia colaboración en este trabajo.

Agradezco al Dr. José Manuel Hernández, al Dr. Enrique Camarillo y al Dr. Hector Murrieta por su colaboración desinteresada en mi trabajo de tesis y hacia mi persona.

Agradezco a todas las personas del Centro de Investigaciones en Optica de la ciudad de León y de la ciudad de Aguascalientes por su amistad y por acogerme en sus instalaciones para la realización de mi tesis.

Agradezco a todas las personas que de alguna u otra forma me han apoyado para la realización de mis estudios de doctorado así como en la realización de esta tesis.

Agradezco a mi familia, sobrinos, primos y amigos por soportarme tantos años de sueños e ilusiones y que hoy día, con la culminación de la presente tesis, se hace realidad parte de esos sueños.

Resumen

En esta tesis se presenta un estudio, utilizando espectroscopia Raman, para la detección de contaminantes (pesticidas organofosforados) sobre algunas matrices agrícolas; así como también su aplicación en el campo de la agricultura, estudio de niveles de clorofila y β -caroteno. Se presenta el análisis y registro de espectros Raman de muestras estándares en el sistema NIR-Raman; se desarrolla un método para la detección de pesticidas sobre una muestra agrícola real. Además, se presenta una expresión matemática alternativa para el análisis cuantitativo de muestras líquidas. La cual fue usada para la medición de ingredientes activos de pesticidas; para la medición de varios compuestos (solventes) en mezclas y para la medición de algunos compuestos, desde altas concentraciones (porcentaje en volumen) hasta niveles de partes por millón. Se implementaron dos técnicas de análisis para ello: análisis de las muestras a través de viales de vidrio transparente y análisis de las muestras sobre un substrato de aluminio.

Prefacio

Todo el trabajo que se encuentra involucrado aquí forma parte de mi Tesis Doctoral en Ciencias (Optica) realizado en el Centro de Investigaciones en Optica, A.C. – CIO, México.

El objetivo de este trabajo fue el de encontrar un método para la detección de contaminantes en la agricultura mediante espectroscopia Raman. En el recorrido de este camino hemos encontrado varias dificultades que poco a poco hemos tenido que afrontarlos e ir solucionándolos en la medida de nuestras posibilidades y de la realidad presentada. De alguna manera, estas dificultades nos ayudaron para entender la espectroscopia Raman, y a la vez, conocer sus ventajas y desventajas como una técnica analítica.

Este trabajo no pretende abordar todos los puntos de la espectroscopia Raman, ya que ésta es muy amplia en aplicaciones y en técnicas, para lo cual hay muchos libros especializados. Pero a la vez hemos querido considerar y reunir en esta tesis algunos puntos como los fundamentos básicos del efecto Raman y otros en los apéndices para que a la vez, esta tesis, pretenda dar un alcance de los temas involucrados en esta técnica y sirva de ayuda para los que, como yo, recién se inician en el estudio de esta rama de la ciencia. En esta tesis la espectroscopia Raman fue orientada a una aplicación específica, obteniéndose en el camino algunas técnicas de análisis y expresiones matemáticas alternativas para la detección y medición de los contaminantes utilizados en el trabajo.

Esta tesis consiste de 5 capítulos y apéndices. El primer capítulo hace una introducción de la historia y de los principios básicos de la espectroscopia Raman, y además, se prefirió incluir en este capítulo la discusión del tema principal de esta tesis en una sección, es decir como una aplicación de la técnica Raman; el segundo capítulo hace una introducción sobre los plaguicidas y sus efectos tóxicos en la salud del ser humano y su impacto en el ambiente; el tercer capítulo presenta los equipos usados y las técnicas de

análisis aplicadas en la realización del presente trabajo; el cuarto capítulo presenta los resultados alcanzados en el trabajo y el análisis respectivo; el quinto capítulo presenta las conclusiones obtenidas en todo el trabajo, además de las perspectivas y aplicaciones de trabajos futuros, y por último, se consideran unos cuantos apéndices para complementar el trabajo de la tesis.

Roberto Ysacc Sato Berrú
Aguascalientes – México
2003

Publicaciones y trabajos

R.Y. Sato-Berrú, J. Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, ***“Quantitative NIR-Raman analysis of methyl parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates”***, Spectrochim. Acta Part A, Aceptado, noviembre-2003.

R.Y. Sato-Berrú, J. Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, ***“Quantitative NIR-Raman analysis in liquid mixtures”***, Spectrochim. Acta Part A, Aceptado, noviembre-2003.

R.Y. Sato-Berrú, C. Medina-Gutiérrez, J. Medina-Valtierra, C. Frausto-Reyes, ***“Aplicación de la espectroscopia Raman para la caracterización de pesticidas orgánicos”***, Rev. Int. Contam. Ambient. (Int. J. Environ. Pollut.), Aceptado, noviembre 2003.

J. Medina-Valtierra, R.Y. Sato-Berrú, C. Frausto-Reyes, ***“La Espectroscopia Raman molecular y su aplicación ambiental”***, Conciencia Tecnológica, Revista de divulgación científica y tecnológica del Instituto Tecnológico de Aguascalientes, 23 (2003) 20-23.

R.Y. Sato-Berrú, J. Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, ***“Rapid and simple analysis of organophosphorus pesticide formulations by NIR-Raman spectroscopy”***, Vibrational Spectroscopy, en revisión, abril – 2003.

R.Y. Sato B., C. Medina G., C. Frausto R., J. Medina V., Detección de pesticidas por espectroscopia NIR-Raman, sesión mural Optica III, XLV Congreso Nacional de Física, octubre 2002, León, Guanajuato – México. Premio: Tercer Lugar.

R.Y. Sato B., C. Medina G., C. Frausto R., J. Medina V., Análisis Cuantitativo en líquidos por espectroscopia NIR-Raman, sesión mural Sólidos IV, XLVI Congreso Nacional de Física, octubre 2003, Mérida, Yucatán – México.

Tabla de contenidos

Dedicatoria		V
Agradecimiento		VII
Resumen		IX
Prefacio		X
Publicaciones y trabajos		XII
Tabla de contenidos		XIV
Capítulo 1	Espectroscopia Raman	1
1.1	Historia de la espectroscopia Raman	1
1.2	Efecto Raman	3
1.3	Polarizabilidad	8
1.4	Intensidad de una banda Raman	10
1.5	Vibraciones moleculares	11
1.6	Microscopia Raman	12
1.7	Aplicación de la técnica Raman en la detección de contaminantes	14
Capítulo 2	Plaguicidas y toxicidad	15
2.1	Introducción	15
2.2	Clasificación de los plaguicidas	16
2.3	Los plaguicidas y la salud	18
2.4	Los plaguicidas y el ambiente	24
Capítulo 3	Equipos y técnicas de análisis	26
3.1	Sistema VIS-Raman	27
3.2	Sistema NIR-Raman	29

3.3	Técnica de análisis usando el sistema i-45	30
3.4	Técnica de análisis usando el sustrato de Aluminio	31
3.5	Procedimiento analítico	32
Capítulo 4	Resultados y análisis	35
4.1	Análisis cualitativo	36
	a) Comparación de espectros Raman entre el sistema VIS- y NIR-Raman	36
	b) Análisis de muestras estándares	38
	c) Aplicación del papel aluminio como sustrato en micro-Raman	40
	d) Simulación de extracción y contaminación con pesticidas	42
4.2	Análisis cuantitativo en viales	45
4.3	Análisis cuantitativo en el sustrato de aluminio	55
4.4	Estudio de clorofila y β -caroteno en chile <i>ancho</i>	61
4.5	Detección de paratión metílico y malatión en chile <i>ancho</i>	67
Capítulo 5	Conclusiones	71
Apéndices		75
	Apéndice 1- Vibraciones de la molécula de agua: H ₂ O	76
	Apéndice 2- Grupos funcionales en la química orgánica	81
	Apéndice 3- Frecuencias características Raman	90
	Apéndice 4- Técnicas químicas de análisis	96
	Apéndice 5- Preparación de muestras y técnicas de extracción	99
	Apéndice 6- Unidades de concentración	106
	Apéndice 7- Espectros Raman de diversos compuestos	110
Bibliografía		143
Índice de figuras		153
Índice de tablas		157

Capítulo 1

Espectroscopia Raman

1.1 Historia de la espectroscopia Raman

El efecto Raman fue predicho teóricamente por Smekal en 1923 pero fue demostrado experimentalmente primero por Raman. En 1928, cuando Sir Chandrasekhra Venkata Raman descubrió el fenómeno que lleva su nombre, únicamente instrumentos rústicos fueron disponibles. En el estudio de muestras líquidas, Sir Raman usó la luz del sol como la fuente y un telescopio como el colector; sus ojos fueron usados como el detector.

Gradualmente, los progresos en los componentes diversos de la instrumentación Raman lo colocaron en su sitio. En el comienzo, los investigadores estuvieron concentrados en el desarrollo de mejores fuentes de excitación. Varias lámparas fueron desarrolladas (ej. Helio, bismuto, plomo, zinc). Aquellos probaron ser insatisfactorios a causa de la baja intensidad de la luz. Las fuentes de mercurio también fueron desarrolladas, en principio para otros propósitos, pero desde 1930 fue utilizado para el fenómeno Raman hasta el

advenimiento de los láseres. En 1962 las fuentes láser fueron desarrolladas para usarlas con la espectroscopia Raman.

Los progresos también ocurrieron en los sistemas de detección para mediciones Raman. Al principio las mediciones originales fueron hechas usando placas fotográficas, luego aparecieron los instrumentos fotoeléctricos, desarrollados después de la Segunda Guerra Mundial. En este modo fotoeléctrico, un fotomultiplicador fue usado como el detector en un equipo Raman. La cámara CCD (Charge Coupled Devices) es otro de los detectores acoplados recientemente en espectroscopia Raman.

Desarrollos en las ópticas de la instrumentación Raman empezó en la década de los sesenta. Se descubrió que un monocromador doble remueve la luz de la fuente más eficientemente que un monocromador simple. Después, un monocromador triple fue introducido, la cual fue más eficiente para remover la luz de la fuente. Las rejillas holográficas aparecieron en 1968, las cuales se sumaron a la eficiencia de la colección del esparcimiento Raman.

Esta breve descripción del desarrollo en la instrumentación Raman nos da una idea del camino que tuvo que recorrer esta técnica en sus inicios. Ahora los espectros Raman se pueden obtener por espectroscopia de transformada de Fourier, conocido como los instrumentos FT-Raman, por espectroscopia Raman No-lineal, por microscopia Raman, por espectroscopia Raman de aumento superficial (SERS), entre otras técnicas Raman, las cuales, se pueden encontrar en libros especializados y publicaciones [1-6].

La espectroscopia Raman y sus diversas técnicas están ahora encontrando aplicaciones a través de un amplio rango de áreas de investigación, como en la bioquímica, biología, medicina, estado sólido, química estructural, aplicaciones industriales entre otras [7-10].

1.2 Efecto Raman

Cuando un haz de luz monocromática incide sobre un conjunto de moléculas, la mayoría de los fotones son esparcidos elásticamente. Por lo tanto, los fotones esparcidos tienen la misma energía (frecuencia) y longitud de onda como los fotones incidentes. Sin embargo, una cantidad pequeña de luz (aproximadamente 1 en 10^7 fotones) es esparcida a frecuencias ópticas diferentes, usualmente más bajas que la frecuencia de los fotones incidentes. El proceso que conlleva este esparcimiento inelástico es conocido como el efecto Raman.

La diferencia de energía entre el fotón incidente y el fotón Raman-esparcido es igual a la energía de la vibración de un enlace de la molécula en estudio. Una gráfica de la intensidad de la luz esparcida versus una constante proporcional a la diferencia de energía, es un espectro Raman.

Cuando la luz interacciona con la materia, dependiendo de la energía de la fuente de excitación, se presentan varios procesos de esparcimiento de la luz. En la Figura 1 se muestran estos diferentes mecanismos de esparcimiento.

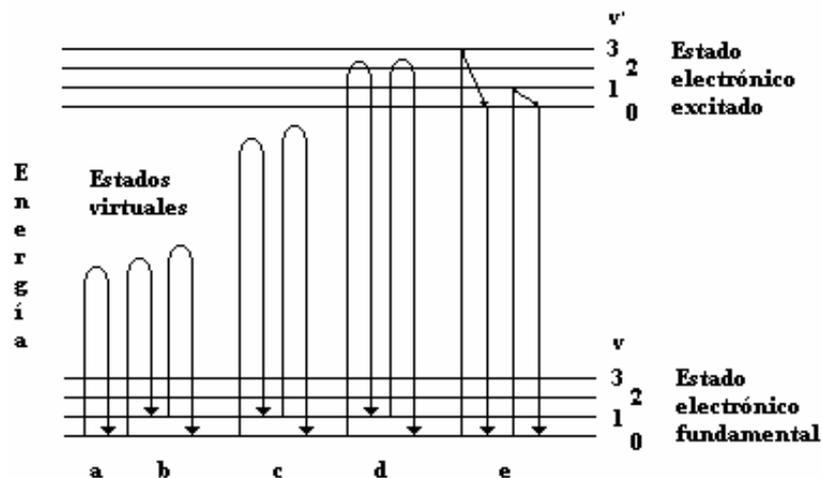


Figura 1: Mecanismos de varios procesos de esparcimiento de la luz. (a) Rayleigh, (b) Raman no-resonante, (c) Raman pre-resonante, (d) Raman resonante y (e) fluorescencia resonante.

De acuerdo a la **teoría clásica**, el esparcimiento Raman se produce por los cambios que tienen lugar en la polarizabilidad (α) de una molécula durante la vibración. La polarizabilidad es una medida de la facilidad con la cual pueden distorsionarse las nubes de electrones que están alrededor de los átomos en la molécula. Los átomos más pesados tienen nubes electrónicas más grandes y en consecuencia tienen mayores polarizabilidades individuales. Cuando una molécula que vibra interactúa con el campo eléctrico de un haz incidente de radiación electromagnética (el haz láser), se induce un dipolo oscilante,

$$\mu_{ind} = \alpha E, \quad (1.1)$$

donde E es el campo eléctrico del haz incidente. Sin embargo, el campo eléctrico es oscilante de frecuencia ν que depende del tiempo, el cual se puede escribir como:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t. \quad (1.2)$$

Por otro lado, la polarizabilidad de una molécula puede describirse por una expansión de Taylor, como:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 Q + \dots, \quad (1.3)$$

donde Q se refiere a la coordenada normal, es decir, éste es el término matemático del conjunto completo de estiramientos de enlaces y flexiones de ángulos que tienen lugar durante una vibración particular y $(d\alpha/dQ)_0$ es el cambio en la polarización durante la vibración descrita por la coordenada normal Q . Los subíndices “0” indican que las cantidades se valoran en la posición de equilibrio de la vibración.

Al sustituir estas dos últimas relaciones en la ecuación (1.1), se obtiene:

$$\mu_{ind} = \left[\alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 Q \right] E_0 \cos 2\pi\nu t. \quad (1.4)$$

Sin embargo, la coordenada normal también depende del tiempo:

$$Q = A \cos 2\pi\nu_i t, \quad (1.5)$$

donde A es una constante y ν_i es la frecuencia de la i -ésima vibración. Por lo tanto, la ecuación (1.4) se convierte en:

$$\mu_{ind} = \left[\alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 A \cos 2\pi\nu_i t \right] E_0 \cos 2\pi\nu t. \quad (1.6)$$

Usando la relación trigonométrica:

$$2 \cos x \cos y = \cos(x + y) + \cos(x - y),$$

en la ecuación (1.6) y separando los términos, se tiene la ecuación final para el esparcimiento Raman:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu t + \frac{A E_0}{2} \left(\frac{d\alpha}{dQ} \right)_0 * [\cos 2\pi(\nu + \nu_i)t + \cos 2\pi(\nu - \nu_i)t]. \quad (1.7)$$

El primer término de la ecuación (1.7) representa un dipolo oscilante que radia luz de frecuencia ν (esparcimiento Rayleigh). El término segundo corresponde al esparcimiento Raman de frecuencia $(\nu + \nu_i)$ nombrado como anti-Stokes, y de frecuencia $(\nu - \nu_i)$ (Stokes). Para que los términos de derivadas no sean cero, al menos uno de los componentes de la polarizabilidad, α_{xx} , α_{xy} , etc., debe de cambiar durante la vibración descrita por una coordenada normal “ Q ” [2, 7].

En **mecánica cuántica**, el esparcimiento es descrito como una excitación a un estado virtual, más bajo en energía que una transición electrónica real (ver Figura 1), con la desexcitación casi inmediata (el evento de esparcimiento ocurre en 10^{-14} segundos o menos) y un cambio en la energía vibracional, es decir, que los cambios de frecuencia en las bandas Raman son determinados por la diferencia de energía de los niveles vibracionales entre los cuales las transiciones toman lugar. A fin de encontrar que transiciones ocurren y con qué intensidad, es necesario calcular las probabilidades de transición, las cuales son tratamientos más especializados que salen del tema de este trabajo [1].

Para amplitudes pequeñas de los núcleos de una molécula poliatómica, las cuales pueden ser consideradas como una superposición de osciladores armónicos, se puede tomar en cuenta los resultados de la aproximación del oscilador armónico en la molécula diatómica. Esto es, el espectro Raman (también el espectro de absorción en el infrarrojo) tiene la regla de selección:

$$\Delta \nu_i = \pm 1 \quad (1.8)$$

para cada vibración normal ν_i . Donde los osciladores, en esta aproximación, son independientes, ningún salto simultaneo de dos o más vibraciones pueden ocurrir.

La descripción del estado virtual del esparcimiento es mostrada en la Figura 2.

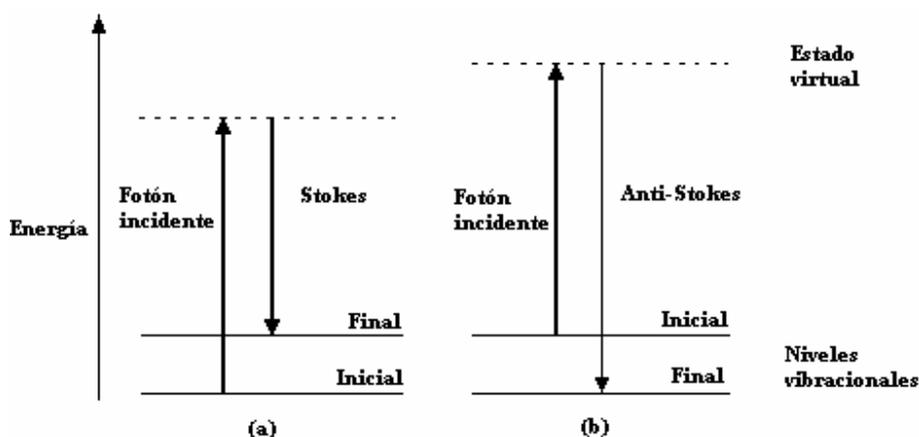


Figura 2: Diagrama de niveles de energía para el esparcimiento Raman. (a) esparcimiento Raman Stokes y (b) esparcimiento Raman anti-Stokes.

La diferencia de energía entre los fotones incidente y esparcido es representada por las flechas de diferentes longitudes en la Figura 2. Numéricamente, la diferencia de energía entre los niveles vibracionales inicial y final, o corrimiento Raman, en números de onda (cm^{-1}), es calculada a través de la siguiente ecuación:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda_{\text{incidente}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{esparcido}}}, \quad (1.9)$$

en la cual, $\lambda_{\text{incidente}}$ y $\lambda_{\text{esparcido}}$ son las longitudes de onda (en cm) de los fotones incidente y Raman esparcidos, respectivamente. La energía vibracional es finalmente disipada como calor. Debido a la baja intensidad del esparcimiento Raman, la disipación de calor no causa un aumento de temperatura medible en el material.

A temperatura ambiente, la población térmica de los estados excitados vibracionales es bajo, aunque no cero. Por lo tanto, para la mayoría de las moléculas, el estado inicial es el estado base, y el fotón esparcido tendrá energía más baja (longitud de onda más grande) que el fotón excitador (llamado corrimiento Stokes). Este esparcimiento de Stokes es lo que normalmente se observa en espectroscopia Raman y se esquematiza en la Figura 2a.

De acuerdo a la distribución de población de estados de Boltzman, una pequeña fracción de las moléculas está en estados vibracionalmente excitados. El esparcimiento Raman de las moléculas vibracionalmente excitadas llevan a la molécula al estado base. El fotón esparcido aparece con energía más alta, como se muestra en la Figura 2b. Debido a la poca cantidad de moléculas excitadas, el espectro Raman de corrimiento anti-Stokes es siempre más débil que el espectro de corrimiento Stokes, ver Figura 3. Los espectros de Stokes y anti-Stokes contienen la misma información de frecuencia.

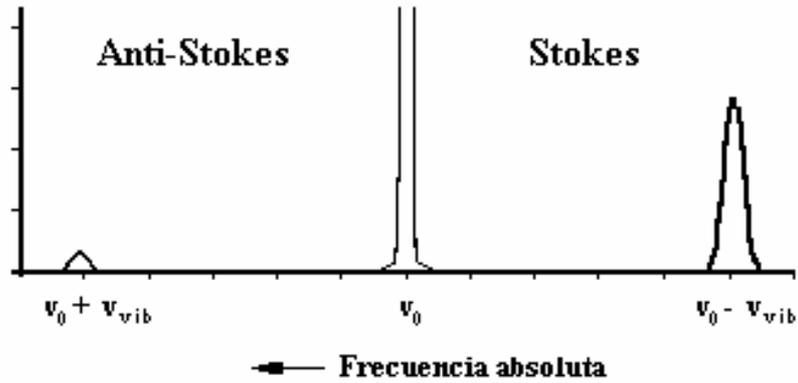


Figura 3: Espectro Raman, Stokes y anti-stokes.

1.3 Polarizabilidad

Sin embargo, debe señalarse que la polarizabilidad en equilibrio (α_0) es realmente un tensor, ya que el dipolo inducido y el campo eléctrico son cantidades vectoriales:

$$\begin{pmatrix} \mu_{ind}(x) \\ \mu_{ind}(y) \\ \mu_{ind}(z) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix} \quad (1.10)$$

Hay nueve componentes en el tensor de polarizabilidad, pero para la espectroscopia Raman convencional se utilizan seis de ellos porque $\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$, $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$ y $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$. Hay dos propiedades invariantes (constantes a pesar de la orientación de la molécula) en este tensor: (1) el valor medio $\bar{\alpha}$ y (2) la anisotropía γ .

El valor medio puede ser escrito como:

$$\bar{\alpha} = \frac{1}{3}(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (1.11)$$

y la anisotropía como:

$$\gamma = \frac{1}{2}[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6(\alpha_{xy}^2 + \alpha_{xz}^2 + \alpha_{yz}^2)]. \quad (1.12)$$

La espectroscopia Raman tiene ventajas sobre la espectroscopia infrarroja, porque el rayo láser empleado para excitar la muestra está polarizado en un plano en la dirección vertical. Esto es una característica importante puesto que significa que para líquidos, gases y cristales individuales orientados (pero no para materiales policristalinos o pulverizados), es posible analizar la luz Raman dispersada tanto en forma paralela como perpendicular a esta polarización incidente por medio de un analizador, Figura 4.

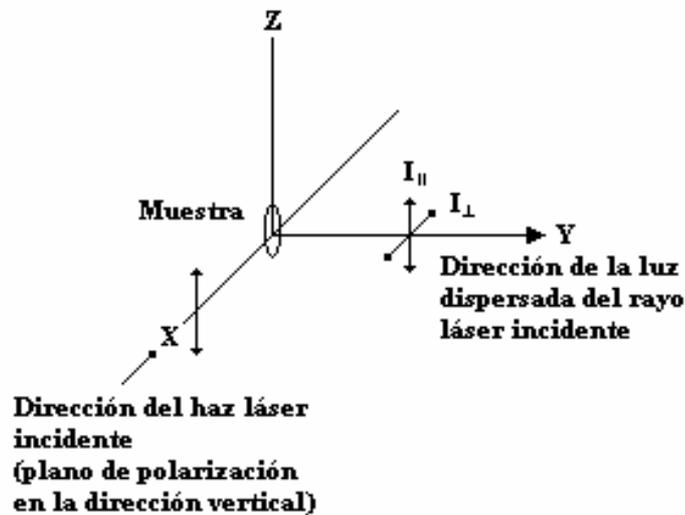


Figura 4: Representación esquemática de las mediciones del cociente de despolarización realizadas en un experimento Raman con láser.

Al cociente de las intensidades de la luz dispersada en estas dos orientaciones se le conoce como **cociente de despolarización**, ρ . Un tratamiento más extenso del cociente de despolarización se puede encontrar en las referencias [7, 11].

$$\rho = \frac{I(\textit{perpendicular})}{I(\textit{paralela})} = \frac{3\gamma^2}{45\alpha^2 + 4\gamma^2} \quad (1.13)$$

Al ver los límites posibles de la ecuación (1.13), es evidente que si, $\gamma^2 = 0$, entonces $\rho = 0$. Cuando ocurre tal situación, se dice que la banda Raman está completamente polarizada. En la teoría de grupos, solo las vibraciones totalmente simétricas satisfacen esta condición. Para todas las demás vibraciones (despolarizadas), $\alpha^2 = 0$, y así la ecuación (1.13) se reducirá a 3/4. En general, es relativamente fácil identificar las bandas Raman debidas a las vibraciones totalmente simétricas por su comportamiento de polarización, ya que estos exhiben valores entre 0 y 0.75.

1.4 Intensidad de una banda Raman

La intensidad (I) de una banda Raman depende del cuadrado de la derivada de la polarizabilidad:

$$I_{mn} = \textit{constante} \cdot I_0 (\nu_0 - \nu)^4 \sum_{ij} |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (1.14)$$

donde I_0 es la intensidad incidente y α_{ij} representa las componentes del tensor de polarizabilidad asociado con la transición $m \rightarrow n$. Información adicional se puede encontrar en la literatura [11].

1.5 Vibraciones Moleculares

La energía de un modo vibracional depende de la estructura molecular y su ambiente. En donde, la masa atómica, el orden del enlace, sustitutos moleculares, geometría molecular y todos los enlaces de hidrógeno afectan la constante de fuerza vibracional, la cual a su vez determina la energía vibracional. Por ejemplo, la frecuencia de stretching (estiramiento) de un enlace fósforo-fósforo va desde 460 a 610 a 775 cm^{-1} para los enlaces simple, doble, y triple, respectivamente.

En moléculas diatómicas, la vibración ocurre únicamente a lo largo del enlace químico que conecta a los núcleos. En moléculas poliatómicas, la situación es complicada porque todos los núcleos desarrollan sus propias oscilaciones armónicas. Por lo general la molécula de N-átomos tiene $3N-6$ grados de libertad, las cuales son necesarias para especificar las posiciones de todos los átomos (las 6 coordenadas describen el movimiento traslacional y rotacional). Las moléculas lineales tienen $3N-5$ grados de libertad, ya que no existe libertad rotacional alrededor del eje molecular.

Estas $3N-6$ vibraciones de una molécula poliatómica no lineal pueden ser descritas clásicamente por un correspondiente número de modos normales. Las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a sus simetrías. El análisis es basado enteramente en la geometría de la molécula en su configuración de equilibrio, la cual es caracterizada por ciertas operaciones simétricas. El ensamble de operaciones simétricas forma un grupo en el sentido matemático. Esta aplicación de la teoría de grupos permite que los modos normales sean clasificados de acuerdo a ciertas especies simétricas (representaciones irreducibles) para cada grupo. Sobre este tema se pueden encontrar capítulos enteros en la literatura [7-9, 12]. En el Apéndice 1 se muestra a la molécula de agua como un ejemplo sobre la utilización de la teoría de grupos, con respecto al análisis de sus vibraciones moleculares y en el Apéndice 2, a manera de revisión, se muestran los grupos funcionales más comunes de la química orgánica.

A fin de visualizar las vibraciones normales. En la Figura 5 se presenta un modelo mecánico de algunos ejemplos de las vibraciones más comunes. En el Apéndice 3 se presentan las frecuencias Raman de algunos grupos orgánicos.

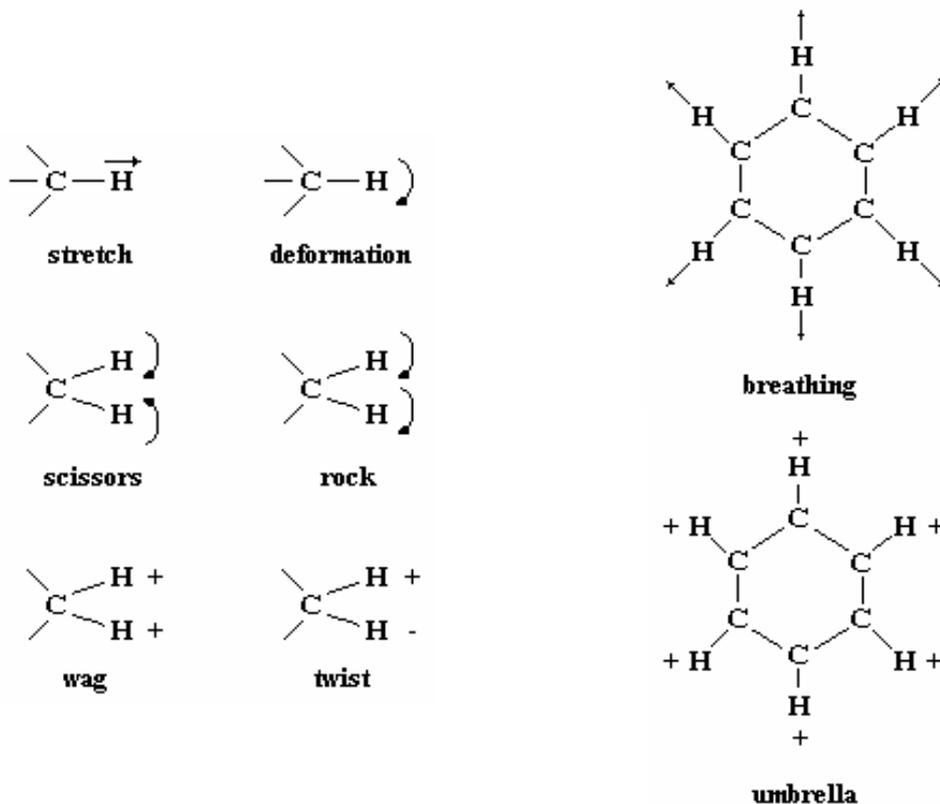


Figura 5: Modos vibracionales. (+) y (-) significan fuera del plano del papel.

1.6 Microscopia Raman

La microscopia Raman fue desarrollada en los 70's. Delhaye en 1975 [13] hizo la primera medición con un sistema micro-Raman. Este trabajo estableció la utilidad de la espectroscopia Raman para el análisis de partículas microscópicas. La técnica proporcionó la capacidad de obtener espectro Raman analítico - cualitativo con una resolución espacial de $1 \mu m$, usando muestras en el rango de los picogramos.

Las características importantes de la microscopia Raman están directamente relacionadas a dos consideraciones ópticas fundamentales: (1) la focalización del haz láser sobre la muestra y (2) la colección de la luz esparcida.

El sistema óptico de un micro-Raman emplea la configuración de backscattering, ver Figura 6. Las muestras son colocadas sobre la base del microscopio y visualizada usando luz blanca transmitida para una muestra transparente o luz blanca incidente para una muestra opaca, a través del ocular o algún sistema de vídeo con una cámara. El área de interés de la muestra es localizada centralmente en el campo de visión y luego, la muestra es irradiada por un haz láser.

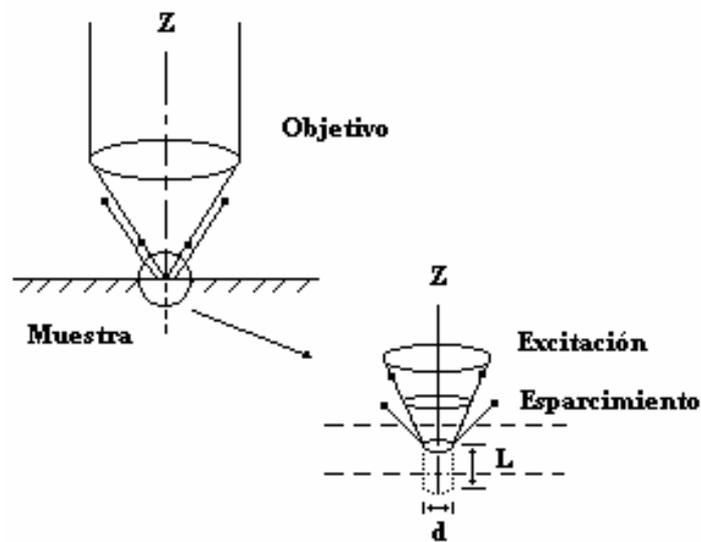


Figura 6: Configuración de backscattering.

La elección de los objetivos depende del tipo de muestra a ser examinado. Si las muestras consisten de micropartículas en el rango de tamaños de las sub-micras, el objetivo debe tener una alta amplificación y apertura numérica (A.N.) grande (un objetivo de apertura numérica grande coleccionará la luz esparcida sobre un ángulo sólido mayor, es decir, más señal Raman es detectable). Si los tamaños de las muestras son de 5 micras o más, un objetivo de 50X o 60X de 0.8 de A.N. es adecuado. Un objetivo de 10X con 0.3 de A.N. o 5X con 0.1 de A.N. es usado para la visualización inicial y localización de las áreas de interés [3, 4, 14].

1.7 Aplicación de la técnica Raman en la detección de contaminantes

La técnica Raman se viene aplicando en diversas áreas de las ciencias [15-29]. Una de las áreas de gran interés en la actualidad, es la que corresponde a la detección de contaminantes, las cuales también han sido analizadas con esta técnica [30-36]. En estos trabajos se demuestra la aplicabilidad de esta técnica en la detección de diversas sustancias y en diversas matrices, como por ejemplo: agua, vegetales, frutas, tierra, tejido humano, entre otras.

Como veremos en el capítulo 2, los contaminantes más comunes y abundantes son los plaguicidas [37-41], los cuales han sido estudiados y analizados por diferentes métodos y equipos [42-53], como por ejemplo: cromatografía de gases, cromatografía líquida, teniendo ventajas en el bajo límite de detección (en el Apéndice 4 se presenta un resumen sobre estas técnicas), espectrometría de masas, entre otras; pero una de las desventajas de estas técnicas, es el demasiado consumo de tiempo en el análisis de las muestras y además, necesitan diversas técnicas de extracción y preparación de las muestras, las cuales se presentan en forma resumida en el Apéndice 5, [54-61]. Todo esto, hace que el análisis de una muestra sea muy tardado, aparte de que cierto grupo de pesticidas solo se pueden analizar en un determinado equipo o con un detector específico.

En cambio, la espectroscopia Raman es muy rápida en la obtención de espectros, los límites de detección están por el orden de 50 ppb [27], 8.5 pg [31], 10^6 M [62, 63] y 10 nM [64], puede analizar una gran cantidad de diversos grupos de muestras, como veremos en este trabajo. Además, por utilizar la luz como analizador, permite abrir nuevas posibilidades de la detección de contaminantes en sitio mediante la implementación de un equipo Raman portátil y con el acondicionamiento de fibras ópticas. Las fibras ópticas son aplicadas exitosamente en medicina [65].

En esta tesis se presenta un estudio para la detección de algunos contaminantes (pesticidas organofosforados) sobre algunas matrices específicas. Comenzando desde el análisis de las muestras estándares hasta su detección sobre una muestra real; se realiza el análisis cuantitativo desde compuestos puros hasta niveles de partes por millón (en el Apéndice 6 se presenta una revisión de las unidades de concentración más comunes).

Capítulo 2

Plaguicidas y Toxicidad

En este capítulo se hace una pequeña introducción y clasificación de los plaguicidas o pesticidas, además de los efectos que producen tanto en el ser humano como su impacto en el medio ambiente.

2.1 Introducción

Los plaguicidas o pesticidas se han venido utilizando desde épocas remotas. La primera generación incluye compuestos orgánicos extraídos de venenos producidos por algunas plantas; y compuestos inorgánicos provenientes de metales pesados como arsénico, plomo y mercurio. Años después, adquirieron importancia plaguicidas naturales que resultaban de extractos vegetales como nicotina, rotenona y piretro.

En 1939 la aparición del DDT produjo una revolución cultural en cuanto al control de plagas al volverse el plaguicida de mayor demanda mundial. En 1945 aparecen los plaguicidas de segunda generación, al desarrollarse estos productos a partir de sustancias orgánicas sintéticas con cloro en su fórmula, los organoclorados.

A mediados de la década del 70 en países desarrollados se empieza a restringir y prohibir el uso del DDT y otros organoclorados por su elevada persistencia en el medio ambiente. Aparecen los organofosforados y carbamatos.

Los organofosforados surgen como resultado de investigaciones sobre gases tóxicos que afecten el sistema nervioso para uso en época de guerra. En ese momento se consideraban como los sustitutos de los organoclorados por su menor persistencia. Sin embargo, algunos compuestos fosforados resultaron ser más tóxicos y perjudiciales para los seres vivos que los mismos clorados; es el caso del Paratión. De ahí que el uso y manejo de plaguicidas siempre haya generado controversias de todo tipo. Existe mucha información al respecto en Internet, aquí solo referimos a tres de importancia [66-68].

2.2 Clasificación de los plaguicidas

Los agroquímicos son productos sintéticos complejos utilizados en el sector Agropecuario, para combatir las plagas, a través de los **plaguicidas** y para mejorar la productividad de las cosechas y de los pastizales a través de **fertilizantes**.

Los plaguicidas son sustancias o ingredientes activos destinados a una multiplicidad de efectos dependiendo del tipo de plaga que combatan:

- **Herbicidas:** Sustancias que acaban con plantas que compiten con la especie privilegiada.
- **Fungicidas:** Compuestos que atacan los hongos.
- **Insecticidas:** Atacan insectos y parásitos. Pueden ser ovicidas (atacan huevos), ovolarvicidas (huevos y larvas), larvicidas (larvas) y adulticidas (atacan adultos).
- **Acaricidas:** Sustancias que atacan ácaros (arañitas).
- **Rodenticidas:** Combaten roedores.
- **Repelentes:** Productos que alejan plagas.
- **Atrayentes:** Productos que atraen plagas.
- **Reguladores:** Productos que modifican el funcionamiento normal de las plantas.

- Defoliantes: Afectan partes indeseables de una planta.
- Desinfectantes, etc.

La multiplicidad de los efectos que producen los plaguicidas permite diversas utilidades, a nivel fitosanitario; en cultivos, en centros urbanos y rurales para desinfección, desinsectación y desratización en infraestructuras públicas, privadas, y medios de transporte; para uso e higiene personal y para uso doméstico.

Los plaguicidas actúan como:

- esterilizantes inhabilitando las plagas para su reproducción,
- de contacto,
- sistémicos cuando se transportan por el sistema circulatorio de la planta o del animal. Afectan la plaga sin dañar al huésped,
- traslocables, son herbicidas que matan la planta cuando son absorbidos por raíces, tallos y hojas trasladados por medio de la planta,
- fumigantes matando las plagas al ser inhalados por ellas,
- selectivos resultan más tóxicos para unas especies vegetales y animales que para otras,
- no selectivos son tóxicos para la mayoría de especies,

Desde el punto de vista de la naturaleza química los plaguicidas pueden ser clasificados como:

- organoclorados,
- organofosforados,
- carbamatos,
- bupiridilos y
- piretroides.

Su formulación requiere de un ingrediente activo, que es la sustancia orgánica o inorgánica, natural, sintética o biológica que posee la acción plaguicida, cuyo efecto se regula o se potencia con la mezcla de otros componentes, tales como coadyuvantes o aditivos. Los coadyuvantes tienen la capacidad de modificar las propiedades físicas y químicas de los ingredientes activos y son: específicamente, tensoactivos, fluidificantes, estabilizantes, etc. Los aditivos no tienen esa capacidad de transformación, simplemente se

usan para cumplir prescripciones reglamentarias de los productos químicos como colorantes, repulsivos, eméticos, etc.

Los plaguicidas en la agricultura se utilizan antes de la siembra para disminuir las plagas existentes como parte de la preparación del terreno, Pre-siembra; otros se utilizan antes de que surjan las plagas, Pre-emergentes; y durante el proceso de desarrollo del cultivo, Post-emergentes. La aplicación se realiza por vía terrestre y aérea.

2.3 Los plaguicidas y la salud

Los plaguicidas pueden producir en los agricultores y consumidores intoxicaciones agudas y crónicas.

2.3.1 Clorados

a) Características generales

En este grupo se incluyen los insecticidas cuya estructura química corresponde, en general, a la de hidrocarburos clorados aromáticos, aunque alguno de ellos contienen otros elementos, como oxígeno y azufre.

Dentro del grupo de organoclorados puede distinguirse cinco subgrupos:

- DDT y compuestos análogos, tales como DDE, DDD, el dicofol, metoxicloro y clorobencilato.
- Cicloalcanos clorados, como los isómeros del hexaclorociclohexano, dentro de los cuales el más conocido es el lindano (isómero gamma).
- Ciclodienos clorados, aldrín, dieldrín, endrín, endosulfan, mirex, clordano.
- Indenos clorados, clordano, heptacloro.
- Terpenos clorados, conflecor o toxafeno.

Estos productos se presentan en forma de concentrados emulsionables, polvos humectables o polvos y gránulos, en concentraciones variables. A algunos de ellos se les agrega estabilizantes, tales como epiclohidrina y urea.

Los organoclorados son poco solubles en agua, estables a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, lo que los hace bastante persistentes en el medio ambiente. Como consecuencia de esto, muchos países permiten su uso exclusivamente en campañas de Salud Pública para combatir vectores de enfermedades de importancia epidemiológica, como por ejemplo, la malaria y el dengue. En los países donde se han utilizado estos compuestos, es frecuente encontrar residuos de ellos en alimentos (sobre todo en los de origen animal), precisamente por ser muy estables en el ambiente.

b) Vías de absorción

Los plaguicidas organoclorados pueden ingresar al organismo a través de los sistemas digestivo respiratorio, o por la piel intacta. En este último caso, el grado de penetración depende también del tipo de compuesto organoclorado que se trate. Por ejemplo el DDT es poco absorbido por la piel, mientras que los Drin – compuestos (aldrín, endrín, etc.) lo hacen con mayor rapidez y en mayor proporción. Por otro lado, cuando estas sustancias se encuentran disueltas en grasas animales o vegetales aumenta aún más su absorción.

c) Mecanismos de acción sobre el organismo

La principal acción tóxica de los organoclorados la ejercen sobre el sistema nervioso, interfiriendo con el flujo de cationes a través de las membranas de las células nerviosas, aumentando la irritabilidad de las neuronas.

d) Biotransformación y excreción

Los organoclorados son sustancias poco solubles en agua, cuando ocurre una exposición súbita, la sangre se satura rápidamente debido al proceso de filtrado que efectúa el glomérulo, para luego ser reabsorbidos por el túbulo renal (debido a su membrana liposoluble). Como consecuencia de esta saturación, los organoclorados se acumulan en los tejidos grasos, condicionando intoxicación crónica por liberación de los depósitos.

El metabolismo de los organoclorados se lleva a cabo lentamente en el hígado por acción de las enzimas microsomales, a través de mecanismos de oxidación (epoxidación) y conjugación, transformando a las moléculas liposolubles en hidrosolubles, que si pueden ser eliminadas por el riñón.

2.3.2 Fosforados y Carbamatos

a) Características generales

Fosforados

Los organofosforados son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una variedad de alcoholes, generalmente liposolubles. Poseen baja presión de vapor, con excepción de algunos pocos (por ejemplo, diclorvos). Esto los hace poco volátiles. La principal forma de degradación en el ambiente es la hidrólisis, especialmente bajo condiciones alcalinas, lo que tiene importancia en el proceso de destrucción del plaguicida.

Carbamatos

El grupo químico de los carbamatos corresponde a ésteres derivados de los ácidos N-metil ó dimetil carbámico y comprende más de 25 compuestos que se emplean como insecticidas y algunos como fungicidas, herbicidas o nematicidas.

b) Toxicocinética y Toxicodinámica

Vías de absorción, procesos de biotransformación y de eliminación

Los organofosforados ingresan por la vía cutánea, respiratoria o digestiva. La primera constituye la ruta común de penetración, así como la forma más frecuente de intoxicaciones laborales.

Las propiedades liposolubles de estas sustancias y el tipo de disolvente que se emplea con el ingrediente activo, es decir, la parte biológicamente activa del plaguicida, unidos a las frecuentes erupciones o lesiones cutáneas que suele presentar el individuo que las manipula, facilitan su penetración por esa vía.

Por inhalación se absorben cuando se trabaja durante su formulación, mezcla, aplicación o almacenamiento, o cuando se presentan incendios o derrames.

La eliminación de los organofosforados es rápida y tiene lugar por la orina y, en menor cantidad, por heces y aire expirado; su máxima excreción se alcanza a los dos días, luego disminuye rápidamente.

Al igual que los organofosforados, los carbamatos ingresan al organismo por vía cutánea, respiratoria o digestiva. No se acumulan en el organismo; su biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se hace principalmente por vía urinaria.

c) Mecanismos de acción sobre el organismo

Aunque los organofosforados y los carbamatos poseen grupos químicos diferentes, el mecanismo a través del cual producen toxicidad es idéntico y se asocia con la inhibición de la acetil colinesterasa (ACE), la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC). Con la acumulación de la AC se altera el funcionamiento normal de las fibras nerviosas.

Los organofosforados son inhibidores irreversibles de la ACE a diferencia de los carbamatos que se consideran inhibidores reversibles, ya que en poco tiempo dejan la enzima libre.

2.3.3 Piretrinas y Piretroides

a) Descripción general

Las piretrinas son insecticidas de origen natural obtenidos de la flor del crisantemo, y han sido utilizados por el hombre desde hace muchos años. Son bastante inestables a la exposición a la luz y al calor, lo cual les resta utilidad para su aplicación en la agricultura. Son poco solubles en agua y se hidrolizan rápidamente por alcalinización.

Los piretroides son insecticidas sintéticos, con una estructura química similar a la de las piretrinas, modificada para mejorar su estabilidad en el ambiente. Se disuelven mejor en el agua y, al igual que las piretrinas, son hidrolizados por los álcalis.

b) Toxicocinética y Toxicodinámica

Vías de absorción

Las piretrinas y los piretroides se absorben relativamente bien por los tractos gastrointestinales y respiratorio. Su absorción a través de la piel intacta es relativamente baja.

c) Mecanismos de acción sobre el organismo

Son neurotóxicos que actúan sobre los ganglios basales del sistema nervioso central, por medio de la prolongación de la permeabilidad al sodio durante la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas, lo que produce descargas repetidas. En ambos casos, el cuadro clínico es similar. Ni las piretrinas ni los piretroides inhiben las colinesterasas.

d) Biotransformación y excreción

Ambos grupos de compuestos son biotransformados con gran rapidez por la esterasas y oxidasas microsomales hepáticas y son eliminados en su mayor parte por los riñones. Esta rápida metabolización, junto con la pobre absorción, explican la relativamente baja toxicidad de las piretrinas y piretroides para los humanos.

2.3.4 Bipiridilos

a) Descripción general

Los bipiridilos son herbicidas sólidos, insípidos e inodoros y muy solubles en agua. Dentro de este grupo se consideran al paraquat y diquat. En su forma líquida, el paraquat se utiliza como herbicida de contacto para destruir las partes verdes de las plantas en presencia de luz solar. El uso más frecuente del diquat es como herbicida acuático.

Las soluciones concentradas de paraquat corroen algunos metales y se inactiva rápidamente en contacto con los minerales arcillosos del suelo.

b) Toxicocinética y Toxicodinámica

Vías de absorción

Desde el punto de vista toxicológico, la ruta de absorción más importante es la digestiva, pues que es la más frecuentemente involucrada en casos de intoxicación (accidental o suicida). La absorción, por la piel intacta y la vía respiratoria, es poca. Sin embargo, dada su corrosividad el paraquat puede ulcerar tanto la piel como la mucosa respiratoria, pudiéndose incrementar su absorción por estas rutas. Igual sucede si la piel presenta abrasiones o heridas. Se han informado de casos fatales de intoxicación sistémica como resultado de contaminación de heridas con esta sustancia.

c) Mecanismos de acción sobre el organismo

El daño causado por el paraquat se debe principalmente a la peroxidación lipídica de la membrana.

La molécula de paraquat tiene mucho parecido con un receptor de membrana a nivel alveolar; por dicha razón, se considera que ocupa ese receptor y de allí su especificidad por este tipo de tejido, pero en general, tiene predilección por tejidos con mayor saturación de oxígeno como el pulmón, hígado y riñón.

Las lesiones más graves son las pulmonares, ya que dejan como secuela la fibrosis pulmonar; generalmente los daños hepáticos y renales son reversibles.

El mecanismo de acción del diquat parece ser similar, excepto en sus efectos sobre los pulmones, que son menos severos.

d) Biotransformación y excreción

Tanto el paraquat como el diquat son poco metabolizados. La carga de las moléculas, junto a su estructura electrónica conjugada, les da la propiedad de producir radicales libres que también son solubles en agua. Estos radicales libres reaccionan ávidamente con el oxígeno, formando radicales iónicos de superóxido y peróxido de hidrógeno que regeneran el bipyridilo.

En otras palabras podremos decir que tanto el paraquat como el diquat son poco biotransformados y se excretan como tales en la orina y las heces (si fueron ingeridos).

2.4 Los Plaguicidas y el Ambiente (Efectos sobre el ambiente)

Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna. Al aparecer resistencia en la especie a combatir se requiere el incremento de las cantidades necesarias de pesticida o la sustitución por agentes más tóxicos para lograr controles efectivos. Los organoclorados son un ejemplo de persistencia ambiental pues permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de aplicados. Esa permanencia favorece la incorporación a las cadenas tróficas, la acumulación en los tejidos grasos humanos y animales y la biomagnificación. La contaminación de los cursos de agua se produce en forma directa por la aplicación de pesticidas en las aguas (arrozales), por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos. Es igualmente importante la contribución indirecta producida por lixiviación (infiltración) de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, el aumento de la intoxicación humana, la pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos). Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para el ambiente como por ejemplo los polinizadores. Además de destruir recursos genéticos y farmacológicos conocidos y otros aún no develados, el empobrecimiento de la biodiversidad puede conducir a la proliferación de las especies antagónicas de aquellas extinguidas, provocando nuevos desequilibrios ecológicos y nuevas

plagas. Los factores mencionados forman un ciclo cerrado que se retroalimenta y refuerza profundizando los efectos adversos.

La persistencia (resistencia química a la degradación) de los pesticidas favorece la contaminación de las aguas, la incorporación a suelos, pasturas, vegetales y animales comestibles, los que al ser consumidos actúan como transportadores de los pesticidas facilitando su acumulación en los organismos vivos. Asimismo, mediante los residuos y desechos producidos, los plaguicidas o sus metabolitos vuelven al agua, al suelo, a la flora y fauna, provocando el reforzamiento del ciclo [37-41].

Capítulo 3

Equipos y Técnicas de Análisis

En este capítulo se mencionan los equipos que existen en el Laboratorio de Espectroscopia Raman del Centro de Investigaciones en Optica, A.C., CIO, Unidad – Aguascalientes. Las cuales fueron usadas para el desarrollo de la presente tesis doctoral. Además, se presentan las técnicas de análisis, las cuales fueron desarrolladas e implementadas en el laboratorio antes mencionado para el análisis de las muestras en estudio, es decir, se diseñó un dispositivo, el cual puede ser adaptado al microscopio para el análisis de muestras líquidas contenidas en viales. Además, se utilizó el papel aluminio, el cual demostró ser un excelente substrato, con diversos tipos de muestras. Este substrato fue utilizado en el sistema Raman que tiene como fuente de excitación un láser que trabaja en el cercano infrarrojo.

3.1 Sistema VIS-Raman

Este sistema Raman utiliza, como fuente de excitación, un láser de HeNe (632.8 nm) o también, se puede acondicionar un láser de Argón (514.5 nm). Este sistema fue ensamblado en el laboratorio.

A continuación se hace referencia de las partes y equipos que conforman el sistema Raman convencional:

- Láser de HeNe, Melles Griot, 632.8 nm, 17 mW de potencia. Además, contamos con otro tipo de láser como fuente de excitación. El láser de Ar-ion, Spectra-Physics Modelo Stabilite 2017, 514.5 nm, 5 W de potencia máxima y el sistema de refrigeración es con agua.
- Ópticas como lente convergente, objetivo de microscopio (5X) y espejos de primera superficie, y además, soportes para el arreglo experimental.
- Filtro de interferencia, Edmund Scientific, tolerancia FWHM ± 2 nm, para ambas longitudes de onda.
- Filtros notch: filtro holográfico Super Notch – PlusTM para 632.8 nm y filtro Notch – PlusTM (Kaiser Optical Systems, INC) para 514.5 nm.
- Monocromador, Jobin-Yvon modelo HR 460, resolución espectral 0.05 nm para 546 nm. Rejilla de difracción de 1200 y 1800 líneas/mm.
- El detector es una cámara CCD de 256-1024 pixeles, enfriado con aire, modelo CCD-3000 Spectrum One.
- Tarjeta de interface GPIB-IEEE 488 de la National Instruments.

- Software spectramax (Galactic) para el control del sistema Raman y
- Microscopio Axioskop 2.

En la Figura 7 se muestra el esquema del arreglo experimental que se viene utilizando en el laboratorio; para el análisis de las muestras se utiliza la configuración de 180° (backscattering).

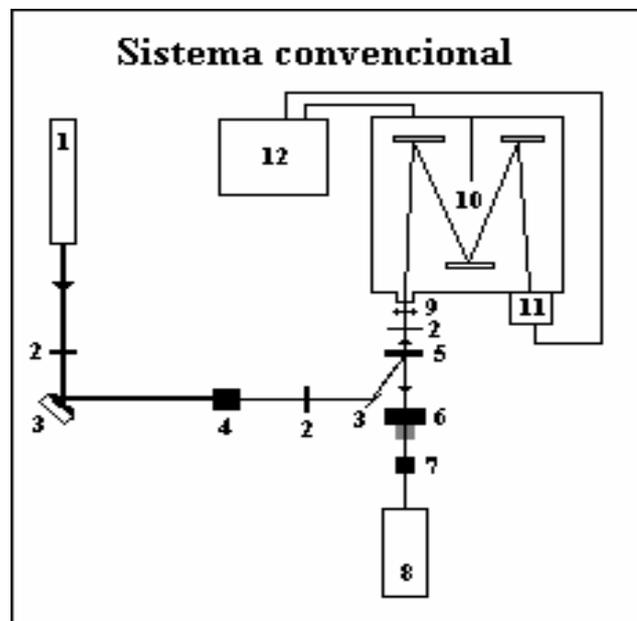


Figura 7: Sistema Raman convencional. (1) láser de He-Ne-632.8nm, (2) diafragmas, (3) espejos, (4) filtro de interferencia, (5) filtro notch con ángulo de 9° , (6) objetivo de microscopio-5X, (7) muestra con opción-6, (8) microscopio y muestra, (9) lente plano-convexo $f=100\text{mm}$, (10) monocromador, (11) CCD y (12) fuente de la CCD.

3.2 Sistema NIR-Raman

Es un sistema comercial (Renishaw) modelo 1000B, Figura 8, tiene como fuente de excitación un diodo láser que emite en la región del cercano infrarrojo, 830 nm y con una potencia máxima de 300 mW. Tiene un filtro notch, el cual es usado como un beam splitter para guiar el haz láser hacia el microscopio ensamblado y también para eliminar la luz Rayleigh en el camino de regreso. El monocromador tiene una rejilla de difracción de 600 líneas/mm que proporciona una resolución de 4 cm^{-1} . El detector es una cámara CCD, RemCam, enfriado termoeléctricamente a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Este sistema tiene acoplado un microscopio Leica, DMLM, y utiliza el software GRAMS/32 para el control de todas las funciones del sistema Raman.

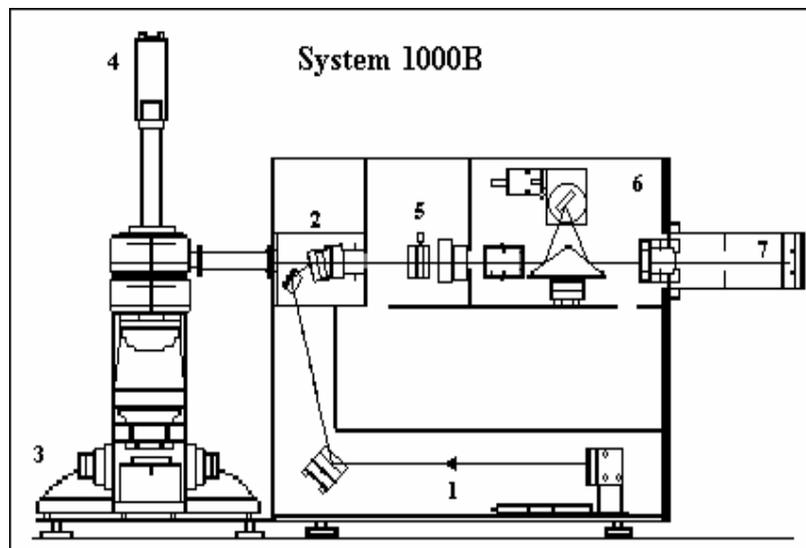


Figura 8: Sistema 1000B. (1) haz laser-830nm, (2) filtro notch, (3) microscopio y muestra, (4) cámara de vídeo, (5) rendija, (6) monocromador y (7) cámara CCD.

3.3 Técnica de análisis usando el sistema i-45

Este sistema fue implementado en el laboratorio, el cual puede ser adaptado en el sistema NIR-Raman y así, se logra analizar muestras líquidas, las cuales pueden estar contenidas en viales. Con la ayuda de este dispositivo se puede analizar diversas muestras líquidas o sólidas con alto grado de toxicidad para el ser humano. Este dispositivo, Figura 9, consiste de un espejo inclinado a 45° , el cual desvía en 90° el haz láser que sale del microscopio, sin objetivo; luego mediante una lente plano-convexo de 50 mm de distancia focal, el haz es direccionado y enfocado dentro del vial de vidrio, en el cual se encuentra la muestra. Además, esta lente sirve para colectar la luz esparcida desde la muestra.

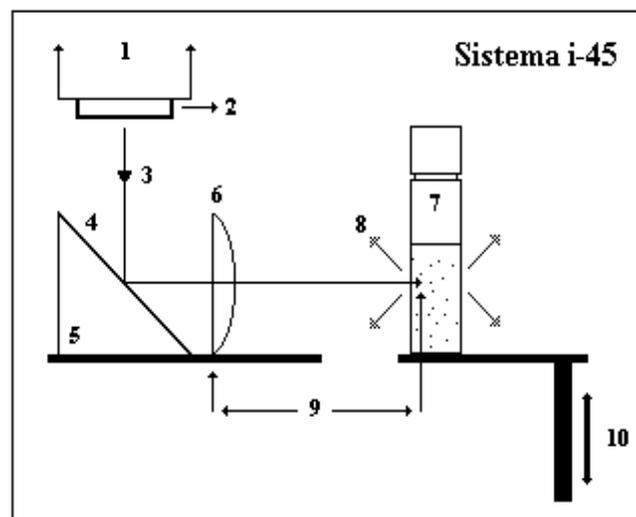


Figura 9: Sistema i-45. (1) microscopio del sistema NIR-Raman, (2) nosepiece (3) haz láser-830 nm, (4) espejo, (5) base del espejo, (6) lente plano-convexo, (7) vial de vidrio y muestra, (8) haz Raman, (9) distancia focal y (10) base con movimiento-z.

3.4 Técnica de análisis usando el sustrato de Aluminio

En este trabajo se utilizó preferentemente un sustrato, el cual está conformado de un papel aluminio alisado sobre un portaobjeto de vidrio, Figura 10. Este aluminio es fácil de adquirir, el cual después de ser utilizado puede ser desechado, evitando cualquier contaminación con la siguiente muestra. Como veremos después, este sustrato presenta varias ventajas con respecto a otros sustratos.

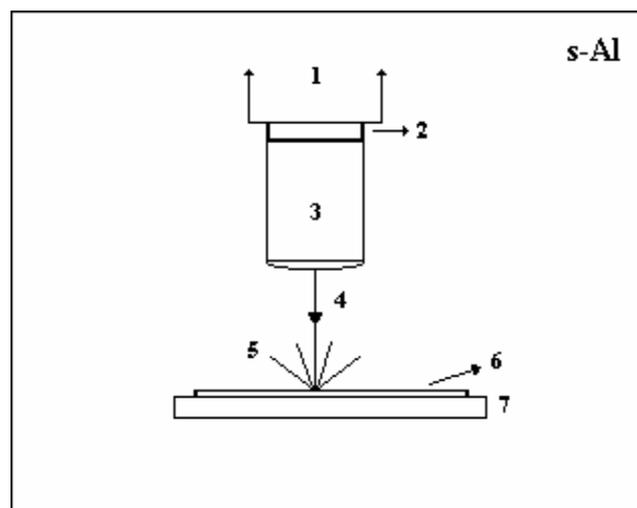


Figura 10: Utilización del sustrato de aluminio. (1) sistema NIR-Raman, (2) nosepiece del microscopio, (3) objetivo (50X), (4) haz láser 830 nm, (5) esparcimiento Raman, (6) sustrato de aluminio y muestra y (7) portaobjeto.

3.5 Procedimiento analítico

Los sistemas Raman fueron calibrados en frecuencia al pico 520 cm^{-1} del espectro Raman del silicio en cada experimento. Para el análisis cuantitativo en el sistema NIR-Raman se tuvo en cuenta un procedimiento en la colocación de las muestras y en la evaluación de los espectros Raman, es decir, se consideraron los siguientes pasos:

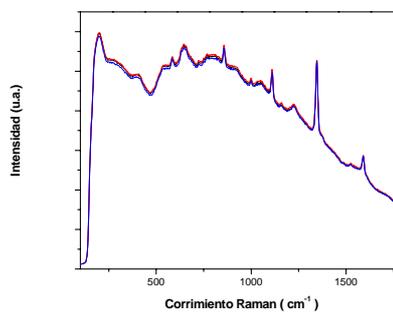
- Para el análisis de las muestras se consideraron dos arreglos experimentales: en viales mediante el sistema i-45 y en substratos mediante el substrato de aluminio. En este último, las cantidades de muestra fueron del orden de los microlitros, en el cual, el solvente se evaporó a temperatura ambiente; luego los analitos del pesticida fueron focalizados con el microscopio y analizados en el sistema NIR-Raman.
- Los espectros Raman fueron grabados 3 o 5 veces, para todas las muestras que se encontraron en los viales. En el substrato, las muestras formaron microgotitas del compuesto en estudio de tamaños grandes y pequeños, se eligieron 5 microgotitas, las más representativas (los tamaños más grandes y uniformes) para ser grabados sus espectros Raman. Para cada condición experimental (vial o substrato) y en cada concentración los espectros Raman fueron promediados.
- Se eligieron algunos picos característicos del compuesto en estudio, entre ellos el pico más intenso.
- La línea base de los picos elegidos fue corregida, es decir, se trazó una recta eligiendo dos puntos en las bases de cada pico; luego, esta recta se substraía en intensidades con

los picos del espectro inicial, obteniéndose un espectro o banda linealizada. Las intensidades de estos picos linealizados son consideradas para el estudio.

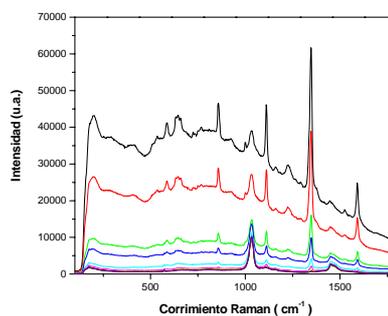
- En el rango de concentraciones de interés, las intensidades linealizadas de los picos en estudio son normalizadas. Para los espectros obtenidos en viales, las intensidades son divididas con respecto al pico más intenso del compuesto puro y para los espectros obtenidos en los substratos, son divididas con respecto al pico más intenso correspondiente a la concentración más alta considerada, y finalmente multiplicado por 100.
- Por último se obtienen las gráficas de las intensidades normalizadas con respecto a la concentración o tamaño de las microgotitas.

Como se puede apreciar líneas arriba, se han considerado dos dispositivos experimentales diferentes y un solo procedimiento de análisis para los espectros, con los cuales se obtuvieron los comportamientos de las intensidades Raman en diferentes concentraciones, siendo sus resultados muy buenos y a la vez predecibles, como veremos posteriormente. Un ejemplo del tratamiento de los espectros Raman se muestra en la Figura 11, en el cual se analiza el pico más intenso del pesticida paratión metílico (1345 cm^{-1}) en diferentes concentraciones.

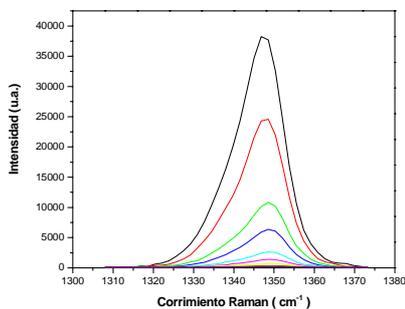
Registro de 3 o 5 espectros Raman por condición experimental, los cuales serán promediados.



Espectros promediados en diferentes concentraciones.



Linealización de un pico del compuesto en estudio, los cuales serán normalizados.



Gráfica de las intensidades linealizadas y normalizadas versus la concentración.

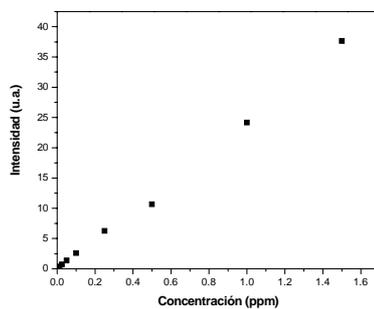


Figura 11: Procedimiento para el análisis de los espectros Raman.

Capítulo 4

Resultados y Análisis

En este capítulo se reúne todo el trabajo de tesis que se ha realizado en el laboratorio de espectroscopia Raman. Se hicieron mediciones de varias muestras, cualitativas y cuantitativas. En el análisis cualitativo se presenta la comparación de los dos sistemas Raman con muestras orgánicas, se compara el substrato de aluminio con otros tipos de substratos y se hace una simulación de un método para la detección de pesticidas. En el análisis cuantitativo se proporciona y se evalúa una expresión matemática alternativa para la medición de concentraciones. Además, en trabajos de laboratorio, se realizó la aplicación de la técnica Raman para el análisis de muestras agrícolas, como ejemplo se utilizó el chile *ancho*, el cual es una de las variedades de chile que más se cultiva en el Estado de Aguascalientes.

4.1 Análisis Cualitativo

En esta sección se presentan los resultados de diferentes casos de estudio, los cuales forman parte del desarrollo de esta tesis.

a) Comparación de espectros Raman entre el sistema VIS- y NIR-Raman

Uno de los problemas observados en el sistema VIS-Raman fue la señal de fluorescencia, la cual se manifestó en las muestras orgánicas que se estudiaron en este trabajo. En la Figura 12, como un ejemplo de este problema, se presentan los espectros Raman de dos pesticidas obtenidos en el sistema VIS-Raman (632.8 nm), y a modo de comparación, en la Figura 13 se incluyen los espectros Raman de estos mismos compuestos obtenidos con el sistema NIR-Raman (830 nm).

Las sustancias orgánicas, en este caso los pesticidas, presentan espectros Raman con un significativo fondo de fluorescencia cuando se utilizan fuentes de excitación en el visible. Esto ocasiona que los espectros Raman se vean disminuidos en intensidad y en muchos casos no se aprecien en lo absoluto. Como se puede observar en la Figura 12, los espectros Raman del paratión metílico y del malatión son poco intensos, ocasionando que los picos menos intensos de los compuestos no sean apreciables, en comparación a los espectros Raman de la Figura 13 que si se aprecian, los cuales fueron obtenidos con un láser que emite en el cercano infrarrojo (sistema NIR-Raman) [69].

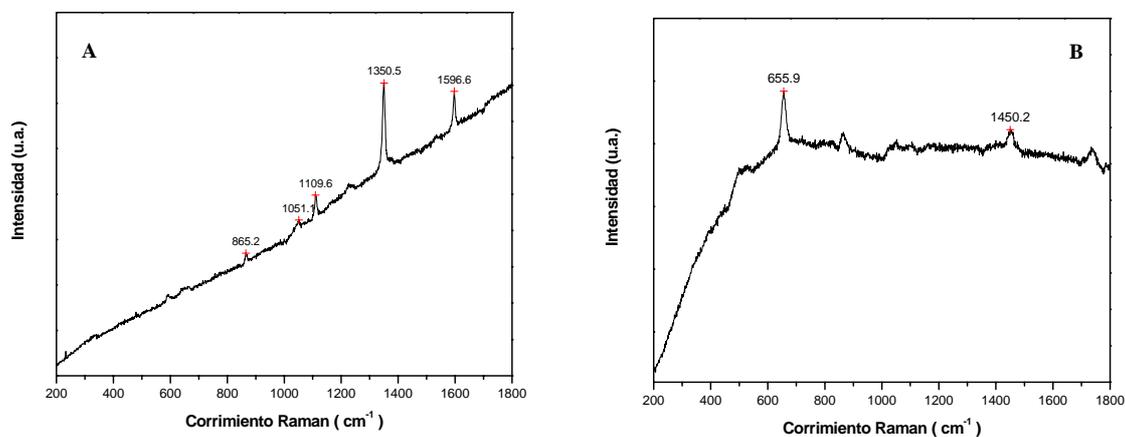


Figura 12: Espectros Raman del paratión metílico (A) y malatión (B) obtenidos en el sistema VIS-Raman (láser de HeNe, 632.8 nm).

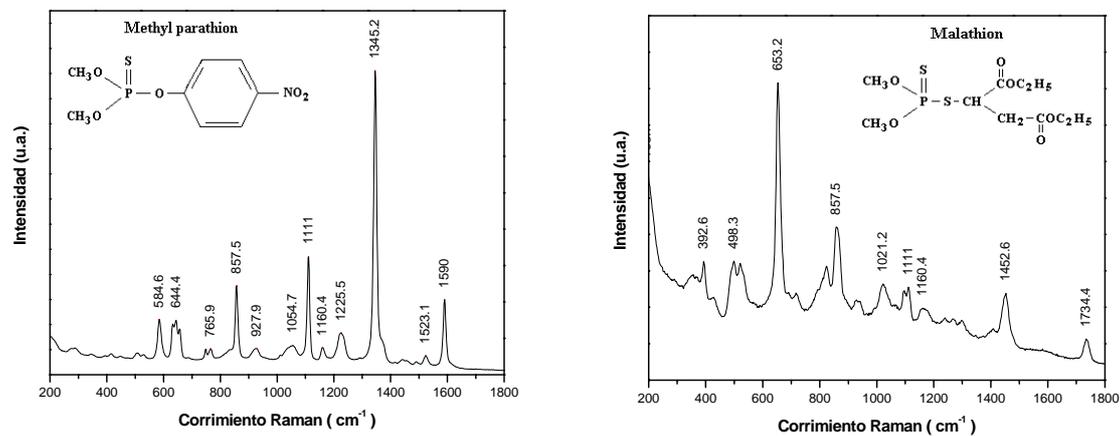


Figura 13: Espectros Raman del paratión metílico y del malatión obtenidos en el sistema NIR-Raman (diodo láser, 830 nm).

Las moléculas con enlaces P=S muestran una banda intensa en la región de 600–700 cm^{-1} [2]. Esta banda es claramente distinguible para compuestos sin anillos bencénicos, por ejemplo, en el compuesto del malatión se da en la banda 654 cm^{-1} . En cambio para moléculas que poseen estos anillos, la vibración de estrechamiento P=S es traslapada por las vibraciones del anillo, como en el caso del compuesto paratión metílico. Además, el paratión metílico tiene el grupo NO_2 la cual presenta una banda muy intensa en 1345 cm^{-1} , estos comentarios se pueden observar en la Figura 13. El espectro Raman del pesticida paratión metílico ha sido previamente reportado utilizando la técnica SERS [32], el cual es semejante con el obtenido en este trabajo.

b) Análisis de muestras estándares

Las muestras estándares juegan un papel importante en la identificación de los compuestos en estudio y además, como veremos posteriormente, también son importantes en la medición de las cantidades de dichos compuestos en ciertas matrices. Uno de los objetivos en este trabajo fue el de registrar la mayor cantidad disponible de muestras estándares, es decir, crear una minibiblioteca de espectros Raman de compuestos considerados contaminantes, y complementarlo con los espectros Raman que se pueden encontrar en ciertas paginas de educación en Internet [70-74].

Las muestras orgánicas de interés para nuestro estudio fueron los pesticidas. Estos se clasifican, desde el punto de vista químico, en: organofosforados, organoclorados, carbamatos, bupiridilos y piretroides. Algunas de estas clases de pesticidas fueron

compradas, en el caso de los organofosforados y los bupiridilos, otras fueron prestadas por el Laboratorio de Estudios Ambientales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, como son los organoclorados. Además se consiguieron otros tipos de muestras, las cuales también son consideradas como contaminantes, estos son los hidrocarburos polinucleares aromáticos.

A continuación presentamos los tipos de compuestos que fueron analizados en el sistema NIR-Raman. Los espectros Raman de estos compuestos son mostrados en el Apéndice 7.

- Pesticidas organofosforados: paratión metílico 98.1%, malatión 96.4%, azinfos metílico 99%, fentión 100%, dursban 100%, monitor 100%, certificados por AccuStandard (New Haven-USA). Los cuales fueron suspendidos en metanol de grado cromatográfico, en una concentración de 1000 ppm.
- Pesticidas organoclorados: metoxicloro 99%, DDT 99.7%, DDD 98.5%, DDE 99.5%, lindano 99%, BHC 99.3%, aldrin 98%, dieldrin 98% heptacloro 99.5%, certificados por Chem Service (West Chester-USA).
- Pesticidas bupiridilos: diquat 99%, paraquat 98%, certificados por AccuStandard (New Haven-USA). Los cuales fueron suspendidos en metanol de grado cromatográfico, en una concentración de 1000 ppm.
- Hidrocarburos polinucleares aromáticos: acenafteno, antraceno, fluoreno, fluoranteno, naftaleno, fenantreno, pireno, versión sólida (neto), certificado por Supelco (Bellefonte-USA).

Además en este trabajo se consideraron muestras de uso comercial, las cuales tienen un cierto porcentaje (ingrediente activo) de las muestras estándares. Estas muestras fueron de gran utilidad, ya que, son estos tipos de muestras las que más cantidad se puede conseguir. Uno de los pesticidas más utilizados en este trabajo fue el folidol (62.6% de paratión metílico); otras, que también fueron analizadas son: malatión-1000 (88.7% de malatión), gusatión (20.2% de azinfos metílico), prozicar (50% de carbendazim), benlate (50% de benomilo), ficam (76% de bendiocarb), y otros compuestos. Los espectros Raman y los nombres de los compuestos considerados en esta tesis son presentados en el Apéndice 7.

c) Aplicación del papel Aluminio como sustrato en micro-Raman

Se analizaron diferentes materiales en el sistema NIR-Raman para ser usados como sustratos, los cuales fueron analizados sin y con muestras sólidas o líquidas, siendo estas últimas, las que marcaron la utilidad de un sustrato. En estos casos, se observó que, en concentraciones del orden de 10 ppm los espectros Raman de las muestras líquidas presentan señales de ruido debido al sustrato utilizado. En este trabajo se presenta el análisis de los sustratos en el sistema NIR-Raman, los cuales fueron analizados sin muestra, y también algunos de estos y otros más fueron analizados con muestras en ciertas concentraciones, algunos de estos resultados se presentan en la Figura 14.

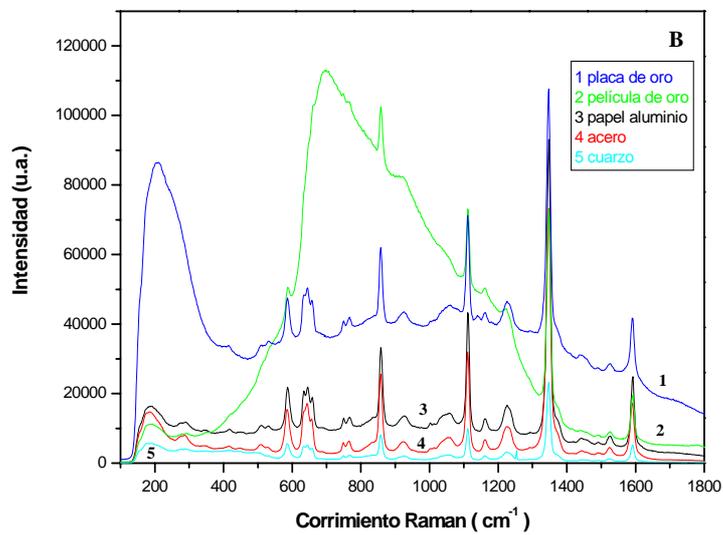
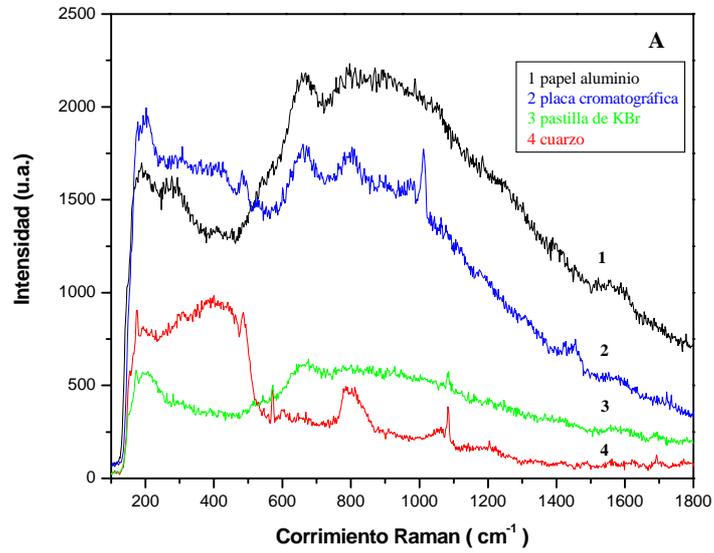


Figura 14: Análisis de diferentes sustratos en el sistema NIR-Raman. a) sin muestra y b) con muestra (1700 ppm de paratión metílico).

Después de haber realizado varias mediciones de muestras líquidas con los diferentes sustratos y en diferentes concentraciones, se llegó a determinar que el sustrato de aluminio presentó más ventajas que los otros, es decir, este sustrato fue más fácil de adquirir (por ser de bajo costo), de implementar (por ser moldeable), se puede desechar (evitando contaminación de las muestras) y además, la característica más importante es que introduce menos ruido que los otros sustratos. Es por estas características que en este trabajo de tesis se prefirió utilizar el sustrato de aluminio para los análisis y mediciones de los contaminantes. Como información adicional, se sabe que los sustratos de la técnica SERS necesitan un tratamiento previo [6, 33, 75, 76].

d) Simulación de extracción y contaminación con pesticidas

Como un primer paso en el desarrollo de una técnica para la detección de pesticidas en muestras agrícolas; se inició con la realización de una simulación y de una verificación, es decir, observar si el sistema NIR-Raman puede determinar ciertos pesticidas en una matriz de β -caroteno [69], éste es el constituyente principal en las frutas y verduras. Para lo cual, se realizó una extracción del β -caroteno de la cáscara de tomate con metanol.

La cáscara de tomate previamente secada a temperatura ambiente, se colocó en un vial en contacto con metanol. Se observó que el solvente adquiere la coloración rojiza del tomate; luego se separaron las dos fases, desechándose el material sólido y colocando la fase líquida en otro vial. Por un lado, se tomó 0.5 ml del extracto para su análisis, el cual

nos sirvió como referencia. Otra porción del extracto (0.5 ml) se contaminó con 0.5 ml de la solución de malatión y 0.2 ml de la solución de paratión metílico, ambos a una concentración de 1000 ppm. Después de agitar brevemente las muestras, una pequeña porción de cada una de ellas se colocó en el sustrato de aluminio para su análisis en el sistema NIR-Raman. Los espectros se obtuvieron una vez que el metanol se evaporó a temperatura ambiente.

Un ejemplo de aplicación de la técnica Raman, es el análisis de muestras vegetales, animales o inclusive tejido adiposo de ser humano, expuestas al contacto con pesticidas, tal como fue descrita líneas arriba. El β -caroteno es un elemento constitutivo en toda sustancia orgánica y es uno de los responsables de las coloraciones en las frutas, verduras y hortalizas; además de ser el precursor de la vitamina A. En la Figura 15A se observa el espectro Raman característico del β -caroteno [77] obtenida al analizar una gota del extracto no contaminado sobre el sustrato de aluminio. En la Figura 15B se observa el espectro Raman de los pesticidas en la matriz del extracto de cáscara de tomate. En este espectro se observan los picos más intensos y característicos del paratión metílico (857, 1347 y 1590 cm^{-1}) y del malatión (655 cm^{-1}) conjuntamente con el espectro Raman del β -caroteno (1158 y 1523 cm^{-1}). Las mediciones se realizaron en las mismas condiciones experimentales. No se usó ninguna técnica adicional para concentrar en un volumen reducido a los pesticidas.

Como se puede apreciar en la Figura 15B los picos característicos del β -caroteno son más intensos que de los contaminantes, lo cual ocasiona que estos últimos no se aprecien muy bien. Se puede realizar una sustracción de espectros para disminuir y en algunos casos hasta eliminar el espectro que no es de interés. La Figura 16 muestra el

espectro Raman resultante de la Figura 15B, después de la sustracción del espectro del β -caroteno y una corrección de la línea base. En este espectro se puede apreciar con mayor definición los picos más intensos y característicos de los dos pesticidas considerados en este ejemplo, con lo cual se logra demostrar la versatilidad del equipo NIR-Raman.

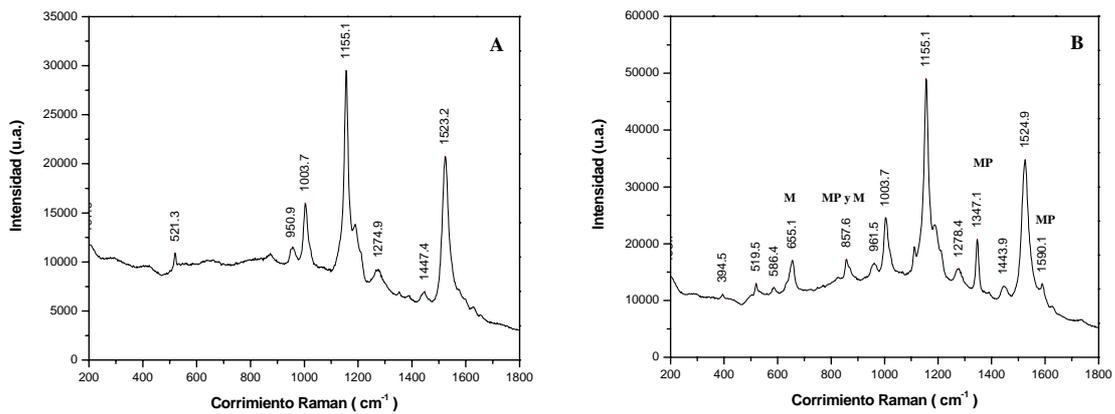


Figura 15: a) Espectro Raman del β -caroteno y b) espectro Raman de una mezcla de extracto de β -caroteno con malatión y paratión metílico.

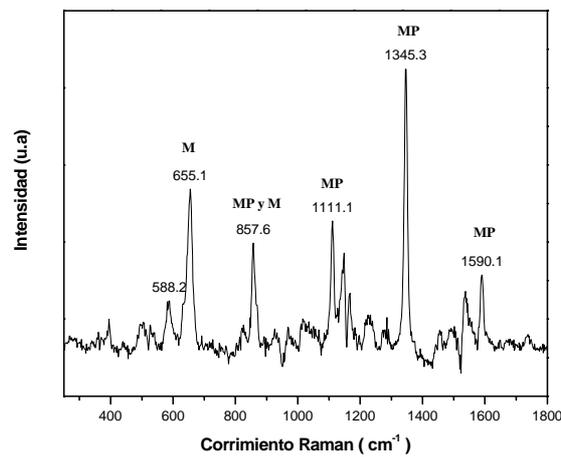


Figura 16: Espectro Raman resultante de la Fig. 15B después de una sustracción de espectros y corrección de la línea base.

4.2 Análisis Cuantitativo en viales

Otra parte del trabajo, aparte de la detección, consistió en encontrar y utilizar una expresión matemática simple que nos ayude a relacionar las intensidades de los picos Raman con la concentración de la muestra, en este caso, se hace la descripción para muestras líquidas contenidas en viales de vidrio y transparentes. Se pueden encontrar muchos trabajos referentes al análisis cuantitativo en muestras líquidas, sólidas o sobre substratos [62-64, 78-91] y ninguna de ellas es igual al análisis planteado aquí [92].

La intensidad de los picos Raman depende de una expresión compleja que involucra el tensor de polarisabilidad de la molécula, ecuación (1.14), [11]. Un planteamiento menos riguroso puede ser usado, el cual es análogo a la Ley de Lambert-Beer [93], es decir, se tiene una expresión en el cual, la intensidad de un pico Raman es proporcional a la concentración de la muestra, de la forma:

$$I_{Raman} = KVC I_0 \quad (4.1)$$

donde I_0 es la intensidad de la radiación de excitación, V es el volumen de la muestra iluminada por la fuente y observado por el espectrómetro, C es la concentración de la muestra y K es la constante para cada banda.

En este trabajo se ha utilizado una expresión similar, la cual es más simple para determinar los valores de sus coeficientes desde algunos datos experimentales. Se consideró que la intensidad normalizada de un pico Raman puede ser expresada como:

$$I_N^v = \frac{S}{n_v} C ; \quad (4.2)$$

donde s es un coeficiente de proporcionalidad, C es la concentración de la muestra, ν es el corrimiento Raman y n_ν es la proporción entre el pico más intenso y los otros (incluido el primero) en el espectro Raman del compuesto puro (o estándar).

La normalización se obtiene después de linealizar (procedimiento 3.5 del capítulo 3), es decir, se divide el espectro de la muestra por el pico más intenso en el espectro del compuesto puro y se multiplica por 100.

$$I_N^v = \frac{I_m^v}{I_{std}^{max}} * 100, \quad (4.3)$$

considerando esta relación en la ecuación (4.2), se obtiene una expresión para la intensidad Raman de la muestra, con la cual, ***“los espectros Raman en diferentes concentraciones pueden ser predichos desde el compuesto puro”***.

$$I_m^v = \frac{I_{std}^{max}}{100} * \frac{s}{n_\nu} C; \quad (4.4)$$

n_ν es una proporción de intensidades en el espectro Raman de un determinado compuesto puro y sus valores se determinan mediante la siguiente relación:

$$n_\nu = \frac{I_{std}^{max}(\text{pico más intenso})}{I_{std}^v(\text{picos del espectro})}. \quad (4.5)$$

Los valores que se obtienen con la relación (4.5) son usados para cambiar el valor del coeficiente de proporcionalidad “ s ” en cada uno de los picos, prediciendo las curvas (líneas) para los picos menos intensos, como veremos más adelante.

El valor de “ s ”, para el pico más intenso, es determinado por un análisis simple. Se utiliza la ecuación de la pendiente de una recta entre dos puntos de interés, es decir, se utiliza la siguiente relación:

$$s = \frac{I_{N2} - I_{N1}}{C_2 - C_1}, \quad (4.6)$$

al considerar las intensidades normalizadas en la expresión anterior se obtiene:

$$s = \frac{1}{C_2 - C_1} * \frac{I_{std,C_2}^{max} - I_{std,C_1}^{max}}{I_{std}^{max}} * 100, \quad (4.7)$$

donde I_{std,C_2}^{max} y I_{std,C_1}^{max} es el pico Raman más intenso en dos diferentes concentraciones (en el rango de interés) del compuesto puro.

Además, despejando la ecuación (4.4) se obtiene la siguiente expresión para la concentración:

$$C = \frac{n_v}{s} \left[\frac{I_m^v}{I_{std}^v} * 100 \right]. \quad (4.8)$$

Por superposición de la ecuación (4.4) se puede obtener una expresión que depende de las concentraciones y así generar el espectro de mezclas desde los compuestos puros. Para esto, se considera que cada punto de los datos en el espectro de la mezcla presenta una intensidad dada por la suma de los puntos equivalentes en los espectros de los compuestos, los cuales están escalados de acuerdo a sus respectivas concentraciones [78].

$$I_R^{mix} = I_R^A + I_R^B + \dots$$

$$I_R^{mix} = \frac{I_{std,A}^{max}}{100} * \frac{S_A}{n_{vA}} C_A + \frac{I_{std,B}^{max}}{100} * \frac{S_B}{n_{vB}} C_B + \dots; \quad (4.9)$$

donde C_A y C_B son las concentraciones de los compuestos A y B en la mezcla. Todas estas ecuaciones y análisis matemático fueron evaluados usando el programa Excel.

Para el análisis de la ecuación (4.2) se hicieron varios ejemplos con diferentes compuestos, los cuales son presentados a continuación.

Como primer ejemplo se utilizó el alcohol etílico, cuyo espectro Raman se puede observar en el Apéndice 7. Se eligieron para el análisis los picos 882, 1052 y 1274 cm^{-1} y sus intensidades 15240.3, 4130.2 y 1693.4 u.a., respectivamente, en el espectro Raman del estándar. A fin de encontrar los coeficientes para ser introducidos en la ecuación (4.2) se midió, para el pico 882 cm^{-1} , las intensidades Raman del etanol puro (15240.3 u.a.) y dos disoluciones del etanol (15240.3 y 258.1 u.a.) en las concentraciones de 99.9 y 1 % (v/v), respectivamente. Estos valores fueron introducidos en las ecuaciones respectivas, ver 4.7 y 4.5, para encontrar los valores de s (v/v) = $(1 / (99.9-1)) * ((15240.3-258.1) / 15240.3) * 100 = 1$, $n_{882} = (15240.3 / 15240.3) = 1$, $n_{1052} = (15240.3 / 4130.2) = 3.69$ y $n_{1274} = (15240.3 / 1693.4) = 9.0$. Los datos experimentales de varias disoluciones del etanol en agua y los datos predichos con la Ec. (4.2) son presentados en la Figura 17.

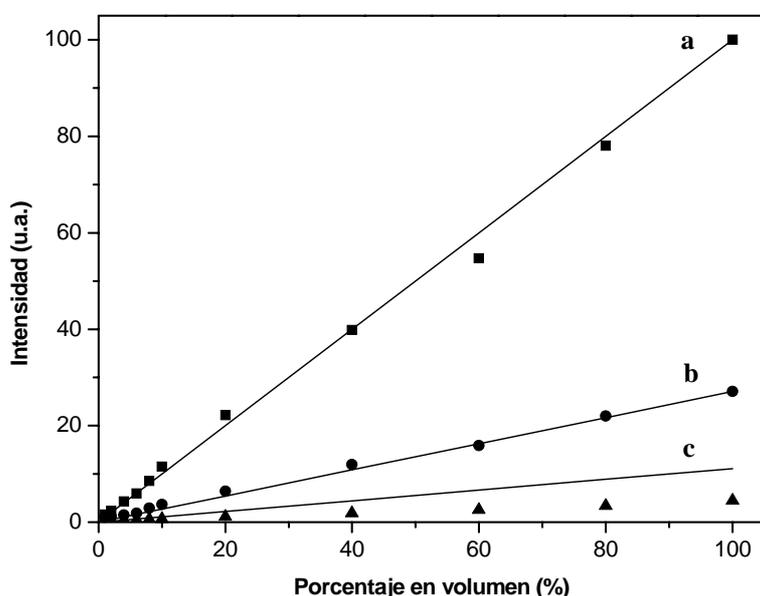


Figura 17: Datos experimentales (puntos) y predichos con la Ec. 4.2 (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del etanol (a) 882 cm^{-1} , (b) 1052 cm^{-1} y (c) 1274 cm^{-1} .

Otro ejemplo, se realizó con la rodamina-6G (R-6G), cuyo espectro Raman se puede observar en el Apéndice 7, los picos en 1361 , 1505 y 1180 cm^{-1} fueron elegido para el análisis, y las concentraciones de 20.88 y 0.52 (mM), respectivamente. Siguiendo los mismos pasos, como arriba, la ecuación (4.2) fue aplicada con los valores calculados: s (mM) = 0.378 , $n_{1361} = 1$, $n_{1505} = 1.16$ y $n_{1180} = 3.55$. Los datos experimentales de varias disoluciones de R-6G con metanol y los datos predichos son presentados en la Figura 18.

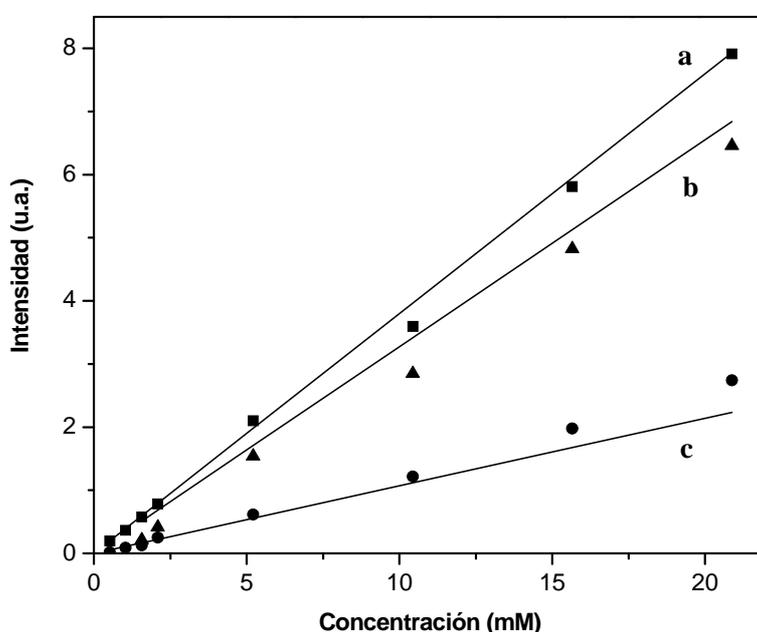


Figura 18: Datos experimentales (puntos) y predichos con la Ec. 4.2 correspondientes a la intensidad de los picos del R-6G (a) 1361 cm^{-1} , (b) 1505 cm^{-1} y (c) 1180 cm^{-1} .

Los datos experimentales de los dos picos menos intensos del etanol y R-6G fueron usados como ejemplos; ellos fueron comparados con los datos predichos desde la ecuación (4.2) usando los respectivos valores de n_v (Figs. 17b-17c-18b-18c), y una buena

correspondencia fue encontrada. Por lo tanto, la ecuación (4.2) puede ser usada para el análisis cuantitativo con los picos menos intensos cuando la identificación, debido al traslapamiento del pico más intenso, no es posible. El análisis de regresión lineal de los datos experimentales fue calculado, así también como los coeficientes de correlación, los cuales estuvieron en el rango desde 0.990 a 0.999. Estos resultados no se muestran en las Figuras 17 y 18 para no causar superposición, y a la vez, estos resultados presentaron similitud con reportes previos [35, 78, 79].

Además, se presentan algunos otros ejemplos. Se realizó el análisis de muestras alcohólicas usando la ecuación (4.8). Se analizaron bebidas alcohólicas comerciales mexicanas y una bebida peruana, las cuales tienen etanol como un compuesto en una concentración similar, el pico 882 cm^{-1} del etanol ($n = 1$) y el valor de $s = 1$, fueron usados. Los resultados son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

Análisis de etanol en productos y bebidas alcohólicas

Muestra	I (u.a.) etanol	I (u.a.) muestra	Experim. (%)	Esperado (%)	D (*) (%)
etanol (70°)	15184.7	10467.1	68.93	70	1.53
etanol (96°)	15184.7	14620.7	96.29	96	0.30
Tequila Arraigo	15184.7	5600.8	36.90	38	2.89
Tequila Herradura	15184.7	5838.5	38.43	40	3.93
Tequila Sembrador	15184.7	5967.9	39.30	40	1.75
Pisco Ocucaje	15751.0	6912.3	43.88	44	0.27

(*)

$$D = \left| \frac{\text{experimental} - \text{esperado}}{\text{esperado}} * 100 \right|$$

También se analizó un contaminante, pesticida folidol, que es de uso común en la agricultura. Este organofosfato tiene 62.6% (v/v) de ingrediente activo (paratión metílico) en su composición química.

En un primer paso, se verificó la cantidad de ingrediente activo. El pico 1345 cm^{-1} del espectro Raman de los pesticidas folidol y paratión metílico de grado técnico 80% (v/v) fue tomado para el análisis. Luego, la ecuación (4.2) fue usada con los valores de $s = 1$ y $n = 1$. Un valor de 62.9 % (v/v) fue encontrado, obteniéndose un error de 0.48%.

Además, se hicieron varias disoluciones con diferentes concentraciones del pesticida folidol con metanol. Estas disoluciones estuvieron en el rango de concentraciones desde 1.5 M a 6.25 mM. Para este rango, el valor de “s” fue de 25.1. El valor de “s” y $n = 1$ (para el pico más intenso) fueron usados en la ecuación (4.8) para determinar las concentraciones del pesticida en molaridad. Los resultados son mostrados en la Tabla 2. El análisis fue realizado en viales de vidrio transparentes y sellados, evitando cualquier contacto con el pesticida.

Tabla 2

Pesticida folidol con metanol en diferentes concentraciones

Concentraciones	I (u.a.)	Experim. (M)	Esperado (M)	D (%)
Compuesto puro	101579.88			
Dilución-1	24566.30	0.963442	1	3.66
Dilución-2	10831.84	0.424804	0.5	15.04
Dilución-3	6360.11	0.249431	0.25	0.23
Dilución-4	2632.20	0.103230	0.1	3.23
Dilución-5	1393.92	0.054667	0.05	9.33
Dilución-6	721.67	0.028302	0.025	13.21
Dilución-7	379.74	0.014893	0.0125	19.14

Otros ejemplos; se realizaron mezclas de dos, tres, cuatro y cinco solventes. El pico más intenso en cada solvente, excepto para la acetona, y los valores de $s = 1$ fueron usados para el análisis. El espectro Raman para cada una de las mezclas fue predicho con la ecuación (4.9). Como ejemplo, la Figura 19 muestra los espectros Raman individuales generados desde los componentes puros (metanol, etanol, isopropanol, acetona y ciclohexano). La Figura 20 muestra el espectro resultante al sumar las intensidades individuales de la Figura 19 y por último, las concentraciones de los compuestos se encuentran por comparación de este espectro con el espectro experimental. Los resultados de algunas mezclas considerados en este trabajo son mostrados en la Tabla 3.

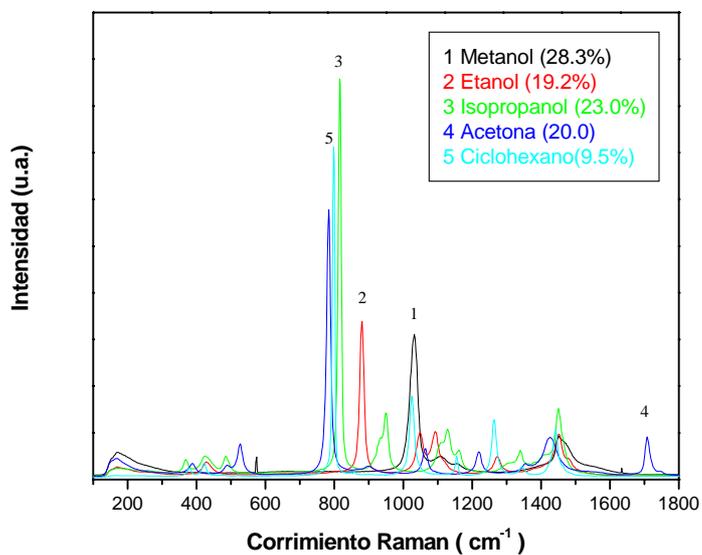


Figura 19: Espectros Raman de varios solventes en diferentes concentraciones generados con la Ec. 4.9.

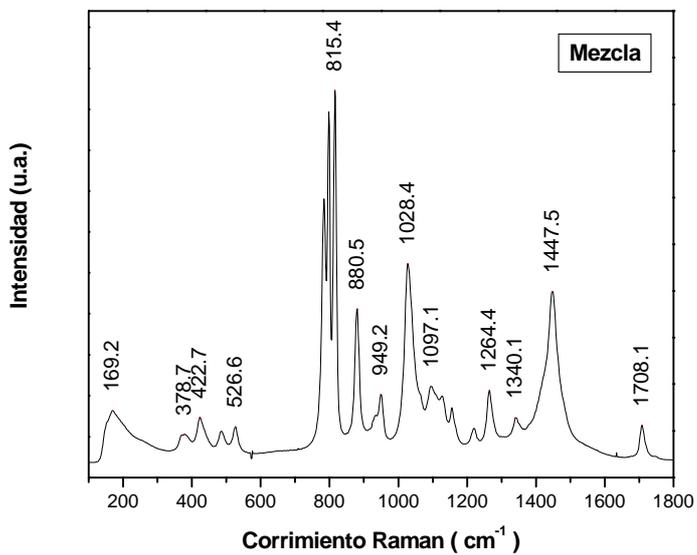


Figura 20: Espectro Raman resultante al sumar los espectros de la Fig. 19.

Tabla 3**Análisis de mezclas de solventes**

Mezclas	I_{EST} (u.a.)	n	picos (cm⁻¹)	Experim. %	Esperado %	D (%)
Etanol	16506.1	1	882	39.2	40	2.0
Metanol	10965.1	1	1034	60.8	60	1.3
Etanol	16506.1	1	882	41.4	40	3.5
2-propanol	32620.8	1	819	58.6	60	2.3
Etanol	18546.0	1	882	33.8	33.3	1.5
Metanol	11599.3	1	1034	32.4	33.3	2.7
2-propanol	34570.2	1	819	33.8	33.3	1.5
Acetona	32447.1	6.67	1711	20.4	25	18.4
Etanol	18546.0	1	882	24.6	25	1.6
Metanol	11599.3	1	1034	28.7	25	14.8
2-propanol	34570.2	1	819	26.3	25	5.2
Ciclohexano	82191.5	1	801	9.5	10	5.0
Etanol	18546.0	1	882	19.2	15	28.0
Metanol	11599.3	1	1034	28.3	30	5.7
2-propanol	34570.2	1	819	23	20	15.0
Acetona	32447.1	6.67	1711	20	25	20.0

En el análisis de un compuesto y en el espectro predicho para una mezcla de dos o tres solventes fueron muy buenos. Para cuatro y cinco mezclas de solventes los valores no fueron tan buenos como los de dos y de tres. Sin embargo, a pesar de que estas mezclas tienen bastante interacciones intermoleculares entre las moléculas, debido a la presencia de la acetona en algunas mezclas, las cuales influyen en la señal Raman; varios compuestos pueden ser estimados con valores de desviación (D) menores que el 10%. Pensamos que profundizando un poco más, mejores resultados podrían ser logrados.

4.3 Análisis Cuantitativo en el sustrato de Aluminio

El siguiente paso en el análisis cuantitativo de muestras líquidas fue el de extender la expresión matemática encontrada en la sección 4.2 hacia el análisis de estas muestras en el sustrato de aluminio [94]. Para esto, se ha considerado que la intensidad normalizada de un pico Raman puede ser expresada de la siguiente manera:

$$I_N^\nu = A \left(\frac{s}{n_\nu} C \right); \quad (4.10)$$

donde, al igual que la sección anterior, s es un coeficiente de proporcionalidad, C es la concentración de la muestra, ν es el corrimiento Raman (cm^{-1}), n_ν es la proporción entre el pico más intenso y los otros (incluido el primero) en el espectro Raman del compuesto puro y $A = aC^{-b}$. “ A ” es una función, “ a ” y “ b ” son parámetros necesarios para encontrar los datos cuando una gráfica curva es obtenida antes de una recta. El valor de “ s ”

fue determinado por un análisis geométrico simple, igual que en la sección anterior, el cual necesita dos puntos de los datos experimentales. Además, el valor de “A” en estos puntos, es decir A_1 y A_2 , pueden ser encontrados usando la ecuación (4.10). Luego en el análisis de dos ecuaciones simples, es decir utilizando la función $A = aC^{-b}$ en estos dos puntos y usando logaritmos, los valores de “a” y “b” de esta función pueden ser encontrados. Todas estas ecuaciones fueron evaluadas usando el programa Excel. Para el pico más intenso en un cierto rango de concentraciones, la intensidad máxima es igual a 100 y el mínimo es un porcentaje de este; con estos dos puntos, los valores de “s” y “A” pueden ser estimados, al igual que los valores de “a” y “b”. Para el análisis, el valor mínimo puede ser cambiado para predecir una curva, el cual tenga el valor más pequeño de la desviación estándar residual (RSD) con respecto a los datos experimentales, y luego, para los otros picos, n_v , necesita ser cambiado.

Se utilizó un pesticida, como ejemplo, para la evaluación de la expresión propuesta en esta sección. Se observó que al ser colocadas las muestras líquidas (pesticida diluido en un solvente) sobre el substrato de aluminio, se formaban microgotitas del compuesto en estudio después de evaporarse el solvente.

Las intensidades Raman de las microgotitas de pesticida desde 10 a 180 μm fueron analizadas. Para una concentración de 1000 ppm, en la Figura 21 se muestra los datos experimentales (puntos) para dos picos Raman y las curvas predichas con la ecuación (4.10) (líneas). Se encontró que el RSD para los picos 1345 cm^{-1} y 1110 cm^{-1} fueron de 8.8 y 7.2, respectivamente. En las muestras se observaron que las microgotitas fueron pequeñas y grandes, las cuales varían de acuerdo a la concentración a la que se encuentren. Las

microgotitas más grandes (por ejemplo: para 1000 ppm las de $160 \mu\text{m}$ en promedio) formadas sobre el substrato de aluminio fueron usadas para el análisis cuantitativo del pesticida en estudio.

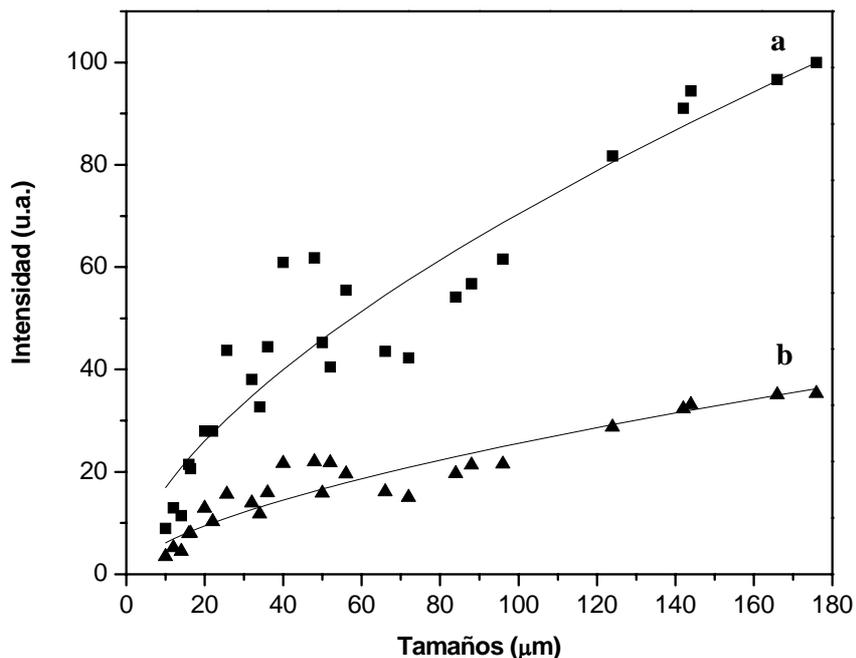


Figura 21: Intensidad Raman vs tamaños de las microgotitas de paratión metílico correspondiente a los picos seleccionados (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} .

Usando la consideración previa, el pesticida paratión metílico (folidol) en el rango de concentraciones desde 10 000 a 40 ppm fue analizado. La Figura 22 muestra los datos experimentales y las curvas predichas con la ecuación (4.10), el cual fue usado con los siguientes valores: $s = 0.0069$, $a = 2081.36$, $b = 0.79$ y “A” en el rango de 1.45 hasta 113.18. El RSD para los picos 1345 cm^{-1} y 1110 cm^{-1} fueron de 4.1 y 1.4, y los valores para n_v fueron 1 y 1.7, respectivamente.

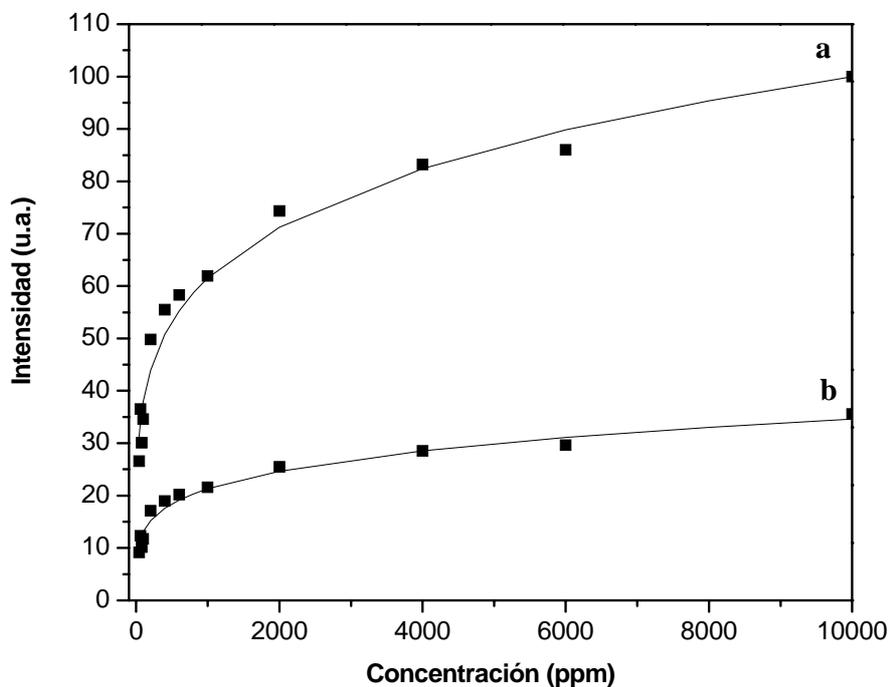


Figura 22: Datos experimentales (puntos) y curvas predichas con la Ec. (4.10) (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del paratión metílico (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} .

Para el pico 1345 cm^{-1} , la comparación entre los datos experimentales y el modelo de Langmuir es mostrado en la Figura 23. El RSD fue de 12.3 para este pico. Como se puede apreciar, este modelo falla para describir el comportamiento experimental observado en aquellas magnitudes de concentraciones y condiciones experimentales. Además, el RSD es mayor que el RSD obtenido con el modelo propuesto aquí. Para el pico 1110 cm^{-1} se observó la misma tendencia, es decir la gráfica es similar que la Figura 23.

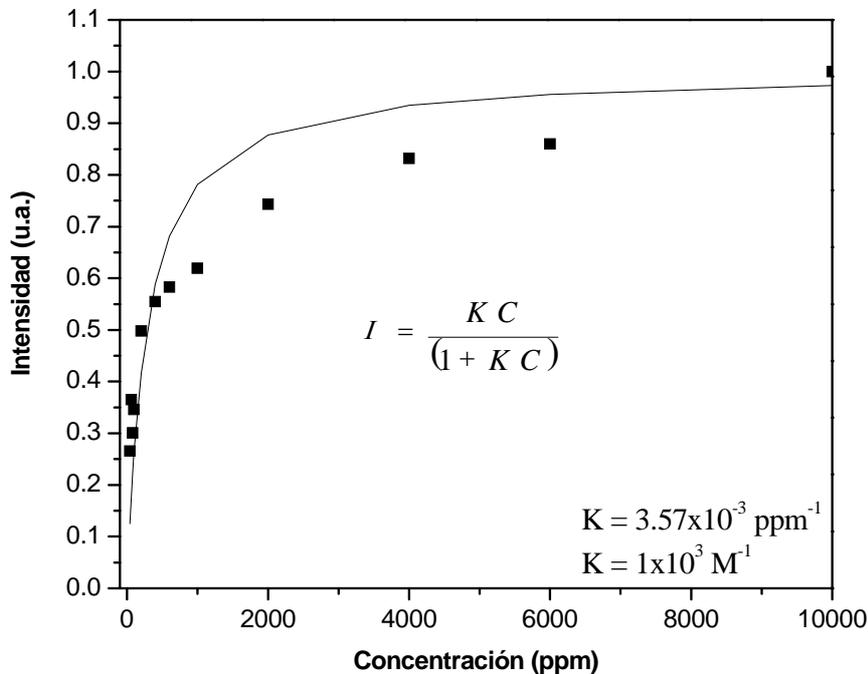


Figura 23: Datos experimentales (puntos) e isoterma de Langmuir (línea) de microgotitas de paratión metílico para el pico 1345 cm^{-1} .

Para el rango de concentraciones desde 100 a 10 ppm, las curvas predichas para los dos picos Raman son mostradas en la Figura 24. El RSD para los picos 1345 cm^{-1} y 1110 cm^{-1} fueron de 5.3 y 1.8, respectivamente. El modelo simple, ecuación (4.10), predice muy bien el comportamiento lineal en las concentraciones estudiadas en esta parte. Los valores de $s = 1.037$, $a = 0.43$, $b = -0.18$ y “A” en el rango de 0.64 hasta 0.96 fueron utilizados. Para ambos picos, el análisis de regresión lineal de los datos experimentales fue calculado, y el coeficiente de correlación, r^2 , fue de 0.996. Estos resultados no son mostrados en la Figura 24 para no causar superposición con las otras curvas.

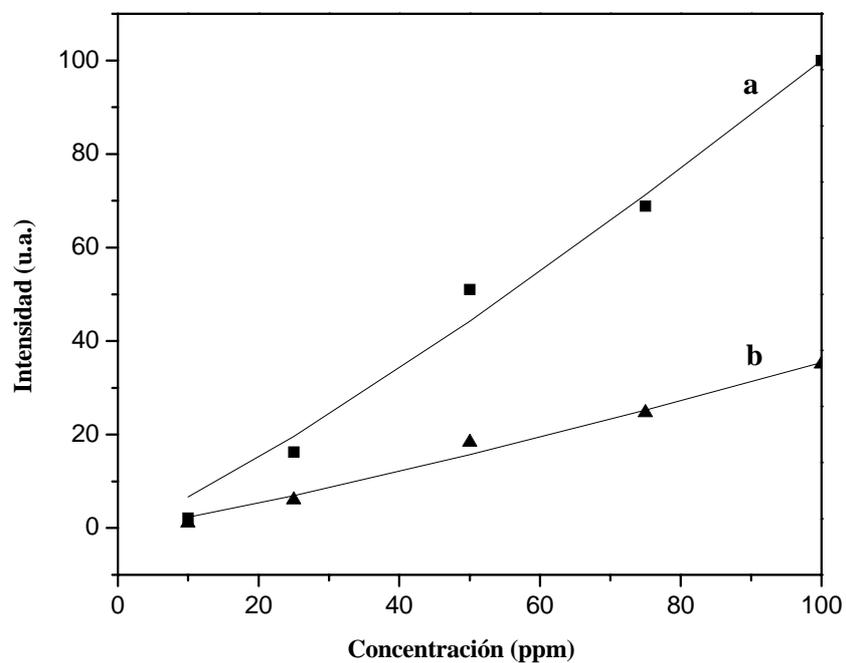


Figura 24: Datos experimentales (puntos) y curvas predichas con la Ec. (4.10) (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del paratión metílico (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} .

En el rango de concentraciones desde 10 000 a 2 000 ppm, los espectros Raman del pesticida medido sobre el sustrato de aluminio y en un vial de vidrio (muestras líquidas) fueron comparadas, los cuales demostraron que el aumento de la señal, intensidad Raman, fue del orden de 10^2 .

4.4 Estudio de clorofila y β -caroteno en chile *ancho*

El cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) constituye una fuente importante de recursos para el estado de Aguascalientes. Los principales tipos de chile cultivados en esta región son los conocidos como: *Ancho*, *Mirasol* y *Pasilla*, aunque también se cultivan pequeñas áreas con otros tipos de chile.

Debido al tipo de pesticida, el cual es de contacto, y al tipo de muestra ha analizar; se presenta en esta sección el estudio superficial realizado a un tipo de chile, conocido con el nombre de chile *ancho*, en el cual se encontró información adicional, es decir, se observó una tendencia en el análisis de las proporciones de los picos característicos de la clorofila y del β -caroteno. Estos componentes, en forma separada, ya han sido estudiados anteriormente [95-97]. Las muestras de chile fueron cedidas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Pabellón de Arteaga, Ags., las cuales consistieron de 3 tipos de muestras que tenían diferentes etapas de maduración: *tardía*, *media* y *total*. Estas muestras fueron analizadas en el sistema NIR-Raman, obteniéndose sus respectivos espectros Raman, las cuales fueron evaluadas. Se eligió el pico de la clorofila en 1604 cm^{-1} y el pico del β -caroteno en 1523 cm^{-1} para el estudio; luego, en cada espectro Raman, se encontró la proporción entre ambos picos, utilizando la siguiente relación de proporcionalidad:

$$P = \frac{I_{\text{clorofila}}^{1604}}{I_{\beta\text{-caroteno}}^{1523}}, \quad (4.11)$$

donde “ p ” indica el nivel de clorofila respecto a la cantidad de β -caroteno, ambas sustancias indican fases opuestas en lo que respecta a la maduración de un determinado fruto.

Niveles altos de clorofila ($p > 1$) indica que el fruto aun tiene el color verde, fase temprana de maduración. En la Figura 25 se presenta el espectro Raman característico del chile *ancho* cuando tiene el color verde, se pueden observar los picos característicos de la clorofila (1606 cm^{-1}) y del β -caroteno (1157 y 1527 cm^{-1}). Además, se observa que las intensidades de los picos del β -caroteno aun son pequeñas, las cuales aumentan de intensidad cuando el fruto comienza a madurar, como veremos posteriormente.

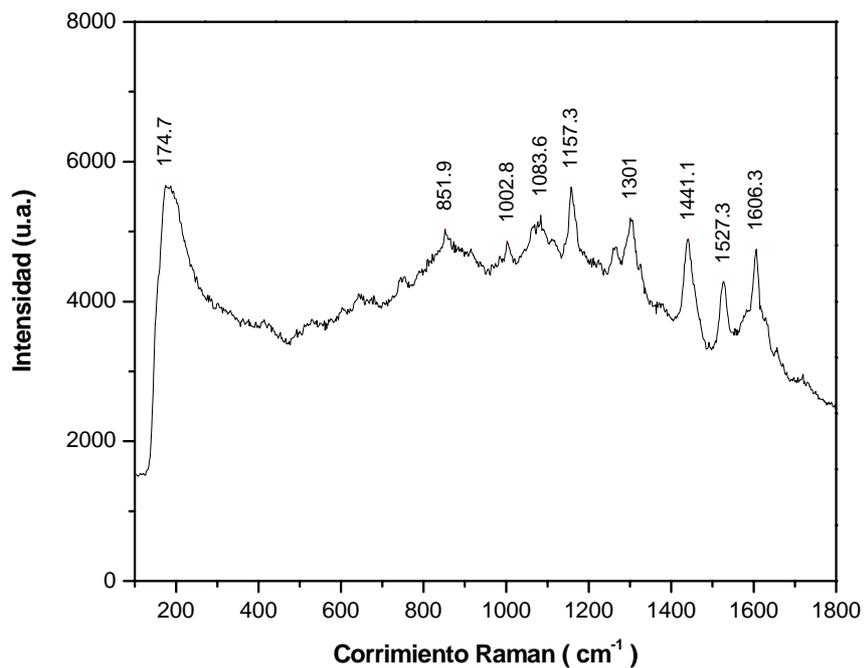


Figura 25: Espectro Raman del chile *ancho* en fase temprana de maduración (color verde).

Niveles altos de β -caroteno ($p < 1$) indican que el fruto tiene el color rojo, fase última en el proceso de maduración. En la Figura 26 se presenta el espectro Raman característico del chile *ancho* cuando tiene el color rojo, se pueden observar los picos característicos del β -caroteno, los cuales son muy intensos. Los picos Raman 1157 y 1516 cm^{-1} provienen de las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-C y C=C, respectivamente.

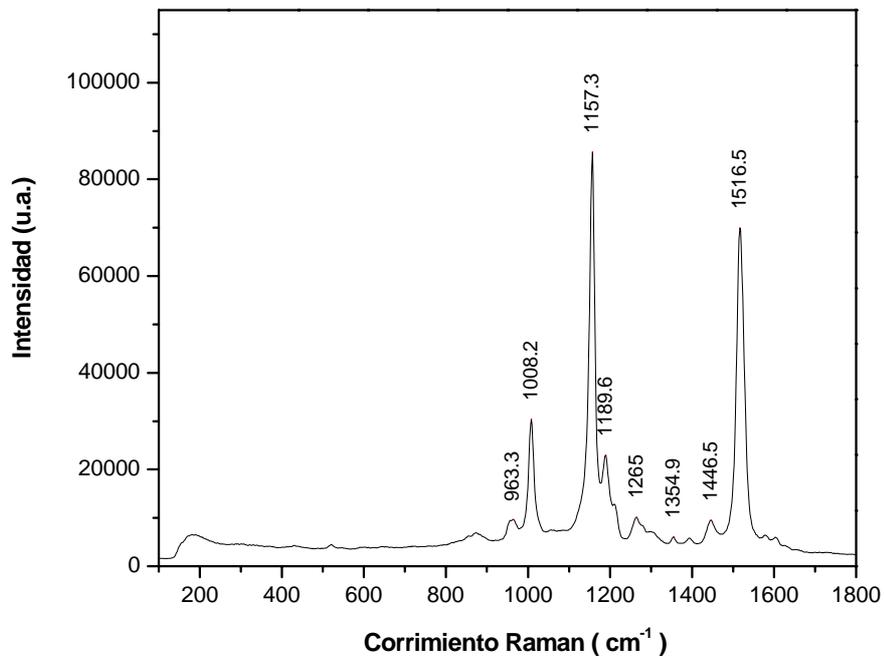


Figura 26: Espectro Raman del β -caroteno, chile *ancho* de color rojo.

Utilizando la relación (4.11), las proporciones entre los picos Raman de la clorofila y del β -caroteno fueron encontrados. En la Figura 27 se presenta los resultados obtenidos para el chile *ancho* en tres diferentes etapas de maduración; *tardía* tiene el color verde oscuro, *media* tiene el color verde claro, y *total* tiene el color rojo. Estos colores solamente muestran una tendencia del color observado en los experimentos.

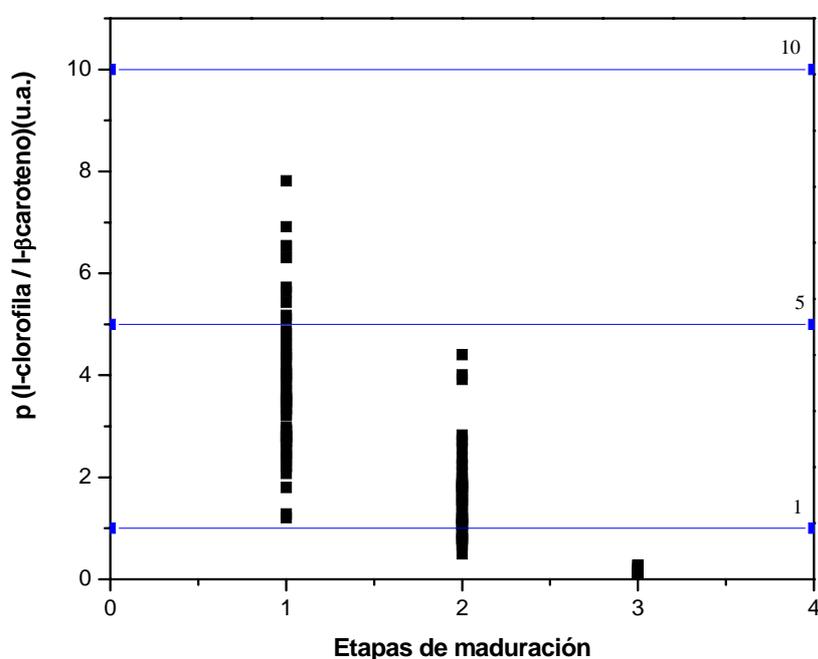


Figura 27: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto a la etapa de maduración del chile *ancho* (1: tardía, 2: media y 3: total).

Además; en estas muestras se observó que las diferentes partes de la superficie del chile empezaron a madurar (cambio de color: del verde al rojo) en forma independiente, no importando el tamaño en el cual se encontraron. Para este aparente problema se determinó

otra relación, para lo cual se consideró la siguiente alternativa: en un conjunto de espectros Raman (mayores de 10 y obtenidas en diferentes partes de la superficie del chile) de una misma muestra, se determina la intensidad máxima del pico de la clorofila (1604 cm^{-1}) y del β -caroteno (1523 cm^{-1}), luego se encuentra la proporción entre ellos de la siguiente manera:

$$q = \frac{I_{\beta\text{-caroteno}}^{1523}}{I_{\text{clorofila}}^{1604}}, \quad (4.12)$$

en donde, valores pequeños de “ q ” indican que el fruto aun se encuentra en las etapas iniciales de crecimiento. Valores altos de “ q ” indican que el fruto se encuentra en las etapas de maduración, esta relación es propuesta de esta forma por conveniencia. Como ejemplo, se presentan las Figuras 28 y 29, las cuales corresponden a diversas etapas de crecimiento del chile *ancho*. En la Figura 28, los tres tipos de muestras fueron de color verde, lo cual se puede observar en los valores pequeños de ” q ”. En la Figura 29 se aprecia el valor significativo del grupo 3, en el cual la muestra fue de color rojo.

Los resultados obtenidos en esta sección muestran las posibilidades de aplicación de la técnica Raman hacia estas áreas, con lo cual se analizaría a nivel molecular las etapas de desarrollo de una fruta específica. Los trabajos en esta línea aun se encuentran en investigación, aun falta en encontrar el valor adecuado de “ q ”, el cual debe de representar el momento propicio para la cosecha del fruto y también, aplicar estas mismas ideas a otros tipos de frutos. El análisis de las proporciones entre estos picos también podría ser usado para el estudio de plantas sanas y enfermas.

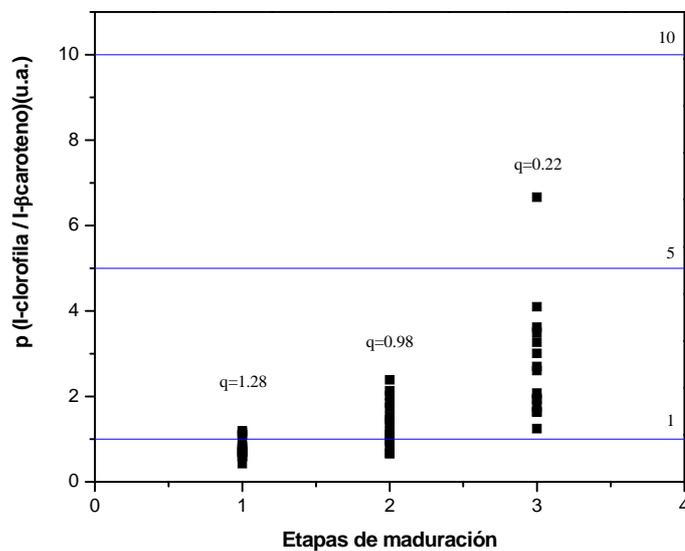


Figura 28: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto al tamaño del chile *ancho* (1: chica, 2: mediana y 3: grande).

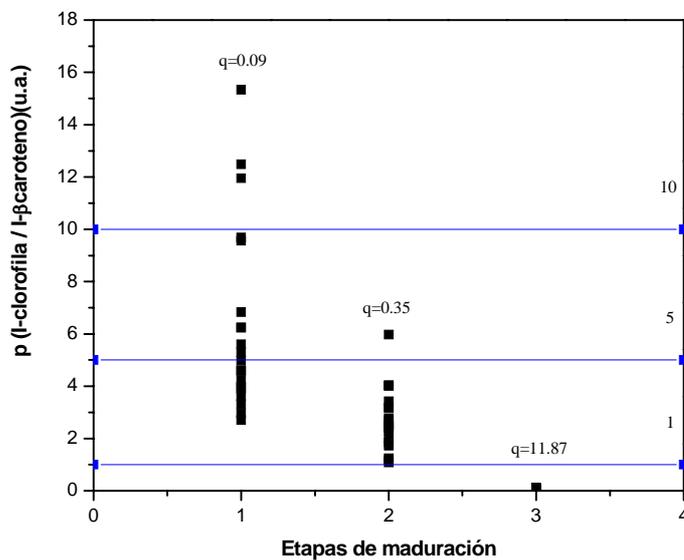
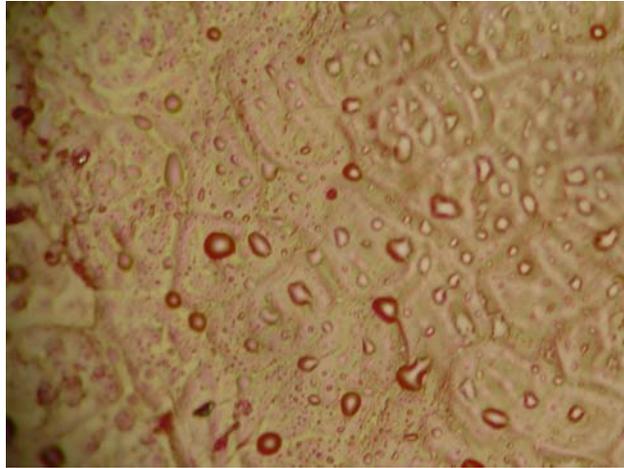


Figura 29: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto a la etapa de maduración del chile *ancho* (1: tardía, 2: media y 3: total).

4.5 Detección de paratión metílico y malatión en chile *ancho*

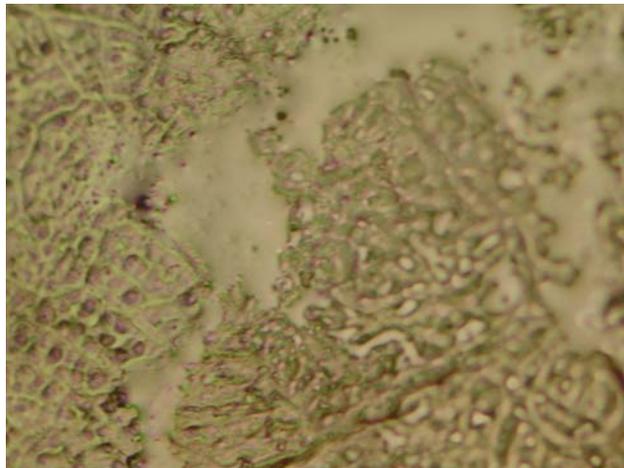
Las muestras de chile *ancho* utilizadas en este trabajo también fueron cedidas por el INIFAP. Las cuales fueron contaminadas en el laboratorio de química con uno u otro pesticida, paratión metílico o malatión, en frutos y fechas diferentes. La aplicación del pesticida se realizó con un atomizador, simulando la aplicación que se realiza en el campo; la disolución fue realizada con agua tridestilada y la concentración fue de 1000 ppm, el cual es sugerido en el envase comercial.

Las muestras fueron analizadas en el sistema NIR-Raman después de 24 horas de la aplicación del pesticida. En un primer monitoreo de la superficie del chile a través del microscopio se observó que no quedaron rastros del pesticida, ni de ningún otro líquido, luego, estas muestras fueron analizadas en el equipo obteniéndose los espectros Raman, los cuales presentaron los picos característicos de la clorofila y del β -caroteno, Figuras 25 y 26, pero no se identificó ninguno de los picos que caracterizan al pesticida en estudio. Después de este primer paso, las mismas muestras fueron introducidas en un refrigerador. Las cuales, después de un lapso de tiempo (20 horas, aproximadamente), se sacaron del refrigerador y se dejaron al medio ambiente. Después de algunos minutos, sobre la superficie del chile se formaron gotas de agua debido a la condensación del aire en contacto con la muestra fría; luego en el caso inverso, con la evaporación del agua, quedaron algunos rastros. Estos rastros (microgotas) fueron observados a través del microscopio (Figuras 30 y 31), las cuales fueron analizadas en el equipo Raman y se obtuvieron sus respectivos espectros, las cuales se muestran posteriormente.



50 μm -----

Figura 30: Rastros de pesticida, paratión metílico, sobre la superficie del chile *ancho*



50 μm -----

Figura 31: Rastros de pesticida, malatión, sobre la superficie de chile *ancho*.

Las Figuras 32 y 33 presentan los espectros Raman de las microgotas que quedaron absorbidas sobre la superficie del chile. En estos espectros se pudo identificar el pico más intenso o algunos picos característicos del pesticida en estudio, aparte de los picos de la clorofila y del β -caroteno. Por este método se hicieron visibles las microgotas de pesticidas, residuos que quedaron impregnados en la superficie del chile. Además, se colocaron pequeñas gotas de agua extraída de la superficie del chile (gotas condensadas) sobre el substrato de aluminio. Después de que el agua fue evaporada a temperatura ambiente quedaron microgotas del pesticida, cuyos espectros Raman fueron fáciles de identificar.

En la figura 32a se observa el espectro Raman característico del β -caroteno (chile color rojo) y el pico 1347 cm^{-1} , el cual es característico del pesticida paratión metílico. En la figura 32b se observa superpuesto el espectro Raman del paratión metílico y del chile *ancho* en color verde.

En la figura 33a se observa el espectro Raman característico del β -caroteno (chile color rojo) y el pico 654 cm^{-1} , el cual es característico del pesticida malatión. En la figura 33b se observa el espectro Raman del chile *ancho* en color verde y el pico 655 cm^{-1} del malatión.

Cabe señalar que el espectro Raman del β -caroteno es muy intenso, lo cual ocasiona que los picos característicos de los pesticidas en estudio se aprecien débilmente. Esto no implica que el pesticida se encuentre en bajas concentraciones; estudios al respecto aun faltan en implementar.

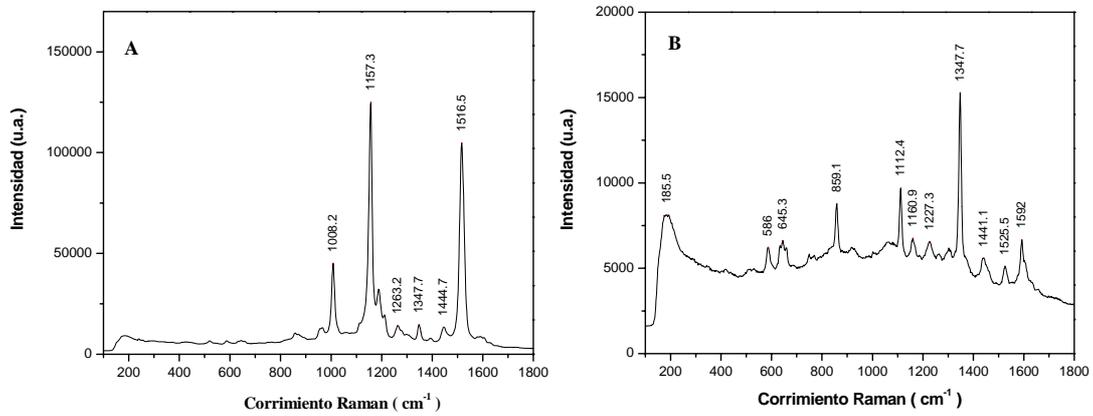


Figura 32: Espectros Raman de las microgotas residuales sobre la superficie de chile *ancho* contaminado con paratión metílico. a) chile color rojo y b) chile color verde.

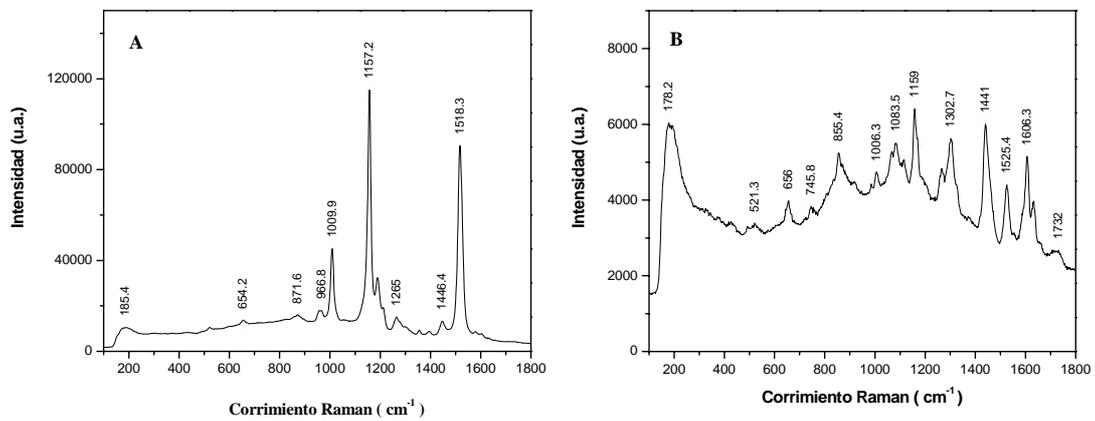


Figura 33: Espectros Raman de las microgotas residuales sobre la superficie de chile *ancho* contaminado con malatión. a) chile color rojo y b) chile color verde.

Capítulo 5

Conclusiones

En este capítulo se presentan las conclusiones del trabajo realizado y además, se presentan las perspectivas y aplicaciones de trabajos futuros.

a) Conclusiones generales:

- 1) Se concluye y se demuestra que la espectroscopia Raman, mediante una simple técnica de extracción, puede detectar pesticidas sobre matrices agrícolas. Como ejemplo se presentó la detección de dos tipos de pesticidas (paratión metílico y malatión) sobre la superficie de muestras de chile *ancho*, las cuales fueron muestras reales del campo.
- 2) La espectroscopia Raman en el cercano infrarrojo puede ser usado en la detección y medición de los niveles de clorofila y β -caroteno en muestras agrícolas como plantas, verduras y frutas. Se observó, en muestras de chile *ancho*, la excelente tendencia de estos dos componentes en las diversas etapas de maduración del fruto.

- 3) La expresión matemática propuesta en este trabajo para el análisis cuantitativo es satisfactoria. El cual fue usado para encontrar las concentraciones de uno o varios compuestos en una mezcla líquida dada. Además, en las condiciones experimentales propuestas en este trabajo, se puede medir desde los compuestos puros hasta concentraciones tan bajas como 1 ppm.

b) Conclusiones complementarias:

1. Los espectros Raman de muestras orgánicas (pesticidas) son obtenidas fácilmente con un sistema NIR-Raman. El sistema Raman en el visible presenta una débil ganancia de la señal Raman de muestras orgánicas, debido a la fluorescencia.
2. La espectroscopia Raman no necesita grandes volúmenes de solventes para la extracción de las muestras y la obtención de los resultados es relativamente rápida. En los espectros Raman presentados aquí, el tiempo de obtención de cada espectro fue de 60 s en el sistema NIR-Raman.
3. La técnica Raman no necesita demasiada manipulación de las muestras, es decir, se puede evitar todo contacto con sustancias tóxicas, las cuales pueden ser analizadas a través de un vial de vidrio transparente o sobre un substrato en cantidades muy pequeñas.
4. El substrato de aluminio implementado y utilizado en este trabajo fue ampliamente satisfactorio. Es decir, fue muy fácil de manipular, no requirió de ningún tratamiento previo, además se encuentra disponible comercialmente. Este substrato puede ser usado como una primera alternativa, en cierto rango de concentraciones, en comparación a los substratos utilizados en la técnica SERS, los cuales si requieren de un tratamiento previo para su utilización.
5. Cada espectro Raman es una huella digital del compuesto a estudiar. Uno o unos pocos picos característicos son suficientes para proporcionar identificación espectral de un compuesto químico.

6. La utilización de las intensidades normalizadas, nos proporcionó un comportamiento más predecible en el análisis de las concentraciones de las muestras estudiadas aquí.
7. La relación n_{ν} incluida en la expresión matemática, nos permite considerar cualquier otro pico del espectro Raman para el análisis cuantitativo en una mezcla. Esto es a causa del traslapamiento de las bandas, por lo cual en algunas mezclas es difícil de identificar, como primera alternativa, el pico más intenso del compuesto.
8. La utilización de las microgotitas de paratión metílico sobre el sustrato de aluminio es una buena técnica de análisis, la cual puede ser extendida a otros tipos de muestras.
9. Para el pesticida paratión metílico se encontró que la señal Raman medida sobre el sustrato es $\sim 10^2$ más intenso que la señal Raman obtenida en el vial de vidrio transparente. Por lo tanto, el sustrato no tiene las condiciones para ser considerado sustrato activo SERS. En este último la amplificación de la señal, según la literatura, es de $10^2 - 10^7$ veces.

c) Perspectivas y aplicaciones en trabajos futuros:

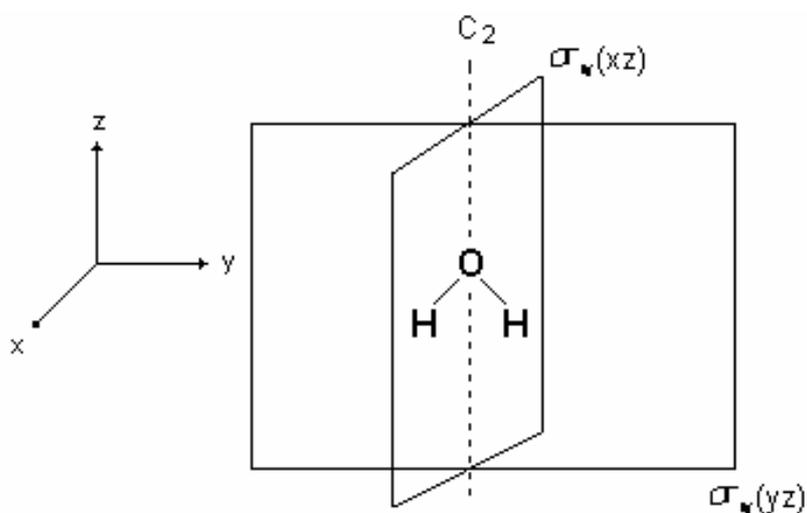
- 1) La espectroscopia Raman es una herramienta alternativa para la detección de una gran variedad de pesticidas y contaminantes en general, las cuales pueden estar presentes en diversas matrices como en agua, tierra y vegetales. Es decir, la técnica Raman se puede aplicar al estudio y detección de pesticidas organoclorados en tejido adiposo; al estudio y detección de hidrocarburos polinucleares aromáticos en tierras contaminadas; entre otros contaminantes.
- 2) Ampliación de la aplicación del sustrato de aluminio hacia otros tipos de muestras.
- 3) Aplicación de la espectroscopia Raman para el estudio de plantas sanas y enfermas.
- 4) Estudio del nivel de clorofila y β -caroteno en la maduración de frutos mediante espectroscopia Raman.
- 5) Análisis cuantitativo de contaminantes en matrices agrícolas específicas por Raman.
- 6) Ampliación y reporte de la librería de espectros Raman de diversos compuestos.

Apéndices

Apéndice 1

Vibraciones de la molécula de agua: H₂O

Aquí se presenta un ejemplo, en el cual se obtienen los modos vibracionales de una molécula utilizando los conceptos de simetría y teoría de grupos [7, 98]. Uno de los ejemplos más fáciles de visualizar, es la molécula de agua.



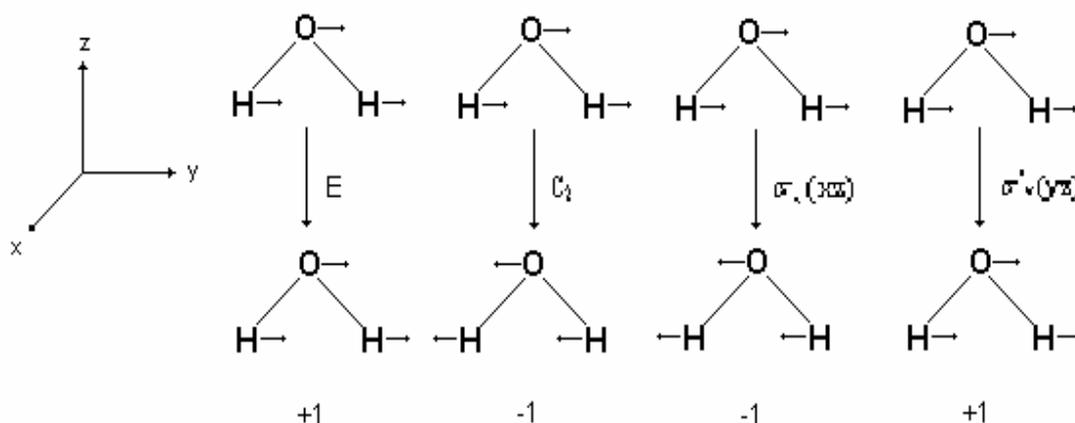
Sistema de coordenadas y elementos simétricos de la molécula de agua.

1) Grupo puntual y tabla de caracteres:

Analizando los elementos simétricos de la molécula de agua, se encuentra que tiene un eje C_2 , dos planos σ_v y de hecho la identidad E. este grupo de 4 elementos simétricos caracterizan al grupo puntual C_{2v} .

$$C_{2v} = E, C_2, \sigma_v(xz), \sigma'_v(yz)$$

Ahora, consideremos la traslación de la molécula sobre el eje "y", donde la dirección será representado por vectores unitarios sobre los átomos, e imaginamos como cambiarán cuando sufran las operaciones simétricas de C_{2v} .

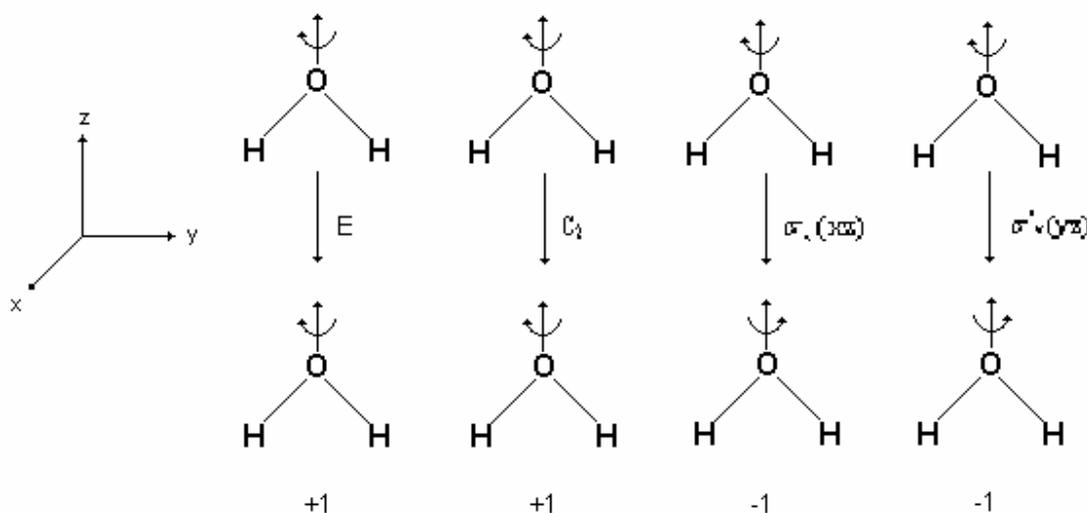


Efectos de operaciones simétricas en C_{2v} , traslación a lo largo del eje "y".

Observando en la figura anterior; la identidad (E) no altera la posición de las flechas (+1). La rotación alrededor del eje C_2 causa al vector +y a cambiar a -y, entonces es (-1). La reflexión en el plano $\sigma_v(xz)$ causa a +y a cambiar a -y (-1), pero la reflexión en el plano de la molécula, $\sigma_v(yz)$, resulta en que los vectores no cambian (+1). El grupo de las 4 etiquetas (+1, -1, -1, +1) generados en este análisis constituye una representación irreducible en el grupo puntual C_{2v} .

Un vector unitario en la dirección “+x”, las etiquetas +1, -1, +1, y -1 son generadas. Un vector en la dirección “+z” no será cambiado por ninguno de las operaciones simétricas y será descrito por el grupo: +1, +1, +1, +1.

Se genera la cuarta representación irreducible al considerar la rotación de la molécula alrededor del eje “z”, como se aprecia en la siguiente figura:



Efectos de operaciones simétricas en C_{2v} , rotación alrededor del eje “z”.

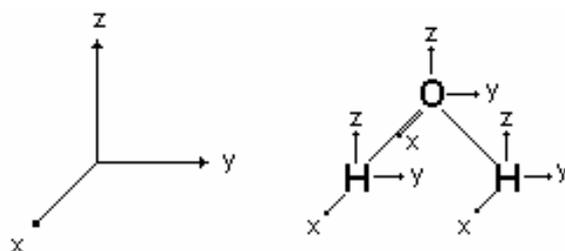
Ambas operaciones, E y C_2 dejan la dirección sin cambio (+1), pero la reflexión en algún plano causa una inversión en el sentido de la flecha (-1). El resultado es +1, +1, -1, y -1.

Muchas de las propiedades simétricas de un grupo puntual, incluyendo sus operaciones características y representaciones irreducibles, son presentadas en una tabla.

C_{2v}	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v(yz)$		
A_1	1	1	1	1	z	x^2, y^2, z^2
A_2	1	1	-1	-1	R_z	xy
B_1	1	-1	1	-1	x, R_y	xz
B_2	1	-1	-1	1	y, R_x	yz

2) Representación reducible:

Se representa los grados de libertad para cada átomo con los vectores de desplazamientos cartesianos, en donde los vectores “z” son paralelos al eje de rotación de más alto giro de la molécula.



Vectores de desplazamiento cartesianos para H₂O.

Los caracteres de la representación reducible son determinados al considerar los efectos combinados de cada operación simétrica sobre los vectores atómicos.

En la molécula de agua los átomos que no cambian para las operaciones E y $\sigma_v(yz)$ son los tres átomos y para las otras dos operaciones, solamente el oxígeno se mantiene sin cambio.

La contribución para cada átomo se obtiene, +3 para la operación de identidad porque los tres vectores no son afectados. En el caso de C_2 , el vector “z” sobre el átomo de oxígeno permanece estacionario mientras los vectores “x” y “y” son movidos a “-x”, y “-y”, respectivamente, produciendo un valor de -1.

Derivación de la representación reducible para la molécula de agua:

	E	C_2	$\sigma_v(xz)$	$\sigma_v(yz)$
átomo sin cambio	3	1	1	3
Contribución por átomo	3	-1	1	1
Γ_{tot}	9	-1	1	3

Usando la formula de reducción,

$$a_m = \frac{1}{h} \sum_K n \chi(K) \chi_m(K) . \quad (\text{A1-1})$$

Para descomponer la representación, se debe de aplicar a cada uno de las cuatro representaciones irreducibles en el grupo puntual C_{2v} :

$$A_1: \quad a_m = (1/4)[(9)(1)(1) + (-1)(1)(1) + (1)(1)(1) + (3)(1)(1)] = 3$$

$$A_2: \quad a_m = (1/4)[(9)(1)(1) + (-1)(1)(1) + (1)(-1)(1) + (3)(-1)(1)] = 1$$

$$B_1: \quad a_m = (1/4)[(9)(1)(1) + (-1)(-1)(1) + (1)(1)(1) + (3)(-1)(1)] = 2$$

$$B_2: \quad a_m = (1/4)[(9)(1)(1) + (-1)(-1)(1) + (1)(-1)(1) + (3)(1)(1)] = 3$$

Así, la representación reducible es resuelta en: 3 A_1 , 1 A_2 , 2 B_1 , y 3 B_2 .

Para obtener de este grupo total las representaciones para la vibración, es necesario restar las representaciones para las otras dos formas de movimiento: rotación y traslación. Se pueden identificar en la tabla de caracteres de C_{2v} . Los tres modos de traslación pertenecerán a las mismas representaciones como las funciones básicas de “x”, “y”, y “z”, y los modos de rotación se transformarán como R_x , R_y , y R_z .

$$\begin{array}{r} \Gamma_{tot} = 3 A_1 + A_2 + 2 B_1 + 3 B_2 \\ -[\Gamma_{trans} = A_1 + B_1 + B_2] \\ -[\Gamma_{rot} = A_2 + B_1 + B_2] \\ \hline \Gamma_{vib} = 2 A_1 + B_2 \end{array}$$

En la literatura se puede encontrar mayor información y ejemplos de otras moléculas, así como, tratamientos alternativos para determinar los modos vibracionales de una molécula.

Apéndice 2

Grupos Funcionales en la Química Orgánica

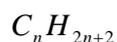
La química orgánica es la química de los compuestos del carbono. Se puede encontrar un curso completo sobre este tema en la literatura [99].

A. Grupos funcionales que forman parte del esqueleto molecular

a) Alcanos



Son hidrocarburos saturados, contienen únicamente enlaces sencillos Carbono-Carbono, acíclicos. Cumplen con la fórmula molecular:



donde, n es el número de átomos de carbono.

Para nombrar todos los hidrocarburos saturados se utiliza la terminación “-ano”. Los grupos que están unidos a la cadena principal se llaman sustituyentes.

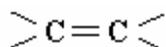
Cicloalcanos

Son hidrocarburos saturados que tienen, al menos, un anillo formado con átomos de carbono, cíclicos. Los cicloalcanos se nombran colocando el prefijo “ciclo-“ al nombre del alcano que corresponde al mismo número de átomos de carbono del anillo.

Grupos Alquilo

Son sustituyentes saturados que sólo contienen carbono e hidrógeno. Un grupo alquilo se nombra a partir del nombre del alcano con el mismo número de átomos de carbono y se cambia la terminación “-ano” por “-ilo”. Como símbolo general se utiliza la letra “**R**”.

b) Alquenos



Son hidrocarburos no saturados, contienen enlaces múltiples, enlaces dobles Carbono-Carbono, y por lo tanto contienen menos hidrógeno por carbono que los alcanos. Cumplen la fórmula molecular:



Para designar un doble enlace carbono-carbono, se utiliza la terminación “-eno”. Cuando se encuentran más de un doble enlace, la terminación cambia a “-dieno”, “-trieno”, etc.

Cuando en una misma molécula están presentes dos o más enlaces múltiples:

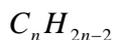
- Acumulados: $C = C = C = C$
- Conjugados: $C = C - C = C$
- Aislados: $C = C - C - C = C$

Los compuestos que contienen un doble enlace y un triple enlace se llaman “-eninos”.

c) Alquinos



Son hidrocarburos no saturados, contienen enlaces múltiples, enlaces triples Carbono-Carbono, y por lo tanto contienen menos hidrógeno por carbono que los alcanos. Cumplen la fórmula molecular:

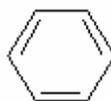


En un triple enlace $C \equiv C$ se utiliza la terminación “-ino”, dos triples enlace se usa “-diino”, etc.

Cuando en una misma molécula están presentes dos o más enlaces múltiples:

- Acumulados: $C \equiv C \equiv C \equiv C$
- Conjugados: $C \equiv C - C \equiv C$
- Aislados: $C \equiv C - C - C \equiv C$

d) Arenos



Son hidrocarburos aromáticos. Los seis hidrógenos del benceno son químicamente equivalentes.

Grupo Arilo:

Para representar a este grupo se utiliza el símbolo “**Ar**”. En los compuestos aromáticos, frecuentemente se presentan dos grupos, que tienen nombres muy especiales. Son el grupo fenilo y el grupo bencilo.

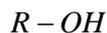
B. Grupos funcionales que contienen oxígeno

1. Con enlaces sencillos carbono-oxígeno

a) Alcoholes



Los alcoholes tienen la fórmula general:



Estructuralmente son semejantes al agua ($H-O-H$), en donde uno de los hidrógenos se ha reemplazado por un grupo alquilo (R). Su grupo funcional es el **grupo hidroxilo: -OH**

Según IUPAC, el grupo hidroxilo de los alcoholes se indica con la terminación “-ol”. Y comúnmente, se antepone la palabra “alcohol” al nombre del grupo alquilo, terminado en “-ílico”.

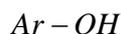
Clasificación de los alcoholes

Los alcoholes se clasifican como: primarios (1°), secundarios (2°) y terciarios (3°), lo que depende de que estén unidos por uno, dos o tres grupos alquilo al átomo de carbono que está unido al grupo hidroxilo.

b) Fenoles



Los fenoles tienen el mismo grupo funcional que los alcoholes (-OH), pero unido a un anillo aromático (Ar).



c) Éteres



Los éteres se denominan generalmente con el nombre de cada uno de los grupos alquilo (R) o arilo (R' o Ar), en orden alfabético, seguido por la palabra “éter”.

Fórmula general:



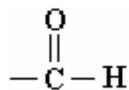
Grupo Alcóxido: – OR

c.1 Epóxidos (oxiranos): Son éteres cíclicos con un anillo de tres miembros que contiene un átomo de oxígeno.

c.2 Éteres Cíclicos: Se conocen éteres cíclicos con anillos mayores que los epóxidos, que son de tres miembros.

2. Con dobles enlaces carbono-oxígeno

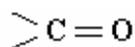
a) Aldehídos



Tienen por lo menos un átomo de hidrógeno unido al grupo carbonilo. El grupo restante puede ser otro átomo de hidrógeno o cualquier grupo orgánico.

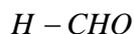


Grupo Carbonilo



Es el grupo funcional más importante en química: C = O (CO, representa un doble enlace)

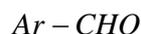
a.1 Formaldehído



a.2 Aldehído Alifático



a.3 Aldehído Aromático



Según IUPAC, la terminación característica para los aldehídos es “-al” (de la primera sílaba de aldehído) del alcano correspondiente. En el caso de los aldehídos cíclicos, se utiliza el sufijo “-carbaldehído”.

b) Cetonas

En las cetonas el átomo de carbono del grupo carbonílico está unido a otros dos átomos de carbono.

b.1 Cetona Alifática



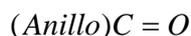
b.2 Alquil Aril Cetona



b.3 Cetona Aromática



b.4 Cetona Cíclica



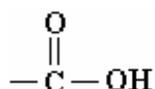
Según IUPAC, se utiliza la terminación “-ona” (de la última sílaba de cetona) del alcano correspondiente.

3. Con enlaces doble y sencillo carbono-oxígeno

a) Ácidos Carboxílicos

Los ácidos carboxílicos son los ácidos orgánicos más importantes; su grupo funcional es el grupo carboxilo. Este nombre surge de una contracción de las siguientes partes: el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo.

Grupo Carboxilo: -COOH



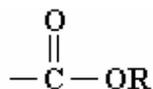
Fórmula molecular del ácido carboxílico:



Para los derivados de ácidos; el grupo “-OH”, de un ácido, se ha reemplazado por otras funciones: “-OR”, halógenos (X= Cl, Br) y otros grupos.

b) Éster

Los ésteres se obtienen al reemplazar el grupo -OH de los ácidos por un grupo -OR

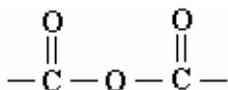


R y R' pueden ser alquilo o arilo.



c) Anhídridos de Ácido

Los anhídridos de ácido son derivados de ácidos que se forman al quitar una molécula de agua a dos grupos carboxílicos y al unir los fragmentos.



C. Grupos funcionales con nitrógeno

a) Aminas

Las aminas son compuestos orgánicos relacionados con el amoníaco, que se forman al reemplazar uno, dos o los tres hidrógenos del amoníaco (NH y NR, representan un enlace simple para este caso) por grupos orgánicos. Las aminas son bases.

a.1 Amoníaco



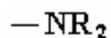
a.2 Amina Primaria



a.3 Amina Secundaria



a.4 Amina Terciaria

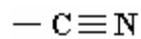


R, puede ser grupos alquilos o arilos.

El grupo amino: -NH_2

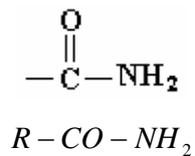
En algunas aminas secundarias o terciarias, el nitrógeno puede formar parte de un anillo.

b) Nitrilo (cianuro)

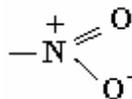


D. Grupos funcionales con oxígeno y nitrógeno

a) Amida Primaria



b) Compuestos Nitro



E. Grupos funcionales con azufre

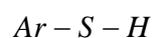
a) Tioles



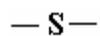
Los tioles son semejantes a los alcoholes y fenoles, excepto porque el oxígeno se ha reemplazado por azufre (S).



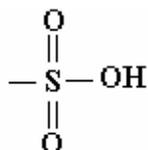
a.1 Tiofenoles



b) Tioéter



c) Ácido Sulfónico



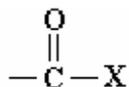
F. Grupos funcionales con halógenos

a) Halogenuro de Alquilo o de arilo



b) Halogenuro de Ácido (de Acilo)

Los halogenuros de acilo son los derivados más reactivos de los ácidos carboxílicos.



Apéndice 3

Frecuencias Características Raman

Esta información fue obtenida de D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley and J.G. Grasselli, "The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules", Academic Press, Boston, 1991.

Frecuencia (cm^{-1})	Vibración	Compuesto
0 – 500:		
178	Symmetric Cl_4 stretch	Cl_4 (solid)
160-200	Skeletal deformation	Aliphatic nitriles
267	Symmetric CBr_4 stretch	CBr_4 (liquid)
335-355	Skeletal deformation	Monoalkyl acetylenes
150-425	Chain expansion	n-Alkanes
437	Symmetric Cl_3 stretch	CHI_3 (in solution)
459	Symmetric CCl_4 stretch	CCl_4
483	Symmetric Cl_2 stretch	CH_2I_2
475-484	Skeletal deformation	Dialkyl diacetylenes
485-495	CI stretch, T_{HHH} conformation	Tertiary iodoalkanes
485-495	CI stretch, S_{HH} conformation	Secondary iodoalkanes
480-510	SS stretch	Dialkyl trisulfides
500 – 1000:		
500-510	CI stretch, P_{H} conformation	Primary iodoalkanes
510-520	CBr stretch, T_{HHH} conformation	Tertiary bromoalkanes
523	CI stretch	CH_3I
510-525	SS stretch	Dialkyl disulfides
539	Symmetric CBr_3 stretch	CHBr_3
535-540	CBr stretch, S_{HH} conformation	Secondary bromoalkanes

560-565	CBr stretch, P _H conformation	Primary bromoalkanes
560-570	CCl stretch, T _{HHH} conformation	Tertiary chloroalkanes
577	Symmetric CBr ₂ stretch	CH ₂ Br ₂
609	CBr stretch	CH ₃ Br
590-610	CI stretch, P _C conformation	Primary iodoalkanes
605-615	CCl stretch, S _{HH} conformation	Secondary chloroalkanes
615-630	Ring deformation	Monosubstituted benzenes
640-655	CBr stretch, P _C conformation	Primary bromoalkanes
659	Symmetric CSC stretch	Pentamethylene sulfide
650-660	CCl stretch, P _H conformation	Primary chloroalkanes
668	Symmetric CCl ₃ stretch	CHCl ₃
688	Ring breathing	Tetrahydrothiophene
650-690	Pseudosymmetric N=C=S stretch	Alkyl isothiocyanates
703	Ring breathing	Cyclooctane
703	Symmetric CCl ₂ stretch	CH ₂ Cl ₂
709	CCl stretch	CH ₃ Cl
620-715	CS stretch (1 or more bands)	Dialkyl disulfides
720-730	CCl stretch, P _C conformation	Primary chloroalkanes
733	Ring breathing	Cycloheptane
690-735	C=S stretch	Thioamides, thioureas (solid)
585-740	CS stretch (1 or more bands)	Alkyl sulfides
650-760	Symmetric skeletal stretch	tert-Butyl group
730-760	C ₄ O skeletal stretch	Tertiary alcohols
700-785	Ring vibration	Alkyl cyclohexanes
802	Ring breathing	Cyclohexane (chair form)
815	Ring breathing	Piperidine
818	Ring breathing	Tetrahydropyran
820-825	C ₃ O skeletal stretch	Secondary alcohols
720-830	Ring breathing	Para-disubstituted benzenes
832	Ring breathing	Morpholine
832	Ring breathing	Thiophene
834	Ring breathing	1,4-Dioxane
749-835	Skeletal stretch	Isopropyl group
836	Ring breathing	Piperazine
840-851	Pseudosymmetric CON stretch	O-Alkyl hydroxylamines
866	Ring breathing	Cyclopentane
877	OO stretch	Hydrogen peroxide
899	Ring breathing	Pyrrolidine
850-900	Symmetric CNC stretch	Secondary amines
890-900	Ring breathing	Alkyl cyclopentanes
837-905	CC skeletal stretch	n-Alkanes
906	ON stretch	Hydroxylamine
914	Ring breathing	Tetrahydrofuran
830-930	Symmetric COC stretch	Aliphatic ethers
933	Ring breathing	Alkyl cyclobutanes

939	Ring breathing	1,3-Dioxolane
992	Ring breathing	Pyridine
992	Ring breathing	Benzene
985-1000	Trigonal ring breathing	2- and 4-Substituted pyridines
1000 – 1500:		
1001	Ring breathing	Cyclobutane
990-1010	Trigonal ring breathing	Mono-, meta- and 1,3,5-subst. benzenes
1026	Ring breathing	Trimethylene imine (azetidine)
1029	Ring breathing	Trimethylene oxide (oxetane)
1030	Trigonal ring breathing	Pyridine
1010-1030	Trigonal ring breathing	3-Substituted pyridines
1015-1030	In-plane CH deformation	Monosubstituted benzenes
990-1040	Ring vibration	Pyrazoles
1020-1060	Ring vibration	Ortho-disubstituted benzenes
1065	C=S stretch	Ethylene trithiocarbonate
1040-1070	S=O stretch (1 or 2 bands)	Aliphatic sulfoxides
1111	NN stretch	Hydrazine
1112	Ring breathing	Ethylene sulfide
1130	Pseudosymmetric C=C=O stretch	Ketene
1100-1130	Symmetric C=C=C stretch (2 bands)	Allenes
1140	Ring breathing	Furan
1144	Ring breathing	Pyrrole
1125-1145	Symmetric SO ₂ stretch	Dialkyl sulfones
950-1150	CC stretches	n-Alkanes
1165-1172	Symmetric SO ₂ stretch	Alkyl sulfonates
1188	Ring breathing	Cyclopropane
1188-1196	Symmetric SO ₂ stretch	Alkyl sulfates
1205	C ₆ H ₅ -C vibration	Alkyl benzenes
1212	Ring breathing	Ethylene imine (aziridine)
1200-1220	Ring vibration	Mono- and 1,2-dialkyl cyclopropanes
1200-1230	Ring vibration	Para-disubstituted benzenes
1266	Ring breathing	Ethylene oxide (oxirane)
1251-1270	In-plane CH deformation	cis-Dialkyl ethylenes
1276	Symmetric N=N=N stretch	CH ₃ N ₃
1240-1280	Ring stretch	Epoxy derivatives
1275-1282	Symmetric NO ₂ stretch	Alkyl nitrates
1280-1300	CC bridge bond	Biphenyls
1295-1305	CH ₂ in-phase twist	n-Alkanes
1175-1310	CH ₂ twist and rock	n-Alkanes
1250-1310	Amide III band	Secondary amides
1290-1314	In-plane CH deformation	trans-Dialkyl ethylenes
1320	Ring vibration	1,1-Dialkyl cyclopropanes
1330-1350	CH deformation	Isopropyl group
1345-1355	Symmetric NO ₂ stretch	Tertiary nitroalkanes

1360-1375	Symmetric NO ₂ stretch	Secondary nitroalkanes
1368-1385	CH ₃ symmetric deformation	n-Alkanes
1370-1390	Ring stretch	Naphthalenes
1380-1395	Symmetric NO ₂ stretch	Primary nitroalkanes
1385-1415	Ring stretch	Anthracenes
1400-1415	Symmetric CO ₂ ⁻ stretch	Dipolar and anionic α amino acids
1340-1440	Symmetric CO ₂ ⁻ stretch	Carboxylate ions (aqueous solution)
1442	N=N stretch	Azobenzene
1398-1443	Ring stretch	2-substituted thiophenes
1400-1450	Pseudosymmetric N=C=O stretch	Isocyanates
1465-1466	CH ₃ deformation	n-Alkanes
1446-1473	CH ₃ , CH ₂ deformations	n-Alkanes
1460-1480	Ring stretch	2-Furfurylidene or 2-furoyl group
1470-1480	OCH ₃ , OCH ₂ deformations	Aliphatic ethers
1500	Symmetric C=C stretch	Cyclopentadiene

1500 – 2000:

1490-1515	Ring stretch	2-Furfuryl group
1535-1545	Antisymmetric NO ₂ stretch	Tertiary nitroalkanes
1548	N=N stretch	1-Pyrazoline
1550-1555	Antisymmetric NO ₂ stretch	Secondary nitroalkanes
1550-1560	Antisymmetric NO ₂ stretch	Primary nitroalkanes
1566	C=C stretch	Cyclobutene
1573	N=N stretch	Azomethane (in solution)
1575	Symmetric C=C stretch	1,3-Cyclohexadiene
1465-1581	C=C stretch	Iodoalkenes
1547-1596	C=C stretch	Bromoalkenes
1614	C=C stretch	Cyclopentene
1571-1616	C=C stretch	Chloroalkenes
1540-1620	Three or more coupled C=C stretch	Polyenes
1623	C=C stretch	Ethylene (gas)
1550-1630	Ring stretches (doublet)	Benzene derivative
1622-1634	Antisymmetric NO ₂ stretch	Alkyl nitrates
1637	Symmetric C=C stretch	Isoprene
1638	C=O stretch	Ethylene dithiocarbonate
1647	C=C stretch	Cyclopropene
1638-1648	C=C stretch	H ₂ C=CHR
1640-1648	N=O stretch	Alkyl nitrites
1625-1649	C=C stretch	Allyl derivatives
1590-1650	NH ₂ scissors	Primary amines
1642-1652	C=N stretch	Thiosemicarbazones (solid)
1649-1654	Symmetric C=O stretch	Carboxylic acids
1656	C=C stretch	Cyclohexene, cycloheptene
1644-1658	C=C stretch	R ₂ C=CH ₂
1610-1660	C=N stretch	Hydrazones (solid)

1649-1660	C=N stretch	Aldoximes
1650-1660	Amide I band	Secondary amides
1654-1660	C=C stretch	cis-Dialkyl ethylenes
1636-1663	Symmetric C=N stretch	Aldazines, ketazines
1650-1665	C=N stretch	Semicarbazones (solid)
1652-1666	C=N stretch	Ketoximes
1630-1670	Amide I band	Tertiary amides
1655-1670	Conjugated C=O stretch	Uracil, cytosine and guanine derivativ
1672	Symmetric C=O stretch	Formic acid (aqueous solution)
1666-1673	C=N stretch	Aldimines
1675	Symmetric C=O stretch	Acetic acid
1665-1676	C=C stretch	trans-Dialkyl ethylenes
1664-1678	C=C stretch	Trialkyl ethylenes
1679	C=C stretch	Methylene cyclobutane
1665-1680	C=C stretch	Tetraalkyl ethylenes
1636-1686	Amide I band	Primary amides (solids)
1651-1687	C=C stretch	Alkylidene cyclopentanes
1644-1689	C=C stretch	Monofluoroalkenes
1695	Nonconjugated C=O stretch	Uracil derivatives (aqueous solution)
1694-1712	C=C stretch	R ₂ C=C ₂
1715-1720	C=O stretch	O-Alkyl formates
1700-1725	C=O stretch	Aliphatic ketones
1727-1734	C=O stretch	O-Alkyl propionates
1736	C=C stretch	Methylene cyclopropane
1714-1739	C=C stretch	C=CF ₂ derivatives
1720-1740	C=O stretch	Aliphatic aldehydes
1734-1741	C=O stretch	O-Alkyl acetates
1729-1743	C=O stretch	Cationic α amino acids (aq. solution)
1744	C=O stretch	Cyclopentanone
1730-1770	C=O stretch	Halogenated aldehydes
1782	C=O stretch	Cyclobutanone
1792	C=C stretch	F ₂ C=CFCH ₃
1795	C=O stretch	Ethylene carbonate
1800	C=C stretch	F ₂ C=CF ₂ (gas)
1799-1805	Symmetric C=O stretch	Noncyclic anhydrides
1807	C=O stretch	Phosgene
1788-1810	C=O stretch	Acid halides
1820	Symmetric C=O stretch	Acetic anhydride
1840-1870	Symmetric C=O stretch	Saturate 5-memb ring cyclic anhydrides
1958-1964	Antisymmetric C=C=C stretch	Allenes
1974	C \equiv C stretch	Acetylene (gas)
2000 – 2500:		
2049	Pseudoantisymmet C=C=O stretch	Ketene
2094	C \equiv N stretch	HCN

2104	Antisymmetric N=N=N stretch	CH ₃ N ₃
2140-2156	C≡N stretch	Alkyl thiocyanates
2100-2160	C≡C stretch	Alkyl acetylenes
2134-2161	N≡C stretch	Aliphatic isonitriles
2172	Symmetric C≡C-C≡C stretch	Diacetylene
2000-2220	C≡N stretch	Dialkyl cyanamides
2100-2220	Pseudoantisymmet N=C=S stretch	Alkyl isothiocyanates
2232-2251	C≡N stretch	Aliphatic nitriles
2259	C≡N stretch	Cyanamide
2251-2264	Symmetric C≡C-C≡C stretch	Alkyl diacetylenes
2250-2300	Pseudoantisymmet N=C=O stretch	Isocyanates
2231-2301	C≡C stretch (2 bands)	R-C≡C-R'
2233-2316	C≡C stretch (2 bands)	R-C≡C-CH ₃
2500 – 3000:		
2560-2590	SH stretch	Thiols
2700-2850	CHO group (2 bands)	Aliphatic aldehydes
2849-2861	Symmetric CH ₂ stretch	n-Alkanes
2883-2884	Symmetric CH ₃ stretch	n-Alkanes
2912-2929	Antisymmetric CH ₂ stretch	n-Alkanes
2965-2969	Antisymmetric CH ₃ stretch	n-Alkanes
2974-2986	Symmetric NH ₃ ⁺ stretch	Alkyl ammonium chlorides
2980-2990	Symmetric =CH ₂ stretch	C=CH ₂ derivatives
3000 – 3400:		
3026	Symmetric =CH ₂ stretch	Ethylene (gas)
3000-3040	CH stretch	C=CHR derivatives
3057	Aromatic CH stretch	Alkyl benzenes
3062	CH stretch	Benzene
3070-3095	Antisymmetric =CH ₂ stretch	C=CH ₂ derivatives
3000-3100	Aromatic CH stretch	Benzene derivatives
3020-3100	CH ₂ stretches	Cyclopropane
3103	Antisymmetric =CH ₂ stretch	Ethylene (gas)
3154-3175	Bonded NH stretch	Pyrazoles
3145-3190	Bonded symmetric NH ₂ stretch	Primary amides
3290-3310	Bonded NH stretch	Secondary amides
3250-3300	Bonded symmetric NH ₂ stretch	Primary amines
3300-3335	≡CH stretch	Alkyl acetylenes
3300-3350	Bonded NH stretch	Secondary amines
3325-3355	Bonded antisymmetric NH ₂ stretch	Primary amides
3374	CH stretch	Acetylene (gas)
3340-3380	Bonded OH stretch	Aliphatic alcohols
3330-3400	Bonded antisymmetric NH ₂ stretch	Primary amines

Apéndice 4

Técnicas Químicas de Análisis

La Cromatografía

Es la técnica para separar los componentes o solutos de una mezcla sobre la base de las cantidades relativas de cada soluto, distribuidos entre un fluido que se mueve, llamado la **fase móvil**, y una **fase estacionaria** adyacente. La fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. El movimiento cinético molecular continuamente intercambia las moléculas del soluto entre las dos fases. Sí, para un soluto en particular, la distribución favorece a la fase móvil, las moléculas gastarían la mayor parte de su tiempo migrando con el fluido, y podrían ser transportadas lejos de las otras moléculas que son mas retenidas por la fase estacionaria. En Internet existe abundante material sobre este tema [100-102].

Una mezcla de solutos es introducida en el sistema en una región confinada o estrecha (el origen), con lo cual las especies diferentes son transportadas a diferentes proporciones en la dirección del flujo del fluido. La fuerza conductora para la migración es el fluido en movimiento y la fuerza resistiva es la afinidad del soluto por la fase estacionaria; la combinación de esas fuerzas es lo que produce la separación.

La cromatografía es una de las varias técnicas de separación, definida como una "**migración diferencial**" desde una zona inicial estrecha. **La Electroforésis** es otro miembro de este grupo (sin que sea un método cromatográfico). En este caso, la fuerza conductora es un campo eléctrico, el cual ejerce diferentes fuerzas sobre los solutos de diferente carga iónica. La fuerza resistiva es la viscosidad del solvente que no fluye. La combinación de esas fuerzas da una movilidad iónica característica para cada soluto.

Tipos comunes de fases en las técnicas de separación

Técnica	Fase Móvil	Fase estacionaria
Cromatografía Gaseosa (GC)	Gas (helio, nitrógeno, ó Hidrógeno)	Líquidos viscosos como polietileno, glicol, ó polimetil siloxano. Sólidos adsorbentes como sílica, tamices moleculares, alúmina, y polímeros porosos. La fase es mantenida en una columna de vidrio, metal o de sílica fundida.
Cromatografía Líquida (HPLC)	Agua líquida ó solventes orgánicos tales como metanol, acetonitrilo, propanol, ó hexano.	Sílica sólida o un polímero como un polisacárido ó poliestireno mantenido en una columna hecha de vidrio ó acero inoxidable.
Electroforésis Capilar (CE)	Un electrolito ó una solución buffer	Columna capilar llenada con un bufer sometido a un alto voltaje que crea una migración de las especies cargadas.
Cromatografía de Fluido Supercrítico (SFC)	Dióxido de carbono en estado supercrítico; puede tener un modificador tal como metanol. Otras incluyen pentano, hexano, hexafluro de azufre e isopropanol.	Sílicas modificadas ó polímeros en columnas empacadas y polimetil siloxanos entre cruzados en columnas capilares.
Cromatografía Iónica (IC)	Soluciones acuosas de ácidos, bases o sales. Estas soluciones son algunas veces modificadas con solventes orgánicos miscibles con agua como acetonitrilo o metanol.	Resinas de intercambio de iones, sílica enlazada con cadenas alquílicas porosas y polímeros estirene-divinilbenceno.
Cromatografía Planar (Cromatografía en Capa Delgada, TLC)	Mezclas de solventes como hexano/acetona, cloroformo/ acetato de etilo, acetato de etilo - metanol, butanol/ ácido acético / agua ó metanol/acetonitrilo.	Capas de sílica gel pre recubierto, óxido de aluminio, celulosa, hojas plásticas o láminas de aluminio.

Tipos de muestras y rango de sensibilidad

Técnica	Tipo de Muestra	Rango de Sensibilidad
Cromatografía Gaseosa (GC): muy versátil, económica y ampliamente usada	Sólidos, líquidos, ó compuestos orgánicos gaseosos ó volátiles y gases permanentes inorgánicos	Partes por trillón ó nanogramos / litro hasta niveles de porcentaje ó g / l
Cromatografía Líquida (HPLC): usada en todo el mundo, una técnica analítica líder para aquellos componentes que no son fáciles de volatilizar	Compuestos orgánicos e inorgánicos, líquidos volátiles y no volátiles y compuestos biológicos, polímeros, compuestos térmicamente lábiles, pequeños iones y macromoléculas	Partes por billón ó microgramos / litro hasta de porcentaje ó g / l
Electroforesis Capilar (CE): análisis de biomoléculas, requiriendo solo nanolitros de muestra	Líquidos polares y compuestos no polares, algunos elementos, orgánicos no iónicos y iónicos, macromoléculas y compuestos quirales	Partes por billón ó microgramos / litro hasta de porcentaje ó g / l
Cromatografía de Fluido Supercrítico (SFC): puede hacer los tipos de análisis de la GC y la LC; instrumentación más bien compleja	Analitos sólidos, líquidos, ó gaseosos termolábiles y no volátiles como la mayoría de las muestras que se analizan por GC ó LC	Partes por trillón ó nanogramos / litro hasta niveles de porcentaje ó g / l
Cromatografía Iónica (IEC): facilita la separación de iones inorgánicos y iones orgánicos y especies ionizables	Líquidos inorgánicos, aniones ó cationes, ácidos orgánicos, aminas, amino ácidos, carbohidratos y ácidos nucleicos	Partes por billón ó microgramos / litro hasta de porcentaje ó g / l
Cromatografía Planar (TLC): simple, alternativa económica a la LC con el análisis simultáneo de un gran número de muestras	Igual que para la Cromatografía Líquida	Partes por billón ó microgramos / litro hasta escala preparativa
Fraccionamiento por Flujo de Campo (FFF): Una técnica emergente y prometedora	Igual que para la Cromatografía Líquida pero más con macromoléculas	Partes por billón ó microgramos / litro hasta de porcentaje ó g / l

Apéndice 5

Preparación de Muestras y Técnicas de Extracción

1) Introducción

El muestreo y el proceso de preparación de la muestra empiezan en el sitio de la recolección y se extienden hasta el paso de la medición.

La recolección apropiada de la muestra durante el proceso de muestreo (llamado muestreo primario), el transporte de esta muestra representativa desde el punto de la toma hasta el laboratorio analítico, la selección de la muestra (llamado muestreo secundario), y el método de preparación de la muestra usado para convertir la muestra en una forma apropiada para la etapa de la medición, pueden tener el mayor efecto sobre la exactitud total y la confiabilidad de los resultados que el proceso de medición mismo. Al respecto, varias técnicas han sido desarrolladas [54-61, 102].

2) Fines y Objetivos de la Preparación de Muestras

La preparación de muestras de una manera exitosa tiene un objetivo triple, principalmente, entregar los componentes de la muestra de interés: En solución; libres de interferencias desde los elementos de la matriz y a un nivel de concentración apropiado para la detección y la medición

3) Técnicas de Separación y Preconcentración en la Preparación de la Muestra

Existen tres aproximaciones básicas en la medición de un analito en la presencia de especies que interfieren, las cuales se encuentran en la matriz de la muestra:

- La primera, uno puede considerar una técnica analítica selectiva que pueda medir el analito directamente sin necesidad de aislarla.
- Una segunda aproximación (sin aislamiento del analito) es convertirla "in situ" en otra especie química. En esta aproximación, una reacción de derivación selectiva puede ser usada para transformar el analito cuantitativamente en una especie que pueda ser medida más fácilmente.
- Una tercera aproximación, es la remoción del analito desde la matriz por un proceso de extracción o separación

Esta última aproximación es la más usada. En ocasiones, para muestras extremadamente complejas, tales como fluidos biológicos o residuos sólidos, una separación inicial es llevada a cabo para simplificar o remover parte de la matriz. Este paso es llamado limpieza preliminar de muestra ("cleanup") y puede incluir uno o más procesos de separación.

A menudo, cuando el análisis incluye la medición de cantidades al nivel de trazas de una sustancia, es deseable aumentar la concentración del analito a un nivel donde este pueda ser medido más fácilmente. La concentración de un analito puede realizarse transfiriendo desde una fase de gran volumen a otra con un volumen más pequeño. Este paso de pre-concentración se realiza a menudo en serie con la preparación de la muestra.

4) Tipos de Muestras

Las matrices de muestras pueden ser clasificadas como orgánicas e inorgánicas. Las muestras biológicas se consideran como una clase de las muestras orgánicas.

Los analitos orgánicos son a menudo clasificados como volátiles, semivolátiles y no volátiles. La muestra inicial puede estar en varias formas: sólida, semisólida (incluyendo cremas, geles, suspensiones y coloides), líquida, o gaseosa. Por lo tanto, alguna forma de pre-tratamiento de la muestra es casi siempre requerida para aislar el analito de interés desde la matriz antes de que esta sea inyectada en un cromatógrafo o medida a través de algún instrumento espectroscópico.

Las siguientes tablas proveen una corta descripción de algunas tecnologías para el análisis de muestras:

Métodos típicos de muestreo y pre-tratamiento para gases.

Método	Principio de la Técnica	Comentarios
Muestreo por Captura (Grab sampling)	La muestra gaseosa es empujada hacia un bulbo de vidrio o metálico o una lata evacuados por una jeringa.	Usado principalmente para compuestos volátiles en aire.
Captura en Fase Sólida (Solid Phase Trapping)	La muestra gaseosa es pasada a través de un tubo empacado con un adsorbente; los analitos atrapados son diluidos con un solvente fuerte.	Usado para compuestos orgánicos semivolátiles en aire. Los absorbentes más populares incluyen silica gel, alúmina, polímeros o carbón activado.
Captura en Líquido (Liquid trapping)	La muestra gaseosa es burbujeada a través de una solución que sea un buen solvente para los analitos; los analitos tienen una mayor afinidad por el solvente.	La proporción de flujo debe ser lo suficientemente bajo para no crear espuma o aerosoles; agentes de acomplejamiento pueden ser adicionados para ayudar al solvente en la captura.
Muestreo Headspace (Headspace sampling)	La muestra (sólida o líquida) es colocada en un vial de vidrio cerrado y termostatizado hasta que el equilibrio sea alcanzado. En el equilibrio, los analitos se particionan entre la fase de vapor y la fase sólida (o líquida) en una relación constante, después la fase de vapor es inyectada en el GC para el análisis.	Usada principalmente para la determinación de concentraciones al nivel de traza de sustancias volátiles en muestras difíciles de manejar por técnicas convencionales de GC. Algunas veces se adiciona agua u otro solvente para ayudar a la dispersión de la muestra o para liberar los compuestos orgánicos desde la matriz, especialmente para sólidos y sedimentos.
Purga y Trampa (Headspace dinámico) Purge and trap (dynamic HS)	La muestra es colocada en un contenedor cerrado y termostatizado, sus vapores en el headspace son removidos de manera continua por medio del flujo de un gas inerte con el subsecuente atrape de los componentes de la muestra por una fase sólida, los que luego son desorbidos térmicamente.	Usado cuando los analitos están en muy baja concentración o tienen un coeficiente de partición demasiado bajo para un muestreo por headspace estático; algunas veces llamado "captura en fase gaseosa" (gas phase stripping).
Extracción Térmica (Thermal extraction)	Una forma de HS dinámico, la muestra es calentada hasta temperaturas altas, por decir hasta 350 °C.	Usado para compuestos semivolátiles.

Métodos típicos de pre-tratamiento de muestras para líquidos y suspensiones

Método	Principios de la Técnica	Comentarios
Extracción en Fase Sólida Solid Phase Extraction (SPE)	El líquido es pasado a través de una fase sólida, la cual selectivamente remueve el analito; el analito es eluido con un solvente mas fuerte.	Están disponibles una gran variedad de fases estacionarias para la remoción selectiva de los compuestos orgánicos o inorgánicos y biológicos.
Micro Extracción en fase Sólida Solid Phase Microextracction (SPME)	La muestra (gaseosa o líquida) es puesta en contacto con una fibra, polisiloxano, en un recipiente cerrado y termostatzado, sobre la cual se establece un equilibrio.	Usado para compuestos volátiles y semivolátiles. Se deben estandarizar variables como el tiempo de exposición, la temperatura y el tiempo de desorción.
Extracción Líquido - Líquido (Liquid- liquid extraction)	La muestra es particionada entre dos fases inmiscibles escogidas de tal manera que maximicen las diferencias en solubilidad; se utiliza un embudo de separación para muestra pequeños.	Se pueden formar emulsiones; las cuales se pueden romper con calor, adición de sales, y filtración a través de papel de filtro.
Dilución (Dilution)	La muestra es diluida con un solvente que sea compatible con la técnica analítica de medición para evitar sobrecargar la columna cromatográfica o para estar dentro del rango lineal del detector o espectrofotómetro.	El solvente debería ser compatible con la técnica analítica de medición seleccionada; el solvente no debería ser demasiado fuerte para la condición de la fase móvil en la inyección en el HPLC, ya que se pueden causar ensanchamientos de banda o distorsiones como dobles picos.
Evaporación (Evaporation)	La muestra líquida es removida por calentamiento a presión atmosférica, con flujo de aire o gas inerte o bajo vacío.	No evapore demasiado rápido; la evaporación súbita puede hacer perder parte de la muestra; revise por perdida de muestra sobre las paredes del recipiente.
Destilación (Distillation)	La muestra es calentada hasta el punto de ebullición del solvente y los analitos volátiles son concentrados en la fase de vapor, luego condensados y colectados.	Principalmente para muestras que puedan ser volatilizadas; la muestra puede descomponerse si se calienta demasiado; la destilación al vacío puede ser usada para compuestos no volátiles.

Microdialisis (Microdialysis)	Una membrana semipermeable es colocada entre dos fases líquidas acuosas y los solutos de la muestra se transfieren de un líquido al otro basados en el diferencial de concentración.	Las técnicas de enriquecimiento son requeridas para concentrar el dializado; la microdiálisis es usada para analizar eventos químicos extra celulares en tejidos vivos
Liofilización (Lyophilization)	Las muestras acuosas son congeladas y el agua es removida bajo vacío por sublimación.	Muy bueno para orgánicos no volátiles; se pueden manejar grandes volúmenes de muestra; posible pérdida de analitos volátiles; los compuestos inorgánicos son concentrados.
Filtración (Filtration)	El líquido es pasado a través de un filtro de papel o de membrana para remover las partículas suspendidas.	Altamente recomendada para prevenir problemas de presión en HPLC y para preservar la vida de las columnas en cromatografía; asegúrese que los filtros de membrana sean compatibles con el solvente tal que no se disuelvan o se hinchen durante el experimento; use filtros de gran porosidad ($>2 \mu\text{m}$) para flujos máximos o filtros de menor porosidad ($<0.2 \mu\text{m}$) para evitar las bacterias.
Centrifugación (Centrifugation)	La muestra es colocada en un tubo de centrifuga y hecha rotar a una gran fuerza y forzada contra el fondo del tubo; el líquido es decantado.	La remoción cuantitativa de la muestra sólida desde el tubo presenta algunas veces problemas prácticos; la ultra centrifuga no se usa normalmente para la remoción de material simple.
Sedimentación (Sedimentation)	La muestra se deja sedimentar mientras no se perturba en un tanque de sedimentación; la proporción de asentamiento depende del radio de Stokes.	Es un proceso extremadamente lento, la recuperación manual de los diferentes tamaños de partículas depende de la proporción de sedimentación.

Métodos de Extracción Tradicionales para muestras sólidas

Método	Principios de la Técnica	Comentarios
Extracción Sólido Líquido (Solid-liquid extraction)	La muestra es colocada en un recipiente con tapa, se añade un solvente que disuelva el analito de interés; la solución es separada desde el sólido por filtración (algunas veces llamado el método del agitador / filtro).	El solvente es usualmente calentado a ebullición para mejorar la solubilidad; la muestra está en un estado finamente dividida. La muestra es filtrada, decantada o centrifugada para separarlo desde los sólidos insolubles.
Extracción Soxhlet (Soxhlet extraction)	La muestra es colocada en un recipiente como un dedal poroso desechable; el solvente es constantemente refluído a través del dedal y percola para extraer los analitos, los cuales son continuamente recogidos en el balón de ebullición del solvente.	La extracción ocurre en solvente puro; la muestra debe ser estable en el punto de ebullición del solvente. El proceso es lento pero la extracción se lleva a cabo sin supervisión permanente hasta que se complete. Se comporta mejor con polvos que dejen fluir el solvente fácilmente, dan excelentes recuperaciones.
Homogenización (Homogenization)	La muestra es colocada en una licuadora a prueba de explosiones, se adiciona solvente y la muestra se homogeniza hasta un estado finamente dividido; el solvente es removido posteriormente para continuar el proceso de análisis.	Usado para plantas y tejidos animales, alimentos, muestras ambientales. Se pueden utilizar solventes acuosos u orgánicos; la adición de hielo seco o tierras diatomáceas ayudan a hacer la muestra más fluida. La muestra finamente dispersada promueve una extracción más eficiente.
Sonicación (Sonication)	La muestra finamente dividida es inmersa en un baño de ultrasonido con solvente y sometida a la radiación ultrasónica. También se pueden usar una sonda ultrasónica.	La disolución es ayudada por el proceso ultrasónico; se puede adicionar calor para una extracción adicional. El proceso es seguro y rápido; se comporta mejor con materiales gruesos y granulares.
Disolución (Dissolution)	La muestra es tratada con solvente y llevada directamente a solución con o sin cambio químico.	Los sólidos inorgánicos pueden requerir ácidos o bases para disolverse completamente; las muestras orgánicas pueden disolverse directamente en el solvente.

Métodos Modernos de Extracción para Muestras Sólidas

Método	Principio de la Técnica	Comentarios
Extracción con Solvente Acelerado (Accelerated (enhanced) solvent extraction (ASE or ESE))	La muestra es colocada en un recipiente sellado y calentada por encima de su punto de ebullición, la presión en el recipiente sube; la muestra es removida automáticamente y transferida a un vial para tratamiento posterior.	Se incrementa enormemente la velocidad para el proceso de extracción líquido-sólido y es automatizado. El recipiente debe resistir altas presiones; la muestra extraída en forma diluida requiere posterior concentración.
Extracción con Soxhlet Automatizado (Automated Soxhlet extraction)	Es una combinación de percolación con solvente en caliente y la extracción Soxhlet; la muestra es colocada en un dedal inmerso en el solvente en ebullición, luego el dedal es levantado para hacer a la extracción soxhlet.	Se encuentran disponibles las versiones manuales y automatizadas; usa menos solvente que el Soxhlet tradicional y el solvente es recuperado para un posible reutilización. El tiempo de la extracción es reducido debido al proceso en dos etapas.
Extracción con Fluido Supercrítico (Supercritical fluid extraction (SFE))	La muestra es colocada en un recipiente que permita el flujo y se hace pasar un fluido supercrítico (tal como CO ₂) a través de la muestra; después de la despresurización, el analito extraído es recogido en un solvente o atrapado sobre un adsorbente, seguido de una desorción con solvente.	Se encuentran disponibles las versiones manuales y automatizadas; para afectar la "polaridad" del fluido supercrítico la densidad debe ser variada y/o adicionar modificadores del solvente. La muestra recogida está usualmente concentrada y pura ya que el CO ₂ es removido después de la extracción.
Extracción Asistida por Microondas (Microwave-assisted extraction (MASE))	La muestra es colocada en un recipiente abierto o cerrado y calentado por energía de la radiación de microondas provocando la extracción de los analitos.	El solvente de extracción va desde el rango de los que absorben microondas hasta los que no absorban radiación de microondas; en el primer caso la muestra es colocada en un recipiente que no absorbe microondas a alta presión y calentada por encima de su punto de ebullición. En el segundo caso, el recipiente puede ser abierto, sin aumento de presión.

Apéndice 6

Unidades de Concentración

La concentración es la cantidad de soluto presente en una cantidad dada de solución o solvente. Antes de nombrar los tipos de unidades hay que revisar ciertas definiciones básicas, existe abundante información al respecto [103-105].

Masa molar

Es definido como la masa (en gramos o kilogramos) de 1 mol de unidades (tal como átomos o moléculas) de una sustancia. Si se conoce la masa atómica de un elemento, entonces se conoce su masa molar.

Ejemplo:

Masa atómica (Z) de Na es 22.99 uma, entonces, la masa molar es 22.99 gr

Masa atómica (Z) de P es 30.97 uma, entonces, la masa molar es 30.97 gr

Masa molecular (Weight Molecular – MW)

Es la suma de las masas atómicas (en uma) en la molécula. Sí se conoce las masas atómicas de los átomos componentes, entonces, se puede calcular la masa molecular de la molécula.

Ejemplo:

Masa molecular $C_6H_8O_6 = 6(12.01 \text{ uma}) + 8(1.008 \text{ uma}) + 6(16.00 \text{ uma}) = 176.12 \text{ gr}$.

Número de Avogadro

$$1 \text{ mol} = 6.0022045 \times 10^{23} \text{ partículas (átomos, moléculas, otros)}$$

Ejemplo: ¿Cuántos moles de soluto hay en 100 mg de soluto?

$$\text{moles de soluto} = 100 \text{ mg de soluto} * \frac{1 \text{ mol de soluto}}{\text{masa molar (o molecular) del soluto}} \quad (\text{A6-1})$$

o

$$\text{gramos de soluto} = \text{moles de soluto} * \frac{\text{masa molar (o molecular) del soluto}}{1 \text{ mol de soluto}} \quad (\text{A6-2})$$

Tipos de Unidades de Concentración

1. Porcentaje por masa: (Porcentaje por peso)

Es la proporción de la masa de un soluto a la masa de la solución (solvente + soluto), multiplicado por 100 %.

$$\text{Porcentaje de masa del soluto} = \frac{\text{masa del soluto}}{\text{masa del soluto} + \text{masa del solvente}} * 100\% \quad (\text{A6-3})$$

2. Fracción molar: (X)

Es una cantidad adimensional que expresa la proporción del número de moles de un componente al número de moles de todos los componentes presentes.

$$\text{fracción molar del componente A} = X_A = \frac{\text{moles del soluto}}{\text{suma de moles de los componentes}} \quad (\text{A6-4})$$

3. Molaridad: (M)

Molaridad o concentración molar, es el número de moles de soluto en 1 litro de solución (mol/L).

$$M = \frac{\text{moles del soluto}}{\text{litros de la solución}} \quad (\text{A6-5})$$

4. Molalidad: (m)

Es el número de moles de soluto disuelto en 1 kilogramo (1000 gr) de solvente (mol/Kg).

$$m = \frac{\text{moles del soluto}}{\text{masa del solvente}} \quad (\text{A6-6})$$

5. Partes por millón: (ppm = mg/L)

(partes por billón, ppb : μ g/L)

$$ppm = \frac{\text{mg de soluto}}{\text{litro de disolución}} \quad \text{o} \quad ppm = \frac{\text{gr de soluto}}{10^6 \text{ gr de disolución}} \quad (\text{A6-7})$$

Disoluciones

La disolución es el procedimiento para preparar una solución menos concentrada de otra más concentrada.

En el proceso de la disolución, es útil recordar que añadiendo más solvente a una cantidad dada de la solución almacenada, cambia (decrece) la concentración de la solución sin cambiar el número de moles del soluto presente en la solución.

moles del soluto antes de la disolución = moles del soluto despues de la disolución

$$M_i V_i = M_f V_f \quad (\text{A6-8})$$

donde M_i y M_f son las concentraciones inicial y final de la solución (molaridad), V_i y V_f son los volúmenes inicial y final de la solución.

Conversiones:

Desde:	a:	multiplicar por:
mg %	μ g %	1000
	mg/L	10
μ g %	mg %	0.001
	mg/L	0.01
g/L	mg/L	1000
Molar	mg/L	1000 * peso atómico
	ppm	1000 * peso atómico / ρ

(donde; ρ es la densidad o gravedad especifica de la solución.)

ppm	g/L	0.001 ρ
	mg/L	ρ
	Molar	$\rho / (1000 * \text{peso atómico})$
mg/L	mg %	0.1
	μ g %	100
	g/L	0.001
	ppm	1 / ρ
	Molar	1 / (1000 * peso atómico)

Apéndice 7

Espectros Raman de diversos compuestos

Los espectros Raman mostrados en este trabajo fueron obtenidos en el Laboratorio de Espectroscopia Raman del Centro de Investigaciones en Optica, A.C. – Unidad Aguascalientes. En estos espectros, algunos fueron obtenidos a través del vial de vidrio (organoclorados, aromáticos, solventes y muestras líquidas), otros fueron diluidos con metanol y luego, colocados sobre el sustrato de aluminio (organofosforados y bipyridilos) y las muestras sólidas fueron colocadas en forma directa al láser.

Se utilizó el sistema Raman en el cercano infrarrojo (830 nm). El ancho de la ranura del monocromador fue de 0.60 mm (resolución $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$) y el detector fue una cámara CCD, Rem Cam, enfriado termoeléctricamente a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. Dependiendo del tipo muestra a analizar, se utilizaron diferentes potencias del láser en las muestras, 160 – 1.6 mW; el tiempo de adquisición fue de 10 s. La línea base de la mayoría de los espectros fue corregida por el método de multipuntos y además, el sistema Raman fue calibrado en frecuencia a la línea Raman (520 cm^{-1}) del silicio.

1. Compuestos estándares:

a) Pesticidas organofosforados: analizados sobre sustrato de aluminio.

- azinfos metílico (99.0%)
- dursban (100%)
- fentión (100%)
- malatión (96.4%)

- monitor (100%)
- paratión metílico (98.1%)
- paratión etílico (98.0%)

b) Pesticidas organoclorados: analizados a través del vial.

- aldrín (98.0%)
- BHC (99.3%)
- clordano (mezcla de isómeros)
- DDD (98.5%)
- DDE (99.5%)
- DDT (99.7%)
- dieldrin (98.0%)
- heptacloro (99.5%)
- lindano (99.0%)
- metoxicloro (99.0%)

c) Pesticidas bipyridilos: analizados sobre sustrato de aluminio.

- diquat (99.0%)
- paraquat (100%)

d) Hidrocarburos Polinucleares Aromáticos: analizados a través del vial.

- acenafteno (neto)
- antraceno (neto)
- fenantreno (neto)
- fluoranteno (neto)
- fluoreno (neto)
- naftaleno (neto)
- pireno (neto)

2. Pesticidas comerciales:

a) Pesticidas carbamatos: analizados sobre substrato de aluminio.

- baygon (propoxur 2%)
- benlate (benomilo 50%)
- ficam (bendiocarb 76%)
- prozycar (carbendazim 50%)

b) Otros pesticidas: analizados sobre substrato de aluminio.

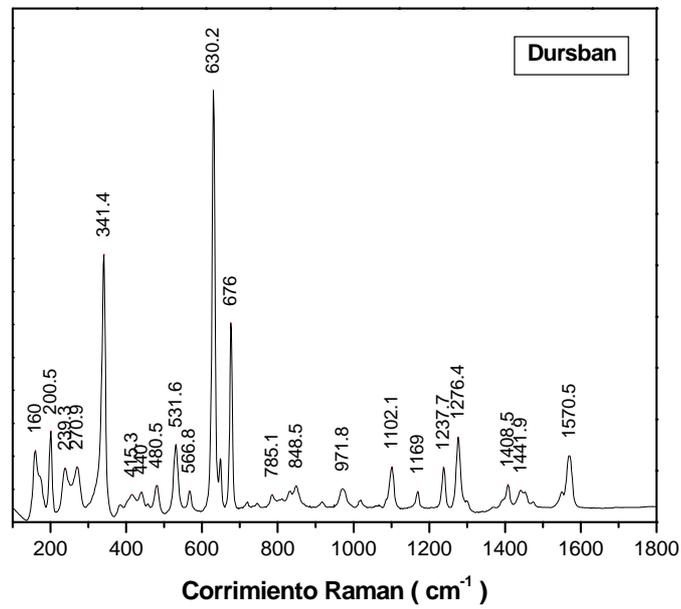
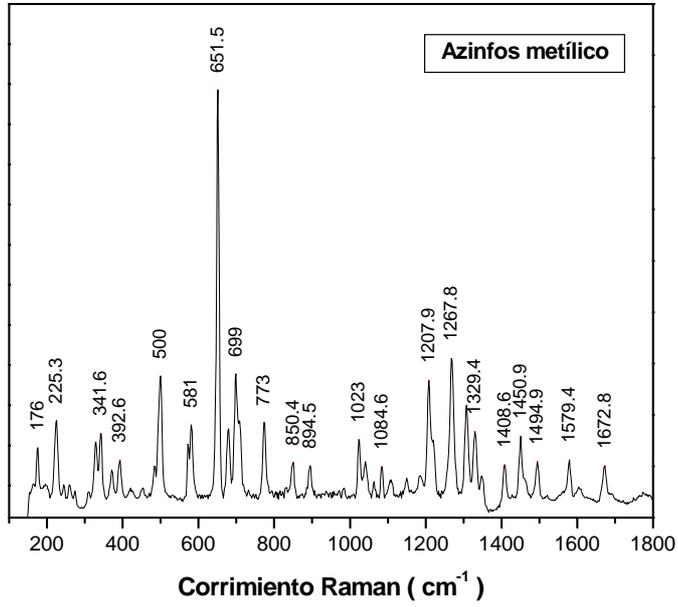
- esteron (ácido 2,4-D 79.8%)
- labor-30 (fosfometil 41.0%)
- person (permetrina 5.0%)

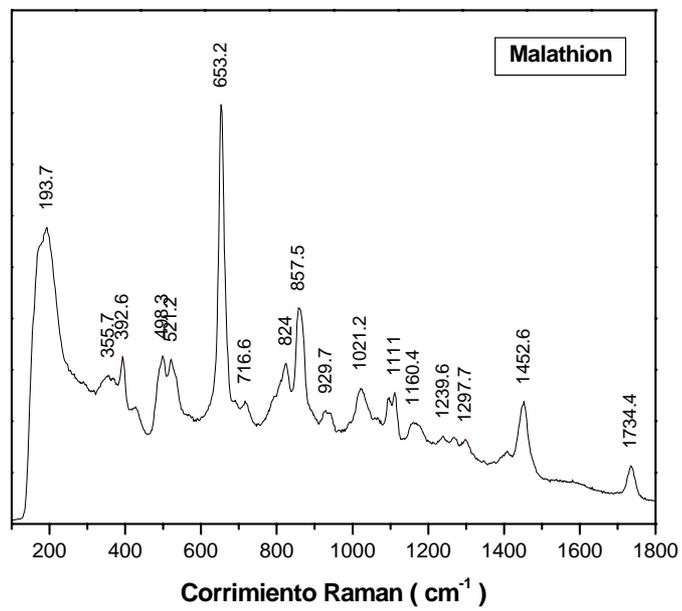
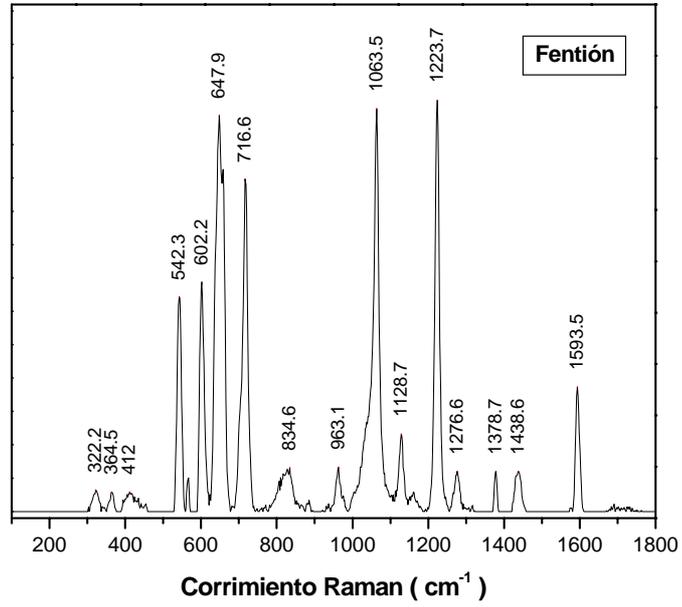
3. Solventes típico: analizados a través del vial.

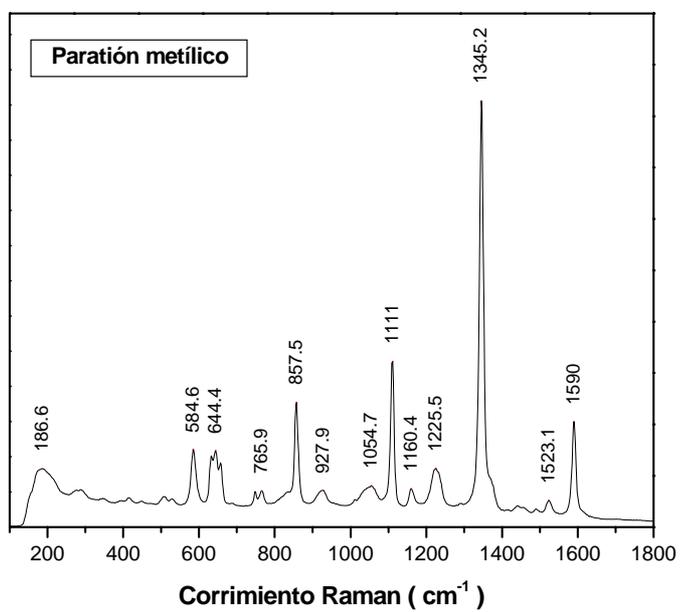
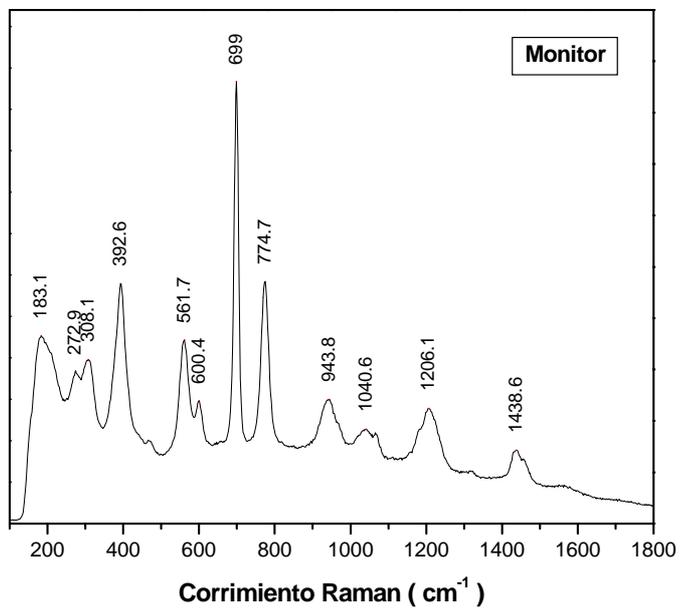
- agua
- alcohol metílico
- alcohol etílico
- alcohol isopropílico
- acetona
- ciclohexano
- hexano
- tolueno
- xileno

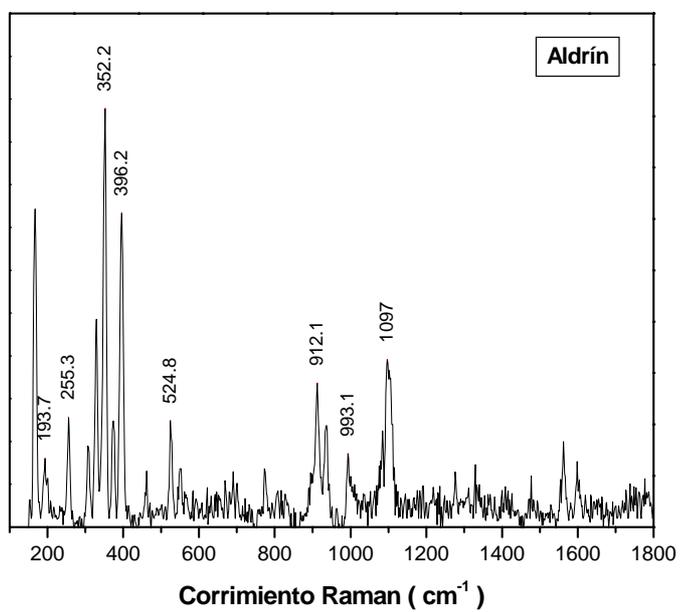
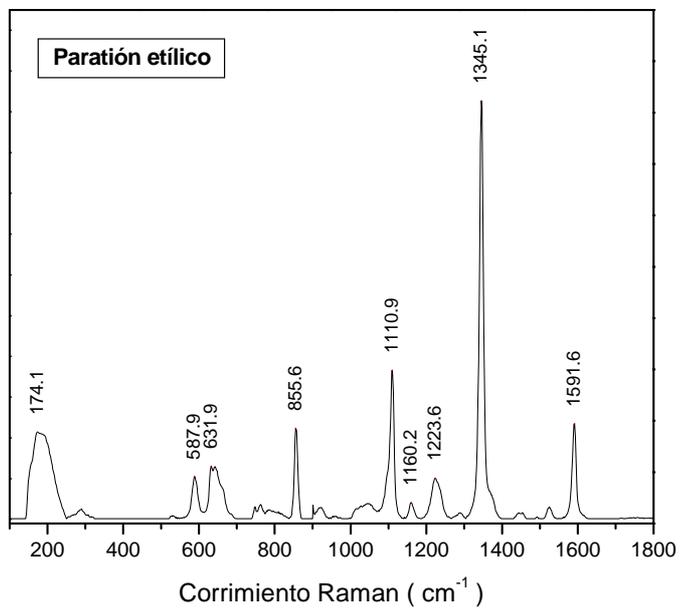
4. Otros compuestos: analizados sobre sustrato de aluminio (sólidos) y a través del vial (líquidos).

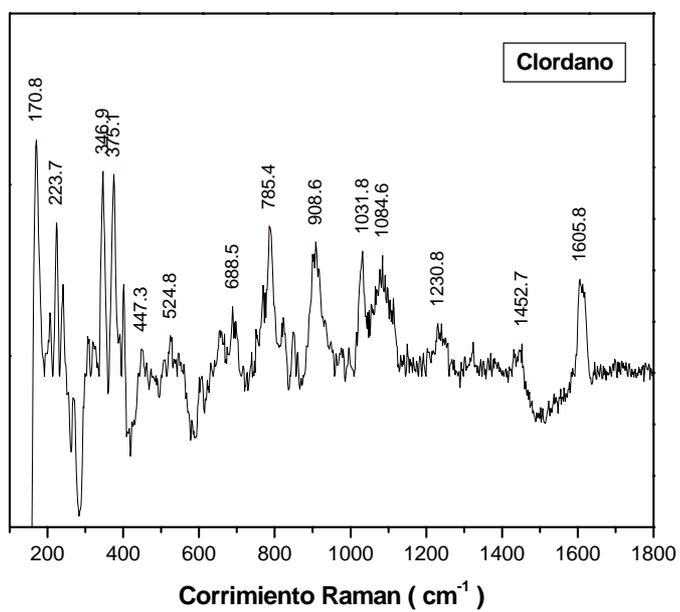
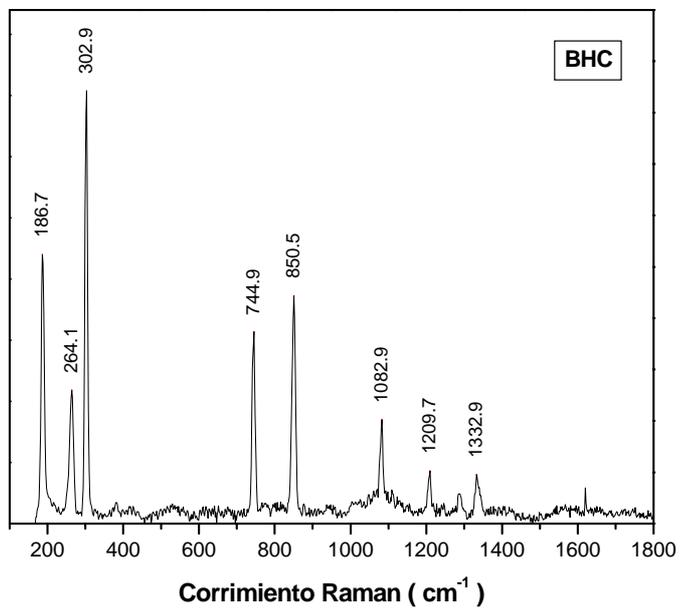
- aceite de silicio
- ácido benzoico
- ácido nítrico
- ácido fólico
- coumarin 35
- fenol
- glicerina
- glucosa
- rodamina B
- rodamina 6G
- tiamina (vitamina B1)
- riboflavina (vitamina B2)
- piridoxina (vitamina B6)

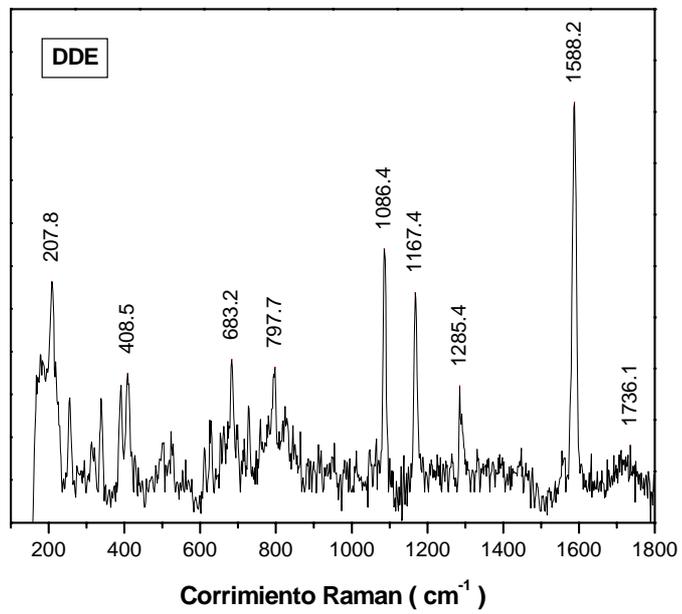
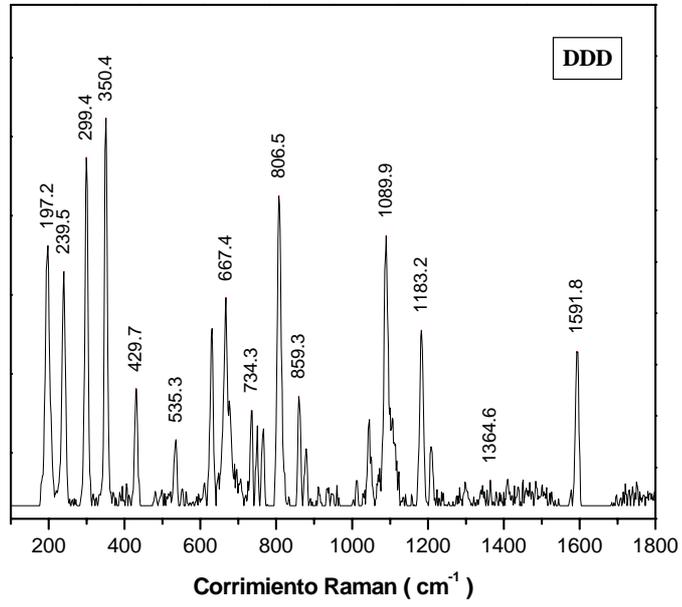


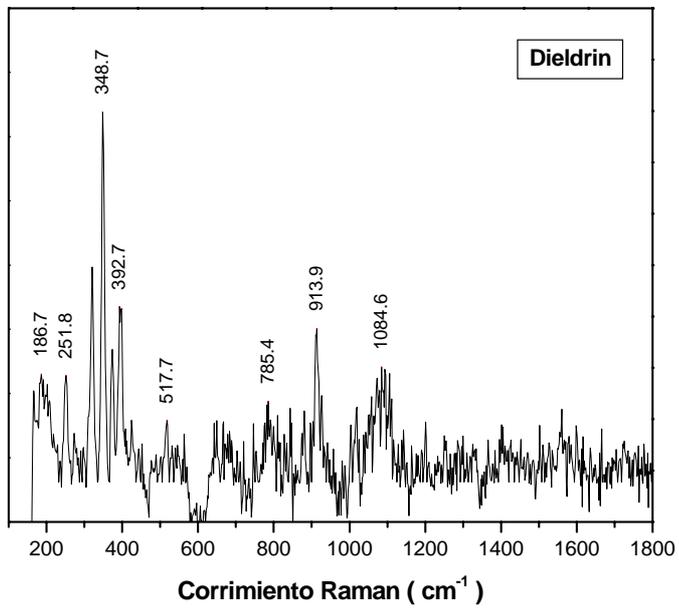
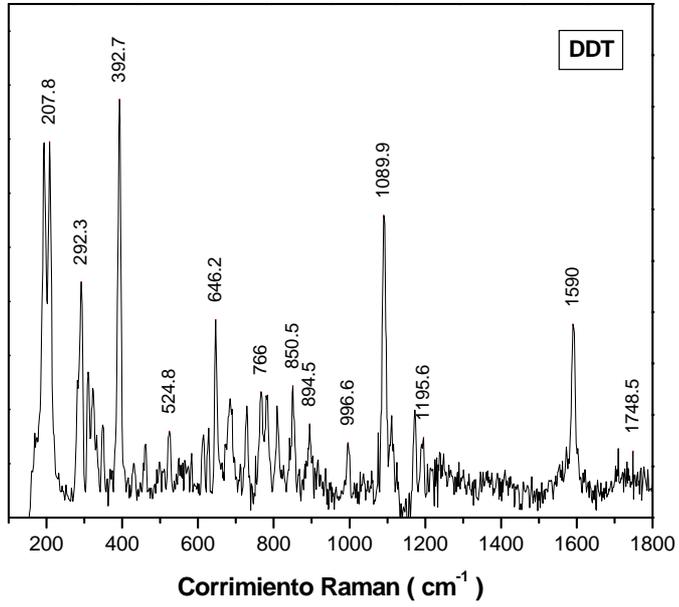


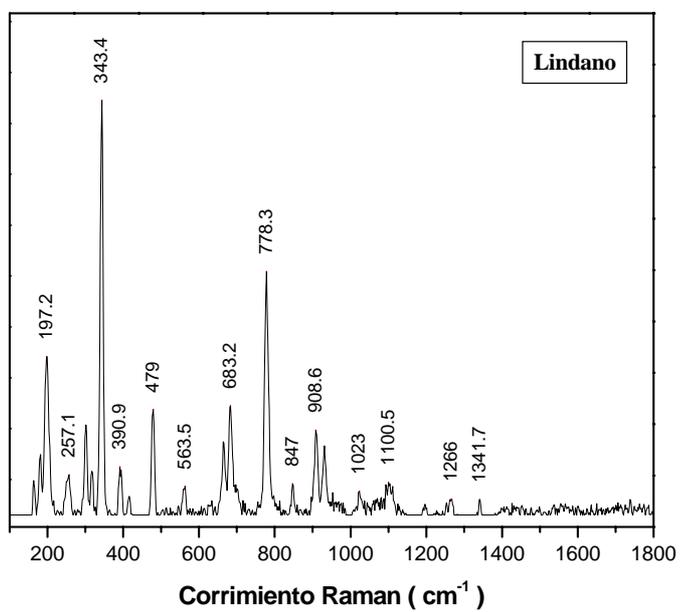
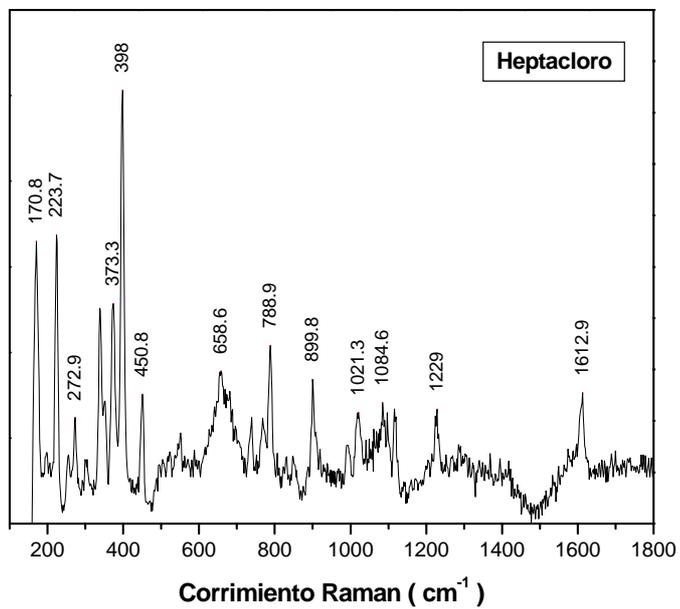


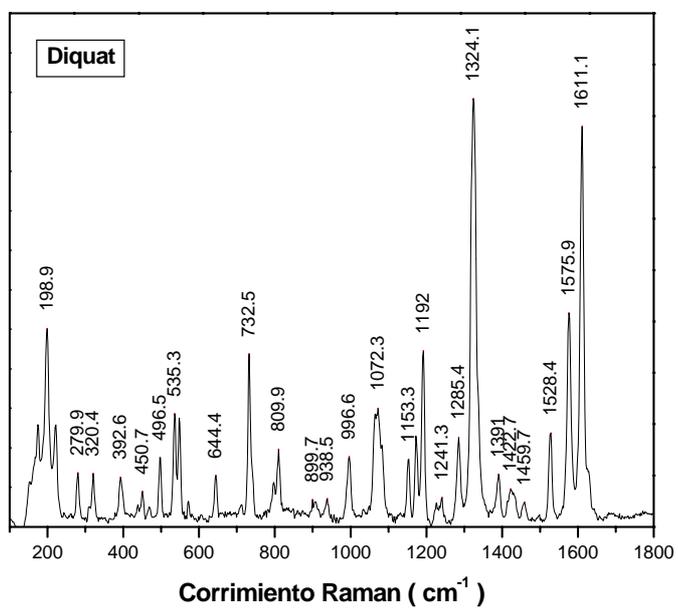
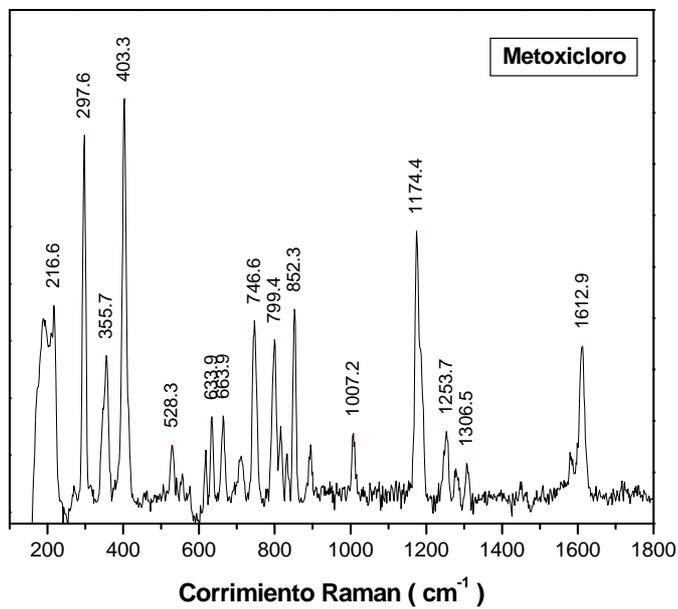


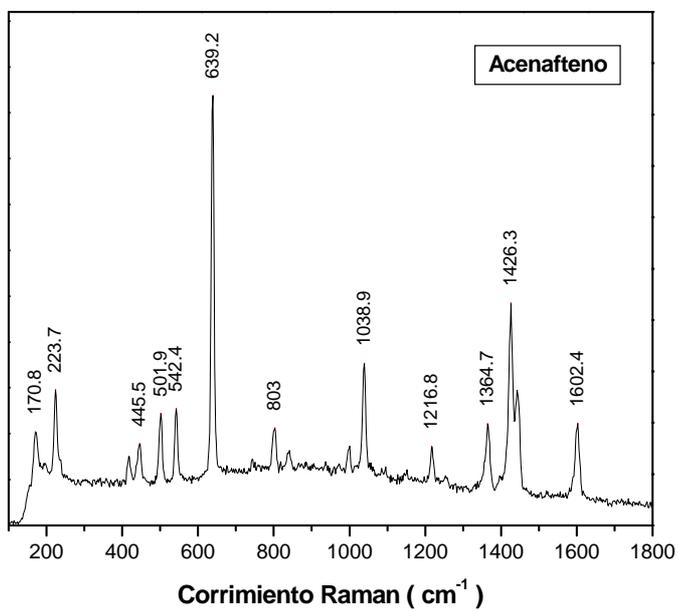
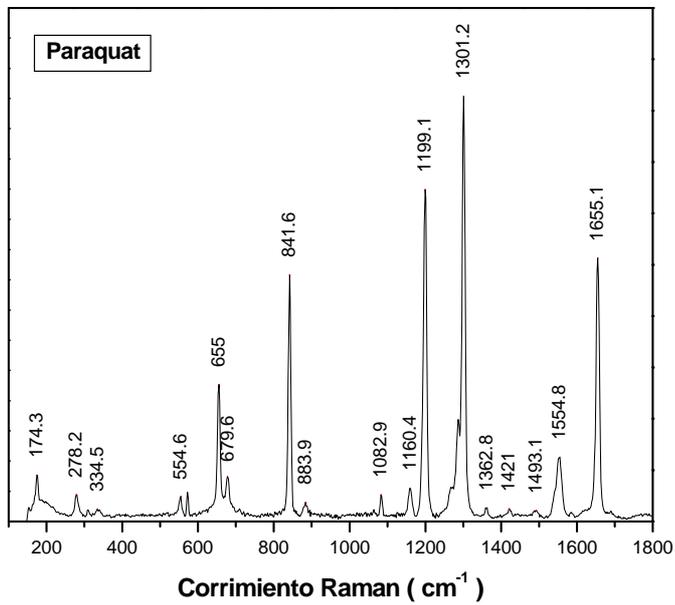


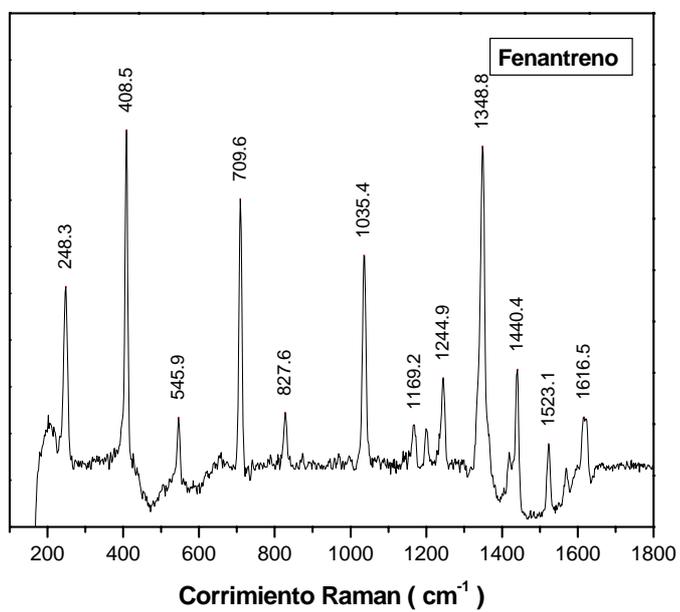
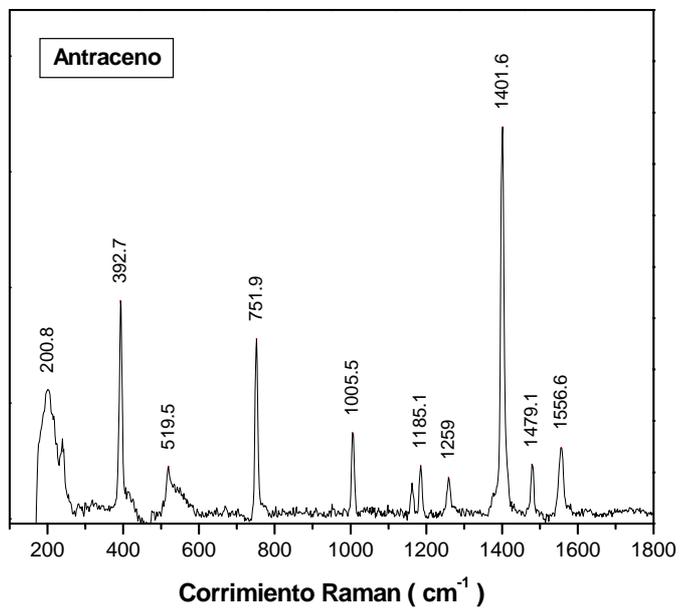


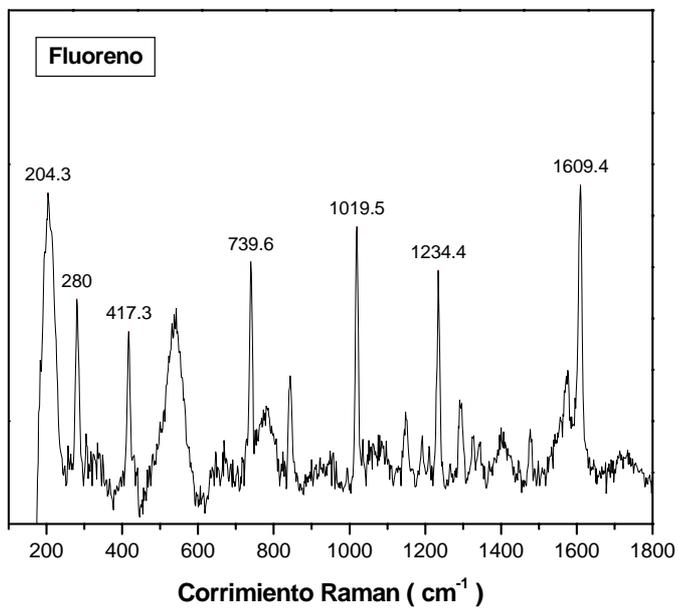
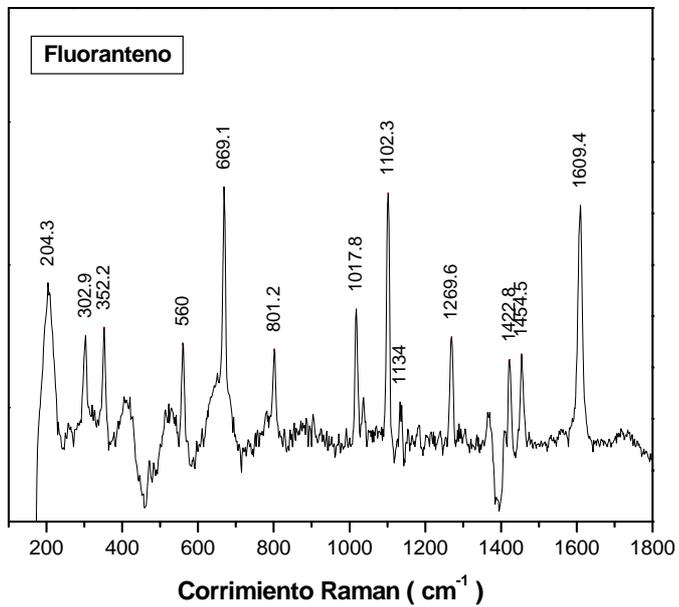


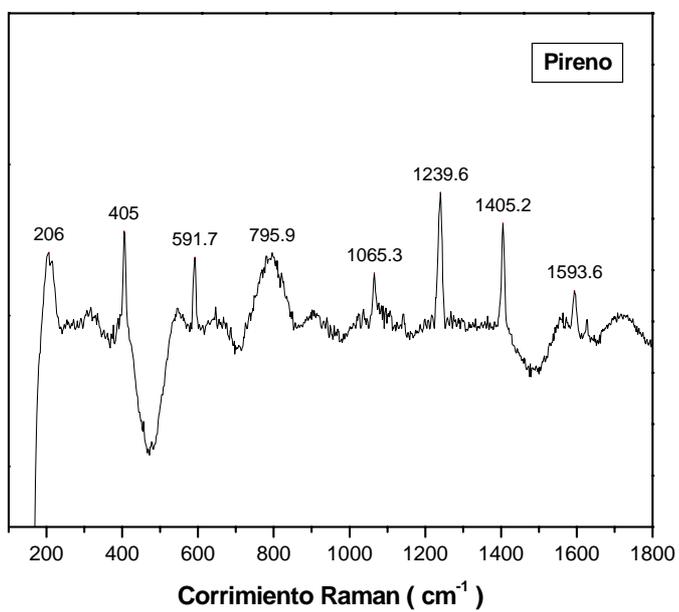
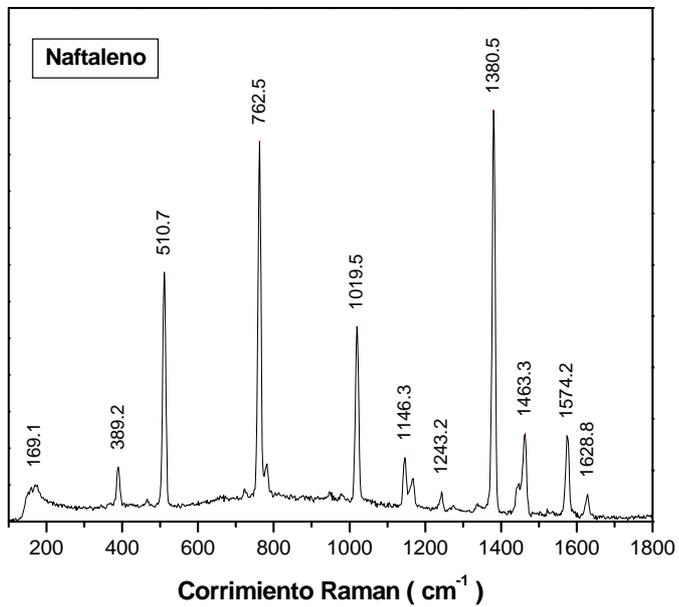


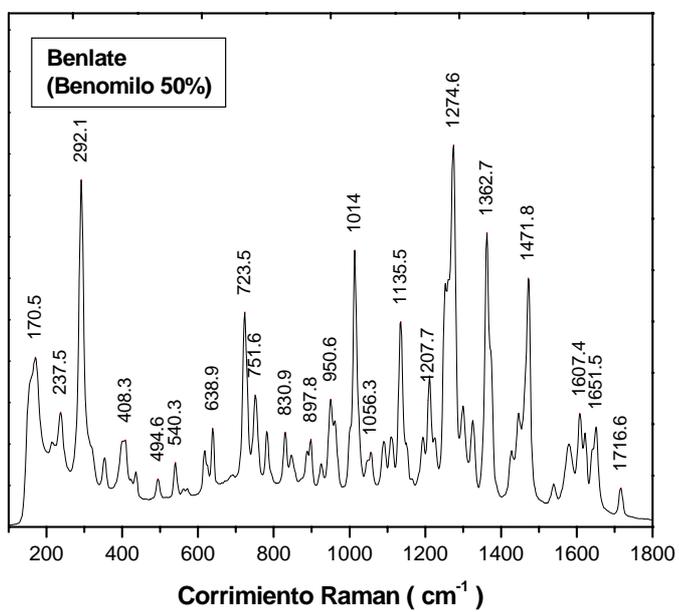
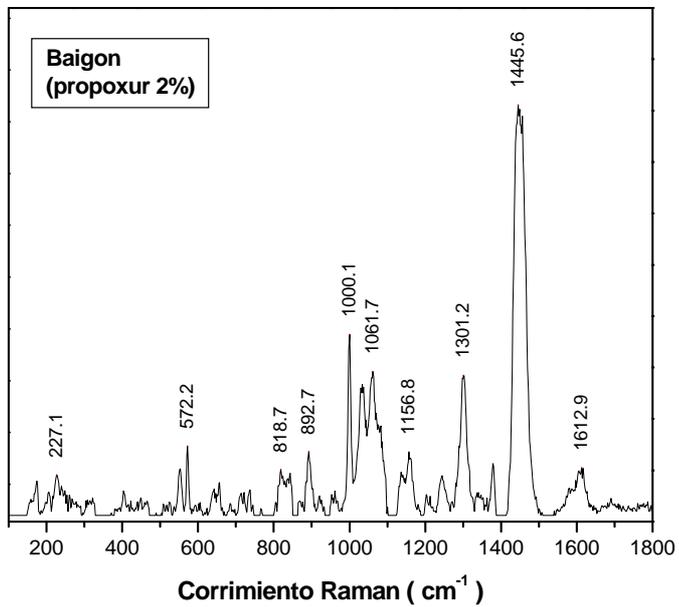


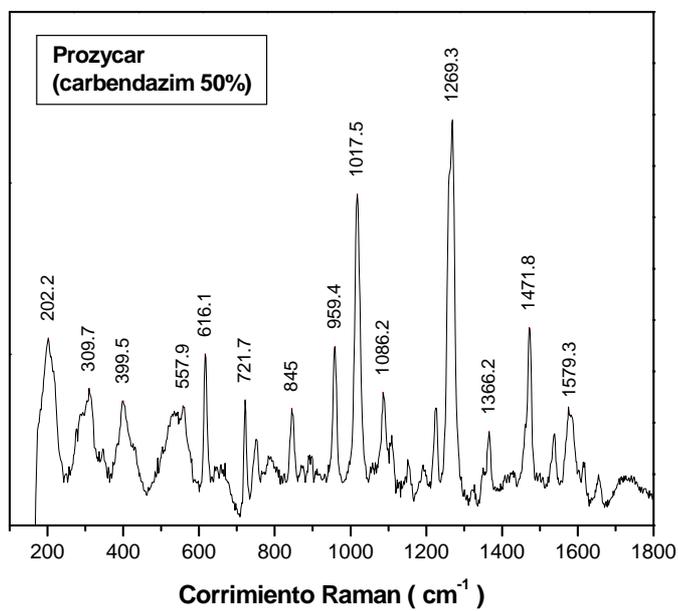
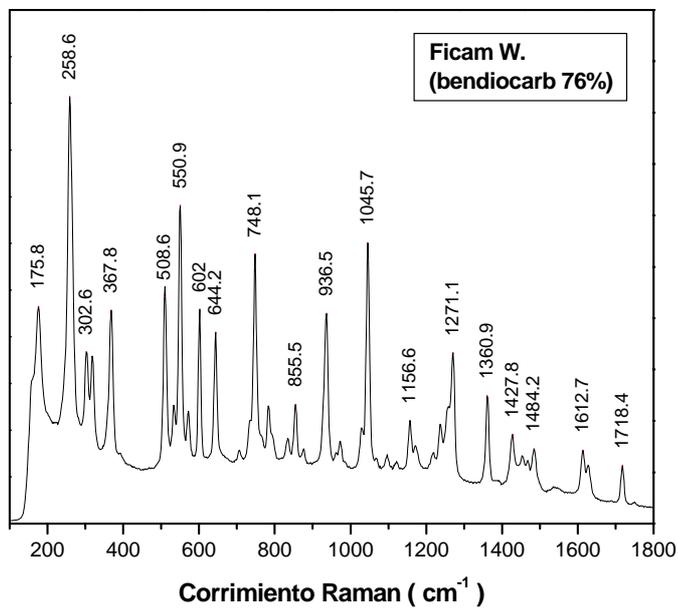


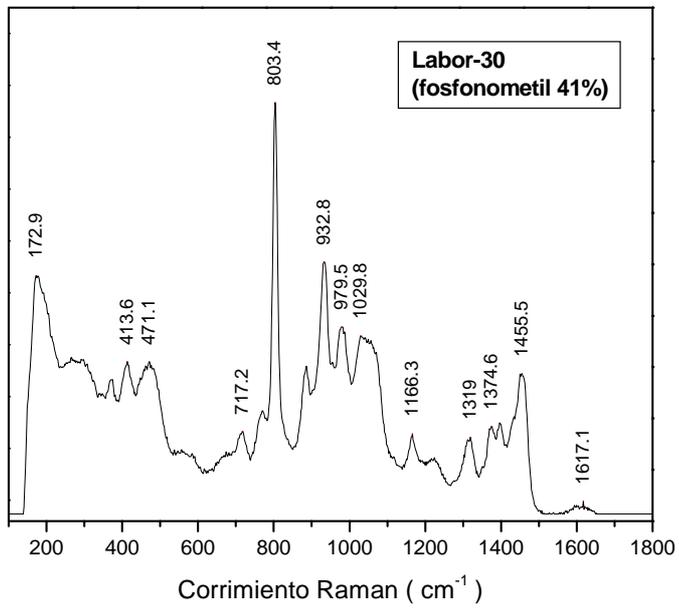
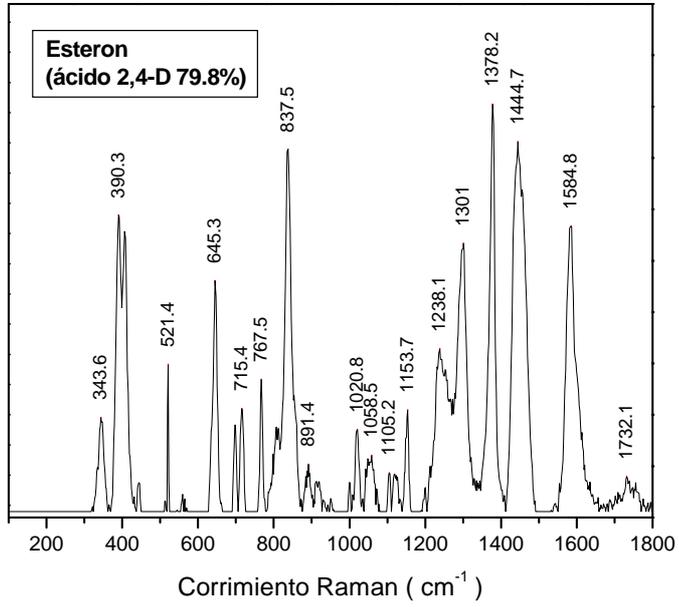


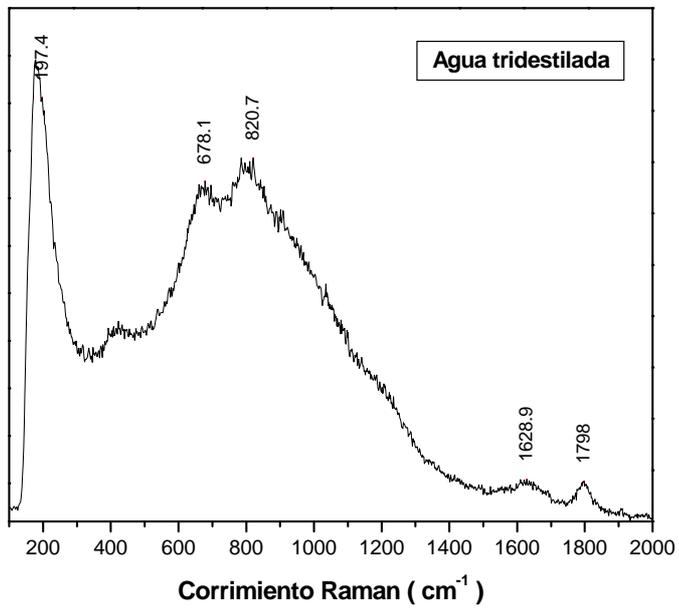
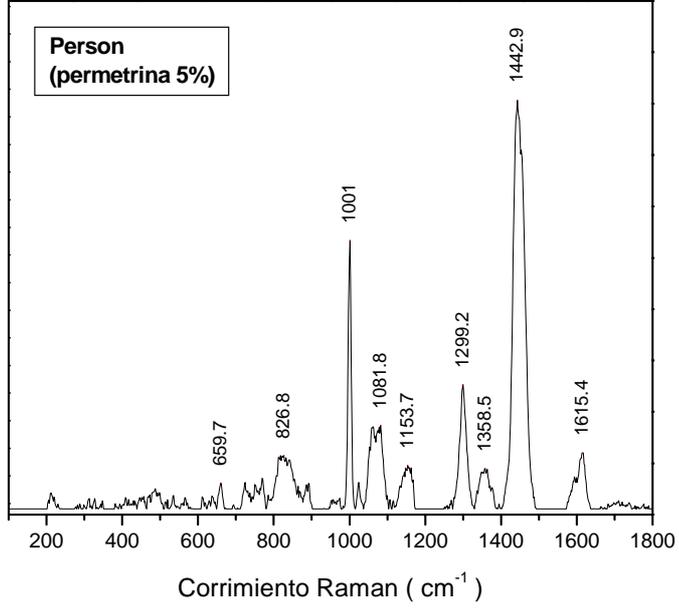


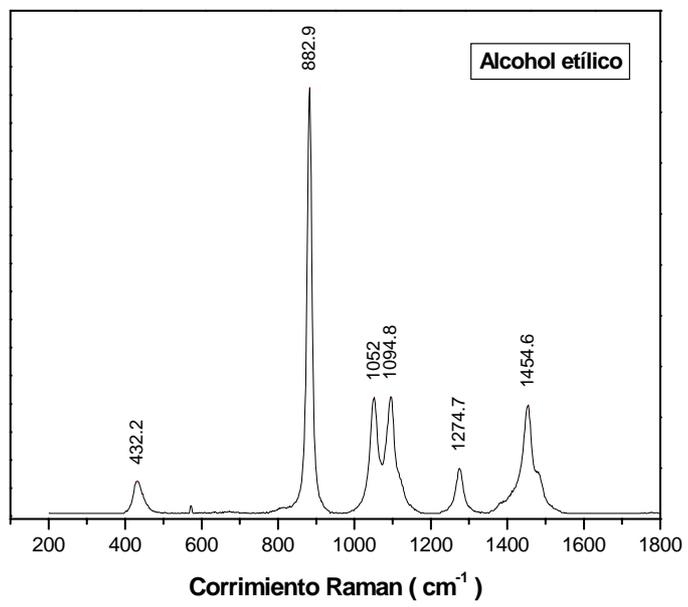
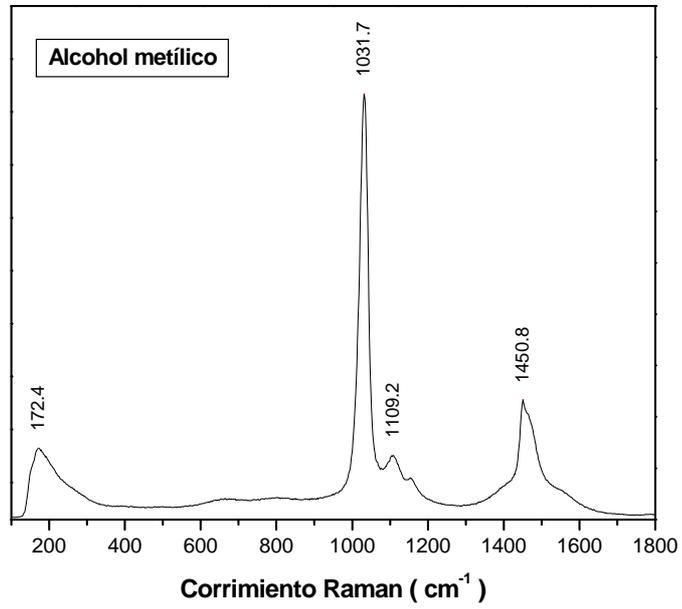


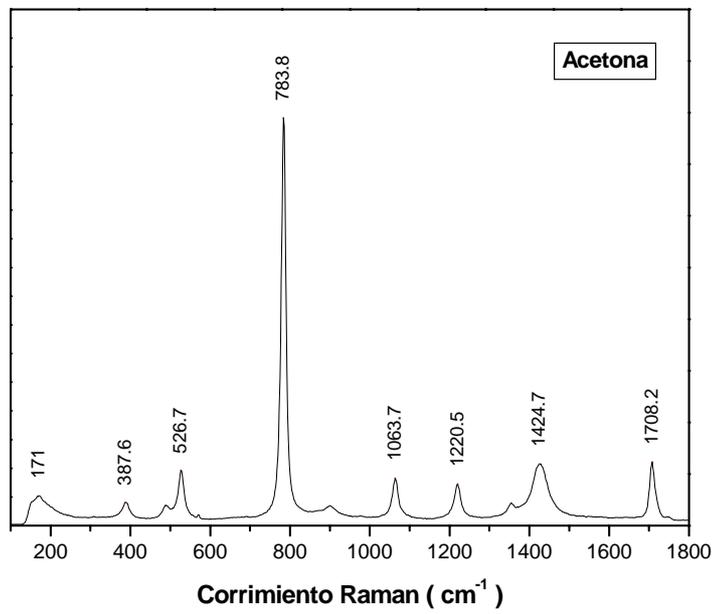
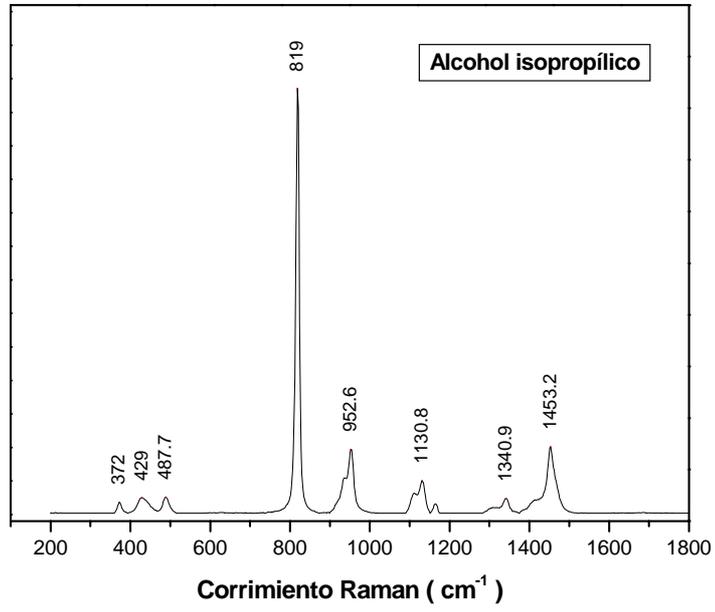


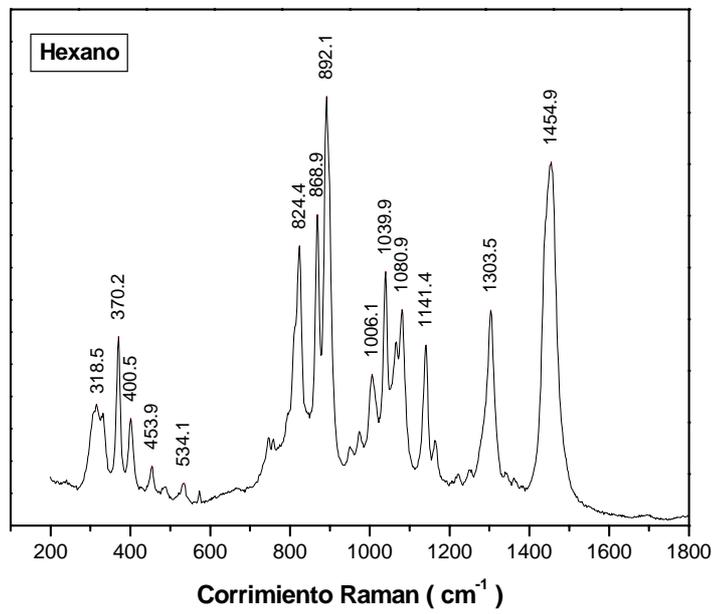
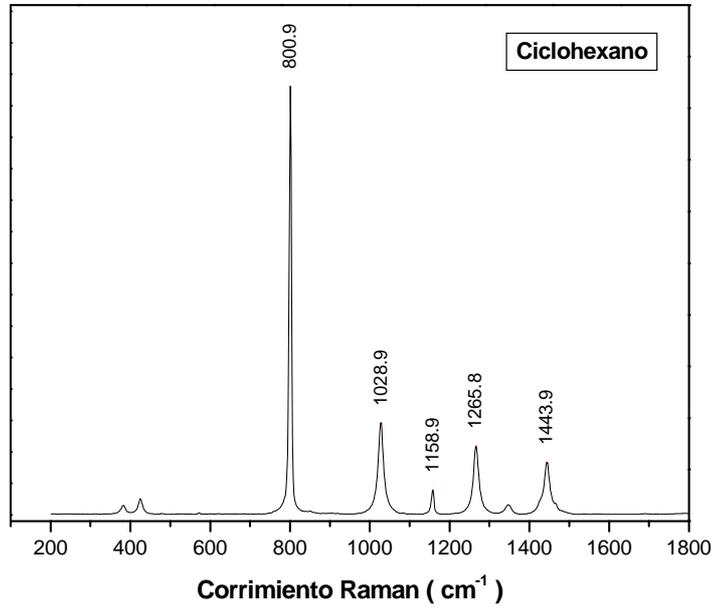


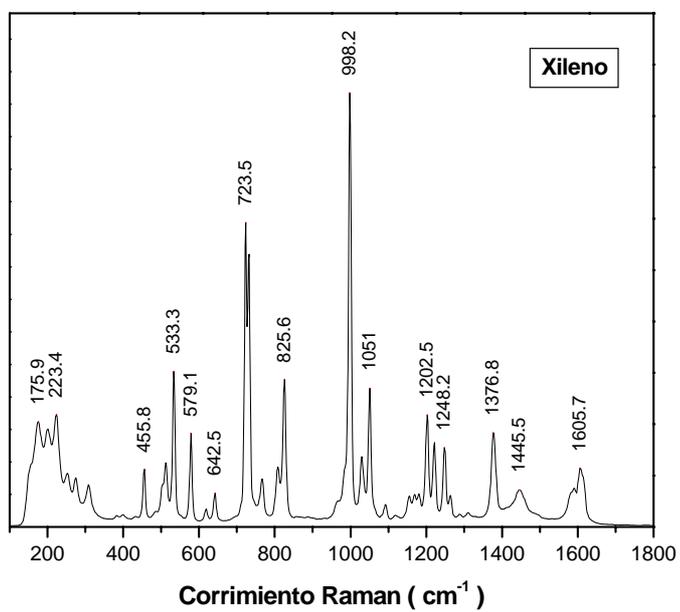
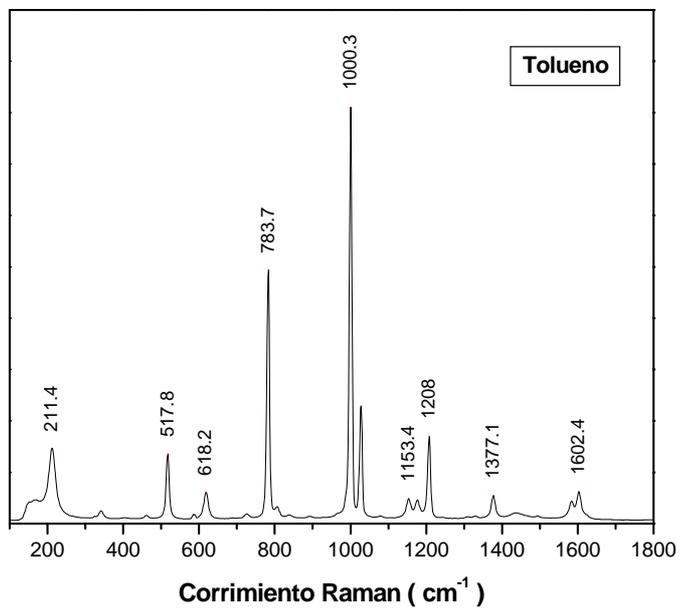


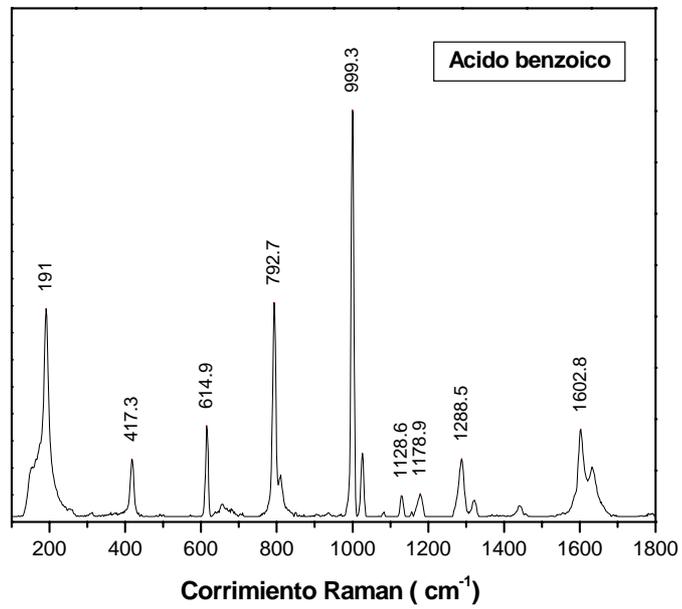
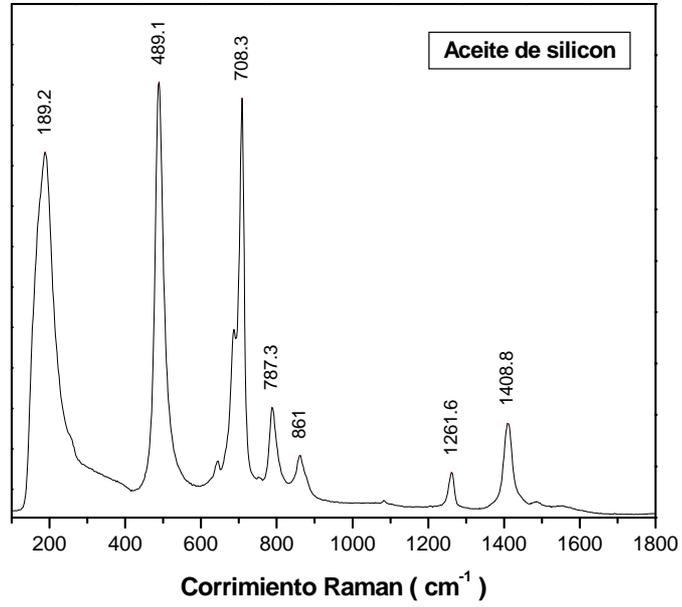


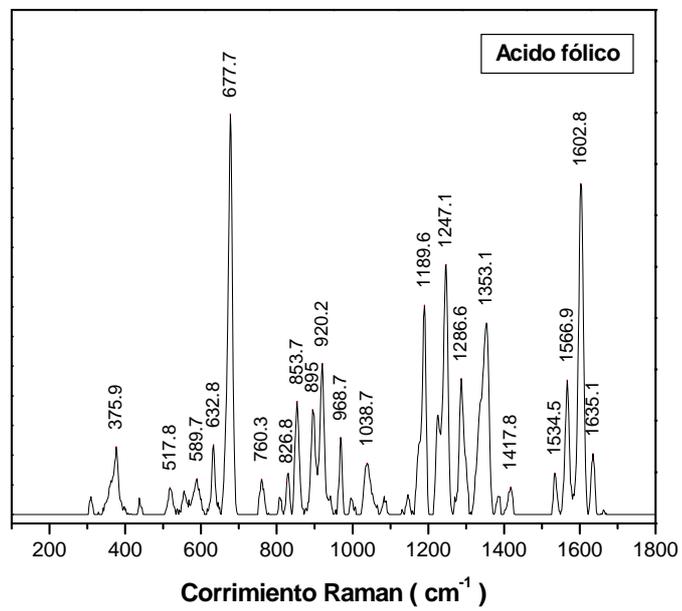
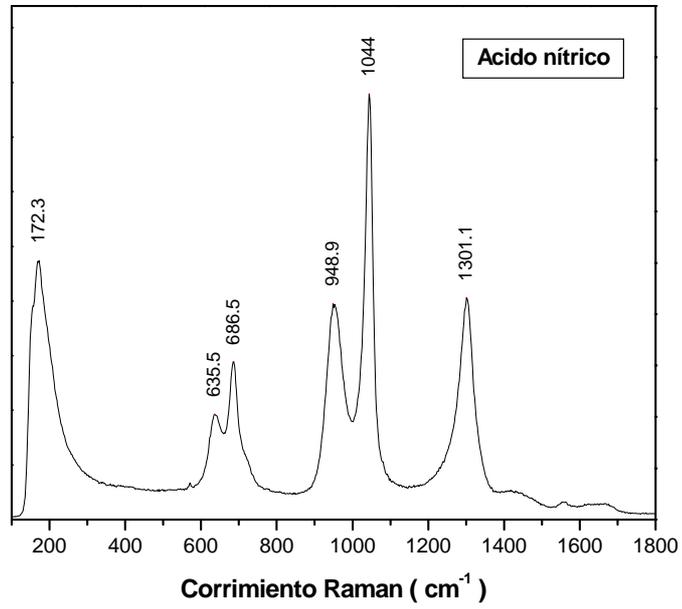


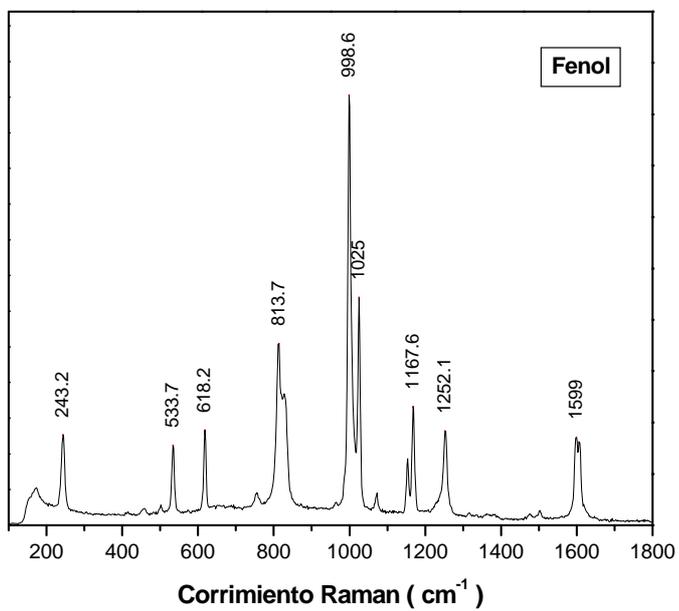
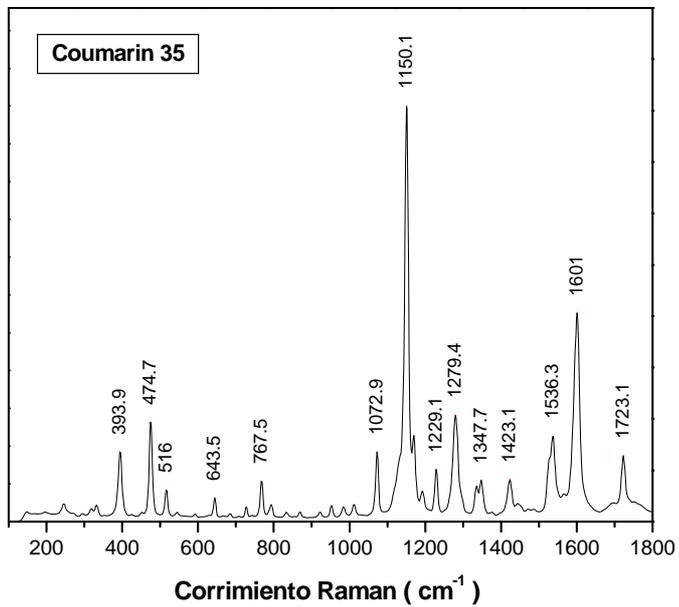


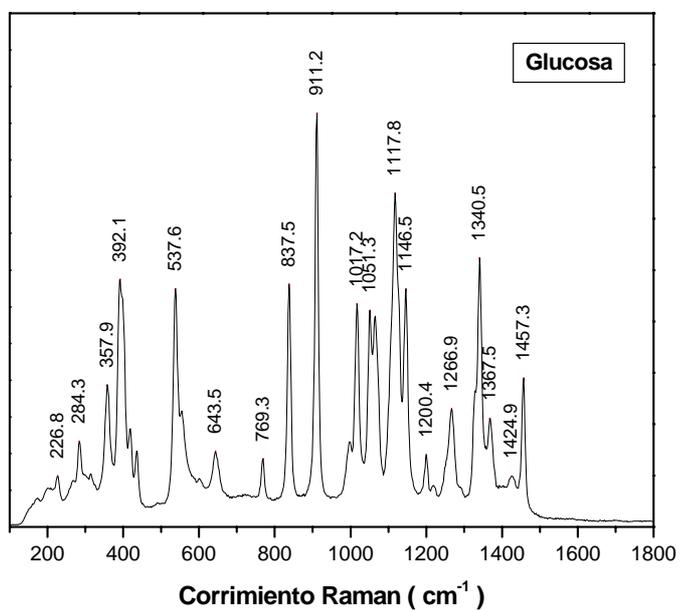
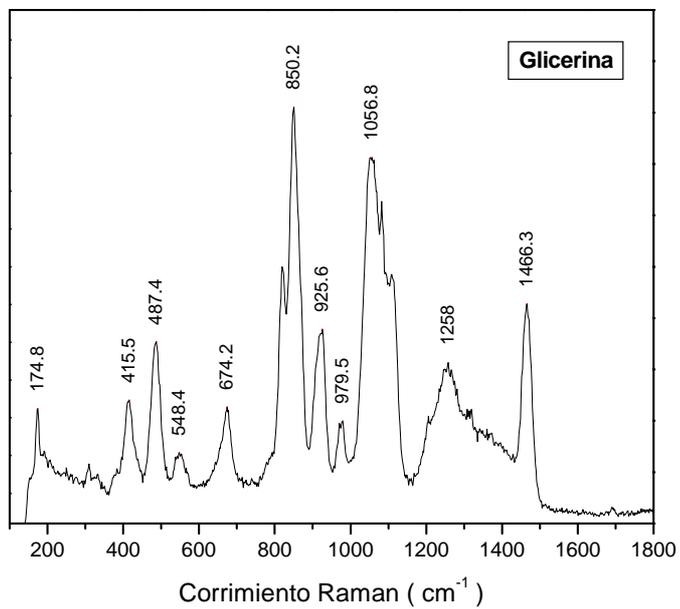


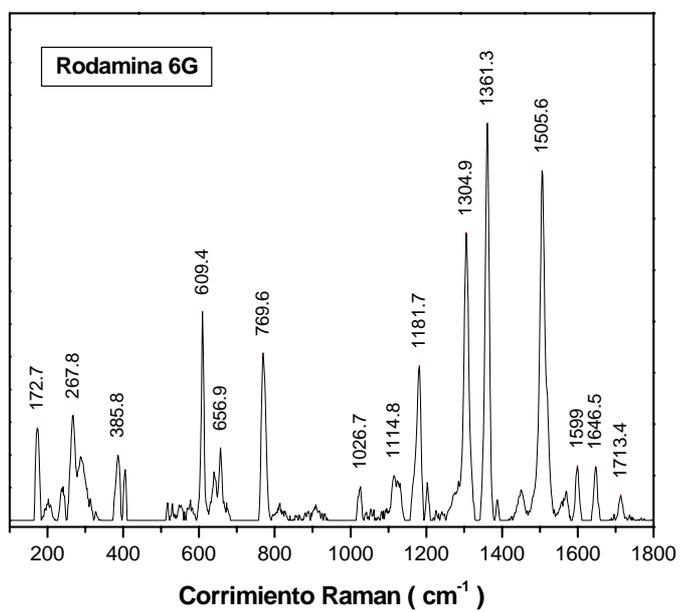
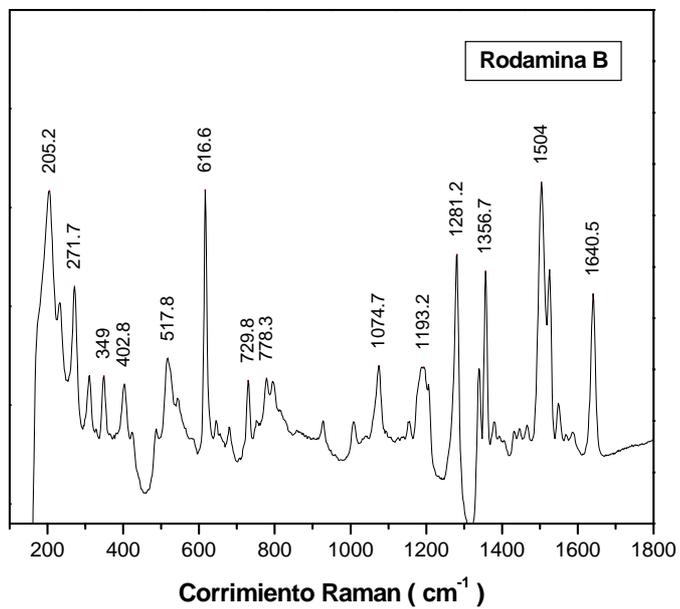


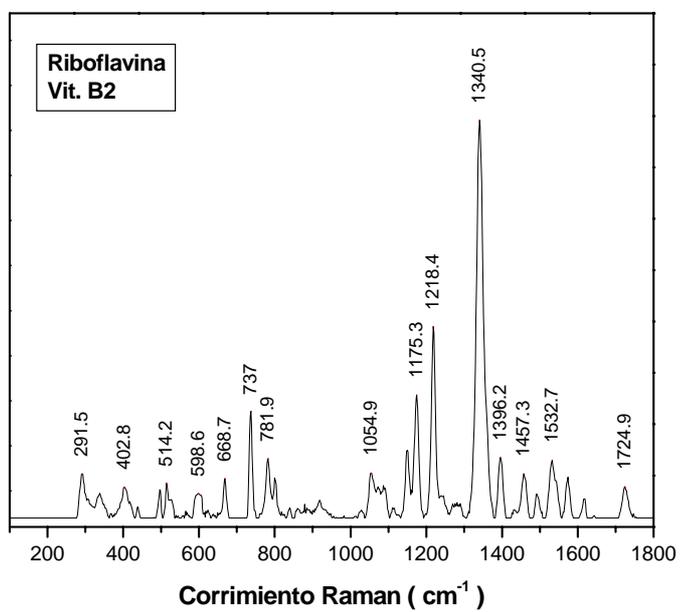
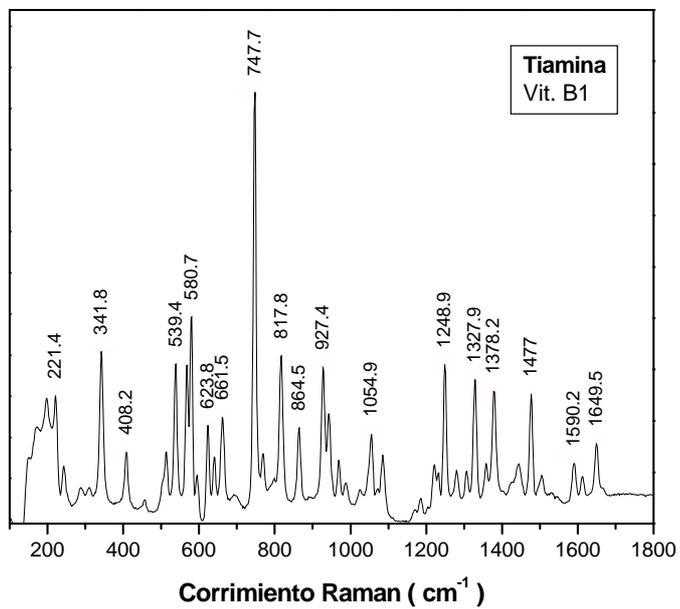


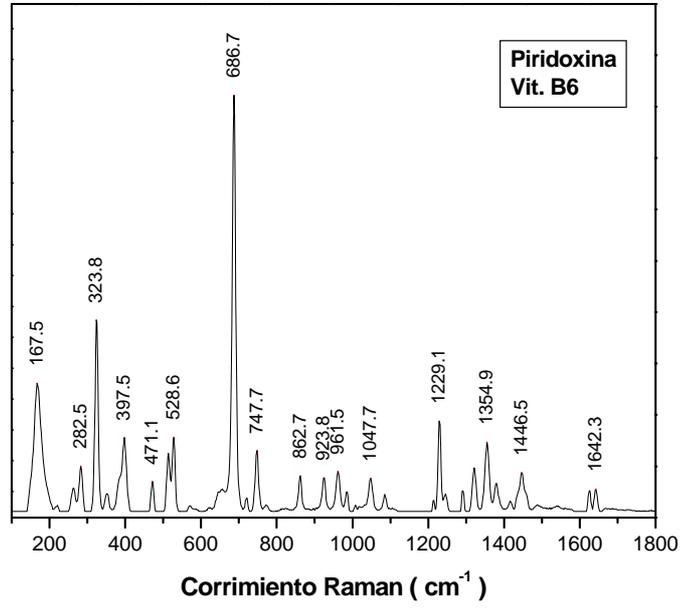












Referencias Bibliográficas

- [1] G. Herzberg, *Molecular Spectra and Molecular Structure, V-II Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*, Krieger Publishing Company, Florida, 1991.
- [2] N.B Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberly, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, Academic Press, San Diego, California, 1990.
- [3] J.J. Laserna, *Modern Techniques in Raman Spectroscopy*, John Wiley y Sons, Baffins Lane, Inglaterra, 1996.
- [4] G. Turrell y J. Corset, *Raman Microscopy, Developments and Applications*, Academic Press, San Diego, California, 1996.
- [5] E.D Olsen, *Métodos ópticos de análisis*, Reverté, Barcelona, España, 1990.
- [6] R.L. Garrell, *Surface-enhanced Raman Spectroscopy*. *Anal. Chem.* 61(6) (1989) 401A-411A.
- [7] J. Ferraro y K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, California, 1994.
- [8] K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. part A: Theory and applications in inorganic chemistry*, Wiley, New York, 1997.
- [9] K. Nakamoto, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, Wiley, New York, 1997.
- [10] S.P. Mulvaney y C.D. Keating, *Raman spectroscopy*. *Anal. Chem.* 72 (2000) 145R-157R.
- [11] D.J. Gardiner y P.R. Graves, *Practical Raman Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin, Alemania, 1989.
- [12] C.N. Banwell y E.M. McCash, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill, Inglaterra, 1994.
- [13] M. Delhaye y P. Dhamelincourt, *J. Raman Spectrosc.* 3 (1975) 33.

- [14] F.M. Mirabella, *Modern Techniques in Applied Molecular Spectroscopy*, John Wiley y Sons, New York, USA, 1998.
- [15] B. Wopenka y J.D. Pasteris, Raman intensities and detection limits of geochemically relevant gas mixtures for a laser Raman microprobe, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2165-2170.
- [16] R.T. Packard y R.L. McCreery, High-sensitivity normal and resonance Raman spectroscopy applications to transient electrochemistry, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2631-2637.
- [17] I.R. Lewis, N.W. Daniel, Jr, N.C. Chaffin y P.R. Griffiths, Raman spectrometry and neural networks for the classification of wood types-1, *Spectrochimic. Acta* 50A (1994) 1943-1958.
- [18] D.N. Waters, Raman spectroscopy of powders: effects of light absorption and scattering, *Spectrochim. Acta* 50A (1994) 1833-1840.
- [19] H. Shinohara, Y. Yamakita y K. Ohno, Raman spectra of polycyclic aromatic hydrocarbons. Comparison calculated Raman intensity distributions with observed spectra for naphthalene, anthracene, pyrene, y perylene, *J. Mol. Structure*, 442 (1998) 221-234.
- [20] U.D. Venkateswaran, V.M. Naik y R. Naik, Hight-pressure Raman studies of polycrystalline BaTiO₃, *Phys. Rev. B* 58 (1998) 14256-14260.
- [21] H.G.W. Edwards, Raman spectroscopy as a diagnostic probe for ancient skin, *Proceedings of SPIE*, 3608, (1999) 92-98
- [22] D.E. Bugay, Physical characterization of pharmaceutical solids by Raman spectroscopy, *Proceedings of SPIE*, 3608 (1999) 56-63.
- [23] T. Hasegawa, Detection of minute chemical species by principal component analysis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3085-3091.
- [24] T.T. Basiev, A.A. Sobol, P.G. Zverev, L.I. Ivleva, V.V. Osiko, R.C. Powell, Raman spectroscopy of crystals for stimulated Raman scattering, *Optical Materials* 11 (1999) 307-314.

- [25] T. Murphy, S. Lucht, H. Schmidt y H.D. Kronfeldt, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) system for continuous measurements of chemicals in sea-water, *J. Raman Spectrosc.* 31 (2000) 943-948.
- [26] R. Withnall, A. Derbyshire, S. Thiel y M.J. Hughes, Raman microscopic analysis in museology, *Proceedings of SPIE*, 4098 (2000) 217-231.
- [27] D.L. Stokes y T. Vo-Dinh, Development of an integrated single-fiber SERS sensor, *Sensors and Actuators B* 69 (2000) 28-36.
- [28] S. Jimenez-Sandoval, Micro-Raman spectroscopy: a powerful technique for materials research, *Microelectronic Journal* 31 (2000) 419-427.
- [29] S. Brunsgaard Hansen, R.W. Berg y E.H. Stenby, Raman spectroscopic studies of methane-ethane mixtures as a function of pressure, *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 745-749.
- [30] T. Vo-Dinh, M.Y.K. Hiromoyo, G.M. Begun y R.L. Moody, Surface-enhanced Raman spectrometry for trace organic analysis. *Anal. Chem.* 56 (1984) 1667-1670.
- [31] M.M. Carrabba, R.B. Edmonds y R.D. Rauh, Feasibility studies for the detection of organic surface and subsurface water contaminants by surface-enhanced Raman spectroscopy on silver electrodes. *Anal. Chem.* 59 (1987) 2559-2563.
- [32] A.M. Alak y T. Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman spectrometry of organophosphorus chemical agents, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2149-2153.
- [33] T. Vo-Dinh, A.M. Alak y R.L. Moody, Recent advances in surface enhanced Raman spectrometry for chemical analysis, *Spectrochim. Acta* 43B (1988) 605-615.
- [34] P.A. Walker, M.D. Morris, M.A. Burns y B.N. Johnson, Isotachophoretic separations on a microchip. Normal Raman spectroscopy detection. *Anal. Chem.* 70 (1998) 3766-3769.
- [35] S.G. Skoulika, C.A. Georgiou y M.G. Polissiou, FT-Raman spectroscopy – analytical tool for routine analysis of diazinon pesticide formulations, *Talanta* 51 (2000) 599-604.
- [36] K. Mukherjee, S. Sanchez-Cortes y J.V. García-Ramos, Raman and surface-enhanced Raman study of insecticide cyromazine, *Vib. Spectrosc.* 25 (2001) 91-99.
- [37] J. Sherma, Pesticides, *Anal. Chem.* 65 (1993) 40R-54R.

- [38] T.E. Tuormaa, Adverse effects of agrochemicals on reproduction and health: a brief review from the literature, *J. Nutritional & Environmental Medicine*, 5(4) (1995) 353.
- [39] W.J. Rea, Pesticides, *J. Nutritional y Environmental Medicine*, 6(1) (1996) 55.
- [40] P.J Landrigan, L. Claudio, S.B. Markowitz, G.S. Berkowitz, B.L. Brenner, H. Romero, J.G. Wetmur, T.D. Matte, A.C. Gore, J.H. Godbold y M.S. Wolff, Pesticides and inner-city children: Exposures, risks, and prevention, *Environmental Health Perspectives Supplements* 107 (1999) 431.
- [41] R.E. Clement, P.W. Yang y C.J. Koester, *Environmental analysis, Anal. Chem.* 71 (1999) 257R-292R.
- [42] P.D. Johnson, D.A. Rimmer y R.H. Brown, Adaptation and application of a multi-residue method for the determination of a range of pesticides, including phenoxy acid herbicides in vegetation, ased on high-resolution gel permeation chromatographic clean-up and gas chromatographic analysis with mass-selective detection, *J. Chromatogr. A.* 765 (1991) 3-11.
- [43] M.E Leon-Gonzalez y A. Townshend, Determination of organophosphorus and carbamate pesticide standards by liquid chromatography with detection by inhibition of immobilized acetylcholinesterase, *J. Chromatogr.* 539 (1991) 47-54.
- [44] R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, M.J. Amigo-Moran, J. Hernandez-Mendez, Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr.* 607 (1992) 37-45.
- [45] B.D. McGarvey, High-performance liquid chromatographic methods for the determination f N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 89-105.
- [46] R. Carabias, E. Rodriguez, M.J. Amigo y J. Hernandez, Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr.* 607 (1992) 37-45.

- [47] M. Ashraf-Khorassani, L.T. Taylor y F.K. Schweighardt, Development of a method for extraction of organochlorine pesticides from rendered chicken fat via supercritical fluoroform, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3540-3547.
- [48] J.M. Orea, B. Bescos, C. Montero y A. Gonzalez-Ureña, Analysis of carbedazim in agricultural samples by laser desorption and REMPI time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 491-497.
- [49] M. Perez, J. Alario, A. Vazquez y J. Villén, Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed-phase LC-GC using the through-oven-transfer adsorption/desorption interface, *Anal. Chem.* 72 (2000) 846-852.
- [50] S.M. Waliszewski, A.A. Aguirre-Gutiérrez y R.M. Infanzón-Ruiz, Tendencia de 1988 a 1998 de los niveles de plaguicidas organoclorados persistentes en tejido adiposo humano en Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 16(1) (2000) 13-18.
- [51] Y. Hanada, T. Tanizaki, M. Koga, H. Shiraishi y M. Soma, Quantitative analysis of triphenylboron in environmental water samples by liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Sci.* 18 (2002) 445-448.
- [52] H. Berrada, G. Font y J.C. Moltó, Determination of urea pesticide residues in vegetable, soil, and water samples, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33(1) (2003) 19-41.
- [53] E. Macutkiewicz, M. Rompa y B. Zygmunt, Sample preparation and chromatographic analysis of acidic herbicides in soils and sediments, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 33(1) (2003) 1-17.
- [54] K. Norén y J. Sjövall, Liquid-gel partitioning and enrichment in the analysis of organochlorine contaminants, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 243-251.
- [55] V. Lopez-Avila, R. Young y W.F. Beckert, Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097-1106.
- [56] S. Bowadt y S.B. Hawthorne, Supercritical fluid extraction in environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 549-571.

- [57] H.M. Pylypiw, Jr., T.L. Arsenault, C.M. Thetford y M.J. Incorvia-Mattina, Suitability of microwave-assisted extraction for multiresidue pesticide analysis of procedure. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3522-3528.
- [58] D. Giraud, A. Ventura, V. Camel, A. Bermond y P. Arpino, Determination of traces of pesticides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-ionspray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 115-125.
- [59] A. Columé, S. Cárdenas, M. Gallego y M. Valcárcel, Multiresidue screening of pesticide in fruits using an automatic solid-phase extraction system, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1109-1116.
- [60] K. Adou, W.R. Bontoyan y P.J. Sweeney, Multiresidue method for the analysis of pesticide Residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49(9) (2001) 4153-4160.
- [61] J.L. Luque-García y M.D. Luque de Castro, Coupling continuous subcritical water extraction, filtration, preconcentration, chromatographic separation and UV detection for the determination of chlorophenoxy acid herbicides in soils, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 25-35.
- [62] M. Muniz-Miranda y G. Sbrana, Quantitative determination of the surface concentration of phenazine adsorbed on silver colloidal particles and relationship with the SERS enhancement factor, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 10639-10643.
- [63] Y. Wang, Y.S. Li, Z. Zhang y D. An, Surface-enhanced Raman scattering of some water insoluble drugs in silver hydrosols, *Spectrochim. Acta* 59A (2003) 589-594.
- [64] A. Loren, C. Eliasson, M. Josefson, K.V.G.K. Murty, M. Kall, J. Abrahamsson y K. Abrahamsson, Feasibility of quantitative determination of doxorubicin with surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 32 (2001) 971-974.
- [65] A. Katzir, *Lasers and Optical Fibers in Medicine*, Academic Press, San Diego, California, 1993.
- [66] <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/contents.htm>
- [67] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/pesticides.html>
- [68] <http://www.ific.org/sp/publications/brochures/pesticidebrochsp.cfm>

- [69] R.Y. Sato-Berrú, C. Medina-Gutiérrez, J. Medina-Valtierra, C. Frausto-Reyes, Aplicación de la espectroscopia Raman para la caracterización de pesticidas orgánicos, Rev. Int. Contam. Ambient. (Int. J. Environ. Pollut.), Aceptado, noviembre 2003.
- [70] <http://spectra.galactic.com>
- [71] <http://www.models.kvl.dk/users/engelsen/specarb/specarb.html>
- [72] <http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/specplib.html>
- [73] <http://minerals.caltech.edu/Files/raman>
- [74] <http://science.canberra.edu.au/rim/links.html>
- [75] W.B. Lacy, J.M Williams, L.A. Wenzler, T.P. Beebe y J.M. Harris, Characterization of SiO₂-overcoated silver-island films as substrates for surface-enhanced Raman scattering, Anal. Chem. 68 (1996) 1003-1011.
- [76] L. He, M.J. Natan y C.D. Keating, Surface-enhanced Raman scattering: a structure-specific detection method for capillary electrophoresis, Anal. Chem. 72 (2000) 5348-5355.
- [77] V.V. Tarabara, I.R. Nabiev y A.V. Feofanov, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate, Langmuir 14 (1998) 1092-1098.
- [78] C.G. Kontoyannis, Quantitative determination of CaCO₃ and glycine in antacid tablets by laser Raman spectroscopy, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 13 (1995) 73-76.
- [79] D.P. Schweinsberg y Y.D. West, Quantitative FT Raman analysis of two component systems, Spectrochim. Acta 53A (1997) 25-34.
- [80] C.G. Kontoyannis, N.C. Bouropoulos y P.G Koutsoukos, Raman spectroscopy: A tool for the quantitative analysis of mineral components of solid mixtures. The case of calcium oxalate monohydrate and hydroxyapatite, Vib. Spectrosc. 15 (1997) 53-60.
- [81] S. Om-Apinyan, T. Rajmankina, C. De la Cruz, U.A. Jayasooriya, Fourier-transform surface enhanced Raman scattering: A quantitative technique?, Spectrochim. Acta 53A (1997) 877-879.

- [82] F.W. Langkilde, J. Sjoblom, L. Tekenbergs-Hjelte y J. Mrak, Quantitative FT-Raman analysis of two crystal forms of a pharmaceutical compound, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 687-696.
- [83] X. Dou, Y. Yamaguchi, H. Yamamoto, S. Doi, y Y. Ozaki, A highly sensitive, compact Raman system without a spectrometer for quantitative analysis of biological samples, *Vib. Spectrosc.* 14 (1997) 199-205.
- [84] T. Pal, V.A. Narayanan, D.L Stokes y T. Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman detection of nicotinamide in vitamin tablets, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 21-28.
- [85] C. Rodger, V. Rutherford, P.C. White y W.E. Smith, Towards quantitative surface enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a study of aggregation and concentration for two rhodamine dyes, *J. Raman Spectrosc.* 29 (1998) 601-606.
- [86] S. Sasic y M. Kuzmanovic, Raman spectroscopy study of acetone-phenol mixtures, *J. Raman Spectrosc.* 29 (1998) 593-599.
- [87] W.B. Lacy, L.G. Olson y J.M Harris, Quantitative SERS measurements on dielectric-overcoated silver-island films by solution-deposition control of surface concentrations, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2564-2570.
- [88] J.H. Giles, D.A. Gilmore y M.B. Denton, Quantitative analysis using Raman spectroscopy without spectral standardization, *J. Raman Spectrosc.* 30 (1999) 767-771.
- [89] T.J. Vickers, J. Pecha y C.K. Mann, Raman spectroscopy with a fiber-optic probe and multichannel detection, *J. Chem. Educ.* 78 (1999) 1674-1675.
- [90] A.G. Ryder, G.M. O'Connor y T.J. Glynn, Quantitative analysis of cocaine in solid mixtures using Raman spectroscopy and chemometric methods, *J. Raman Spectrosc.* 31 (2000) 221-227.
- [91] K. Ito, T. Kato y T. Ona, Non-destructive method for the quantification of the average particle diameter of latex as water-based emulsions by near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 33 (2002) 466-470.
- [92] R.Y. Sato-Berrú, J. Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, Quantitative NIR-Raman analysis in liquid mixtures, *Spectrochim. Acta Part A*, Aceptado, noviembre-2003.

- [93] D. Strommen, K. Nakamoto, Laboratory Raman Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York, 1984.
- [94] R.Y. Sato-Berrú, J. Medina-Valtierra, C. Medina-Gutiérrez, C. Frausto-Reyes, Quantitative NIR-Raman analysis of methyl parathion pesticide microdroplets on aluminum substrates, Spectrochim. Acta Part A, Aceptado, noviembre-2003.
- [95] B. Schrader, H.H. Klump, K. Schenzel y H. Schulz, Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants, J. Mol. Structure, 509 (1999) 201-212.
- [96] R. Withnall, B.Z. Chowdhry, J. Silver, H.G.M. Edwards y L.F.C. de Oliveira, Raman spectra of carotenoids in natural products, Spectrochim. Acta 59A (2003) 2207-2212.
- [97] B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, S. Keller, T. Lochte, H. Schulz, E. Tatsh y S. Wessel, NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects, J. Mol. Structure, 480-481 (1999) 21-32.
- [98] B. Schrader, Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications, VHC Publishers, Inc. New York, 1995.
- [99] R.T. Morrison y R.N. Boyd, Química Orgánica, Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, Delaware, 1990.
- [100] <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/CHROMO/chromintro.html>
- [101] http://www.accessexcellence.org/LC/SS/chromatography_background.html
- [102] <http://www.chromatographyonline.com>
- [103] <http://www.towson.edu/~ladon/concas.html>
- [104] <http://www.ilpi.com/msds/ref/concentration.html>
- [105] <http://www.mrcoulter.com/LECTURES/2solutions2.pdf>

Lista de Figuras

- Figura 1: Mecanismos de varios procesos de esparcimiento de la luz. (a) Rayleigh, (b) Raman no-resonante, (c) Raman pre-resonante, (d) Raman resonante y (e) fluorescencia resonante. 3
- Figura 2: Diagrama de niveles de energía para el esparcimiento Raman. (a) esparcimiento Raman Stokes y (b) esparcimiento Raman anti-Stokes. 6
- Figura 3: Espectro Raman, Stokes y anti-stokes. 8
- Figura 4: Representación esquemática de las mediciones del cociente de despolarización realizadas en un experimento Raman con láser. 9
- Figura 5: Modos vibracionales. (+) y (-) significan fuera del plano del papel. 12
- Figura 6: Configuración de backscattering. 13
- Figura 7: Sistema Raman convencional. (1) láser de He-Ne-632.8nm, (2) diafragmas, (3) espejos, (4) filtro de interferencia, (5) filtro notch con ángulo de 9° , (6) objetivo de microscopio-5X, (7) muestra con opción-6, (8) microscopio y muestra, (9) lente planoconvexo $f=100\text{mm}$, (10) monocromador, (11) CCD y (12) fuente de la CCD. 28
- Figura 8: Sistema 1000B. (1) haz laser-830nm, (2) filtro notch, (3) microscopio y muestra, (4) cámara de vídeo, (5) rendija, (6) monocromador y (7) cámara CCD. 29

Figura 9: Sistema i-45. (1) microscopio del sistema NIR-Raman, (2) nosepiece (3) haz láser-830 nm, (4) espejo, (5) base del espejo, (6) lente plano-convexo, (7) vial de vidrio y muestra, (8) haz Raman, (9) distancia focal y (10) base con movimiento-z. 30

Figura 10: Utilización del sustrato de aluminio. (1) sistema NIR-Raman, (2) nosepiece del microscopio, (3) objetivo (50X), (4) haz láser 830 nm, (5) esparcimiento Raman, (6) sustrato de aluminio y muestra y (7) portaobjeto. 31

Figura 11: Procedimiento para el análisis de los espectros Raman. 34

Figura 12: Espectros Raman del paratión metílico (A) y malatión (B) obtenidos en el sistema VIS-Raman (láser de HeNe, 632.8 nm). 37

Figura 13: Espectros Raman del paratión metílico y del malatión obtenidos en el sistema NIR-Raman (diodo láser, 830 nm). 37

Figura 14: Análisis de diferentes sustratos en el sistema NIR-Raman. a) sin muestra y b) con muestra (1700 ppm de paratión metílico). 41

Figura 15: a) Espectro Raman del β -caroteno y b) espectro Raman de una mezcla de extracto de β -caroteno con malatión y paratión metílico. 44

Figura 16: Espectro Raman resultante de la Fig. 15B después de una sustracción de espectros y corrección de la línea base. 44

Figura 17: Datos experimentales (puntos) y predichos con la Ec. 4.2 (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del etanol (a) 882 cm^{-1} , (b) 1052 cm^{-1} y (c) 1274 cm^{-1} . 48

- Figura 18: Datos experimentales (puntos) y predichos con la Ec. 4.2 correspondientes a la intensidad de los picos del R-6G (a) 1361 cm^{-1} , (b) 1505 cm^{-1} y (c) 1180 cm^{-1} . 49
- Figura 19: Espectros Raman de varios solventes en diferentes concentraciones generados con la Ec. 4.9. 53
- Figura 20: Espectro Raman resultante al sumar los espectros de la Fig. 18. 53
- Figura 21: Intensidad Raman vs tamaños de las microgotitas de paratión metílico correspondiente a los picos seleccionados (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} . 57
- Figura 22: Datos experimentales (puntos) y curvas predichas con la Ec. (4.10) (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del paratión metílico (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} . 58
- Figura 23: Datos experimentales (puntos) e isoterma de Langmuir (línea) de microgotitas de paratión metílico para el pico 1345 cm^{-1} . 59
- Figura 24: Datos experimentales (puntos) y curvas predichas con la Ec. (4.10) (líneas) correspondientes a la intensidad de los picos del paratión metílico (a) 1345 y (b) 1110 cm^{-1} . 60
- Figura 25: Espectro Raman del chile *ancho* en fase temprana de maduración (color verde). 62
- Figura 26: Espectro Raman del β -caroteno, chile *ancho* de color rojo. 63
- Figura 27: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto a la etapa de maduración del chile *ancho* (1: tardía, 2: media y 3: total). 64

Figura 28: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto al tamaño del chile *ancho* (1: chica, 2: mediana y 3: grande). 66

Figura 29: Proporción entre la intensidad de la clorofila (1604 cm^{-1}) y β -caroteno (1523 cm^{-1}) con respecto a la etapa de maduración del chile *ancho* (1: tardía, 2: media y 3: total). 66

Figura 30: Rastros de pesticida, paratión metílico, sobre la superficie del chile *ancho*. 68

Figura 31: Rastros de pesticida, malatión, sobre la superficie de chile *ancho*. 68

Figura 32: Espectros Raman de las microgotas residuales sobre la superficie de chile *ancho* contaminado con paratión metílico. a) chile color rojo y b) chile color verde. 70

Figura 33: Espectros Raman de las microgotas residuales sobre la superficie de chile *ancho* contaminado con malatión. a) chile color rojo y b) chile color verde. 70

Lista de Tablas

Tabla 1: Análisis de etanol en productos y bebidas alcohólicas	50
Tabla 2: Pesticida folidol con metanol en diferentes concentraciones	52
Tabla 3: Análisis de mezclas de solventes	54

