



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA: ANALISIS DE
NISTATINA EN DIFERENTES SOLVENTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

F I S I C O

PRESENTA

SERGIO MARTIN GALINA HIDALGO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14
29
1790



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1.- INTRODUCCION

a.- Proyecto

2.- CONSIDERACIONES TEORICAS

a.- La Región Infrarroja

b.- El Espectro

c.- Vibraciones Moleculares

d.- Rotor Rígido

e.- Oscilador Armónico

f.- Ecuación Oscilador Armónico-Rotor Rígido

g.- Moléculas Diatómicas

h.- Moléculas Poliatómicas

i.- Frecuencias de Grupo

3.- INSTRUMENTACION

a.- Componentes

b.- Preparación de Muestras

4.- ANALISIS DE ESPECTROS

a.- Calibración

b.- Cálculo de Frecuencias de Vibración

c.- Interpretación de Espectros Infrarrojos

d.- Ley de Beer-Lambert

6.- CONCLUSIONES

7.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

a.- PROYECTO

Quando realicé mi servicio social en el laboratorio de biofísica de la facultad, se me propuso trabajar en un proyecto de tesis sobre espectroscopia infrarroja y algunas aplicaciones. El proyecto prácticamente partía de cero, es decir, teníamos que realizar un trabajo previo, con apoyo bibliográfico, de familiarización con la técnica y el equipo de IR, para posteriormente calibrar y utilizar un espectrofotómetro, al cual gentilmente se nos había dado acceso.

Durante el desarrollo del proyecto, previo a la elaboración de la tesis propiamente dicha, los problemas e imprevistos fueron modificando los objetivos originalmente planteados. En este tiempo, se presentaron 4 trabajos relacionados con esta tesis en los congresos nacionales de física {13,14,15,16}. Aquí se hará mención a algunas partes de estos trabajos y a otros resultados. Primeramente se mostrará una relación entre el cálculo teórico de una frecuencia de absorción para un par de átomos y la frecuencia encontrada experimentalmente. Después se realizará la interpretación de algunos espectros obtenidos y finalmente se encontrará la relación entre la absorbancia de la muestra Nistatina-solvente y la concentración del antibiótico.

La Nistatina es un antibiótico de gran uso. Recientemente se aplica en tratamientos de quimioterapia celular contra el cáncer. En el laboratorio de biofísica es utilizado por el grupo de membranas artificiales para analizar la formación de canales en membranas de colesterol oxidado. La Nistatina en cantidades micromolares aumenta la conductancia en las membranas y ésta, a su vez es proporcional a una potencia a la concentración del antibiótico{10}. De igual manera, los grupos hidroxilo de la Nistatina son responsables de la selectividad de aniones en la membrana.

La apariencia de la Nistatina es la de un polvo uniforme, prácticamente libre de impurezas visibles y grumos (en caso de tener algunos, estos se deshacen fácilmente). Su color es amarillo claro y es prácticamente inodoro, si acaso con un ligero aroma a cereal. Presenta un anillo lactona polihidroxílico de 37 átomos de carbono con 7 dobles ligaduras de carbono conjugadas en el anillo, y un grupo micosamino unido a éste por un enlace glucosídico. (Fig 1)

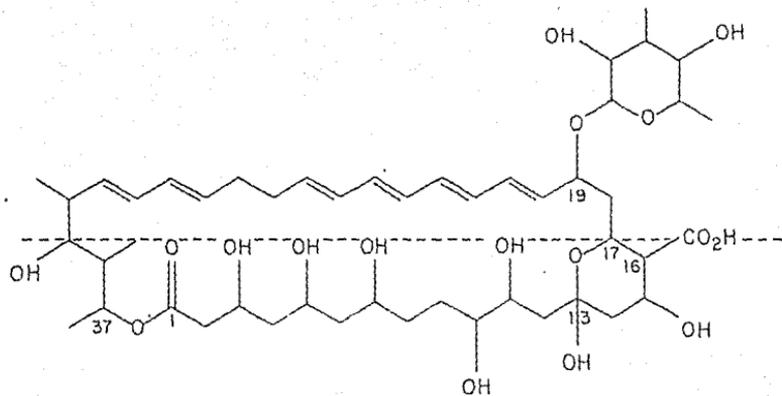


FIGURA 1

La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica indispensable como fuente de datos estructurales de sustancias orgánicas. Este método se emplea generalmente en el estudio de muestras, para obtener datos sobre grupos funcionales y otras características estructurales. El espectro infrarrojo de una sustancia orgánica es característico de ella, es decir, es como su "huella digital", y cuando la sustancia está contaminada con cantidades apreciables de impurezas de otros compuestos, se advierten variaciones pronunciadas en su espectro. Por ello, la técnica de infrarrojo es útil para la comprobación de la identidad de materias primas en preparaciones orgánicas a gran escala. (5)

CONSIDERACIONES TEORICAS

a.-LA REGION INFRARROJA

El espectro electromagnético está dividido en varias regiones, las cuales dan diferente información y por ende sirven a diferentes propósitos. Esta división del espectro electromagnético es arbitraria y los límites no están bien definidos, sin embargo, un esquema como el mostrado en la figura 2 es conveniente {1}.

Las moléculas pueden absorber radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda. Dentro de éstas, la región que se conoce como radiación infrarroja puede subdividirse de acuerdo a las técnicas experimentales en tres{1}:

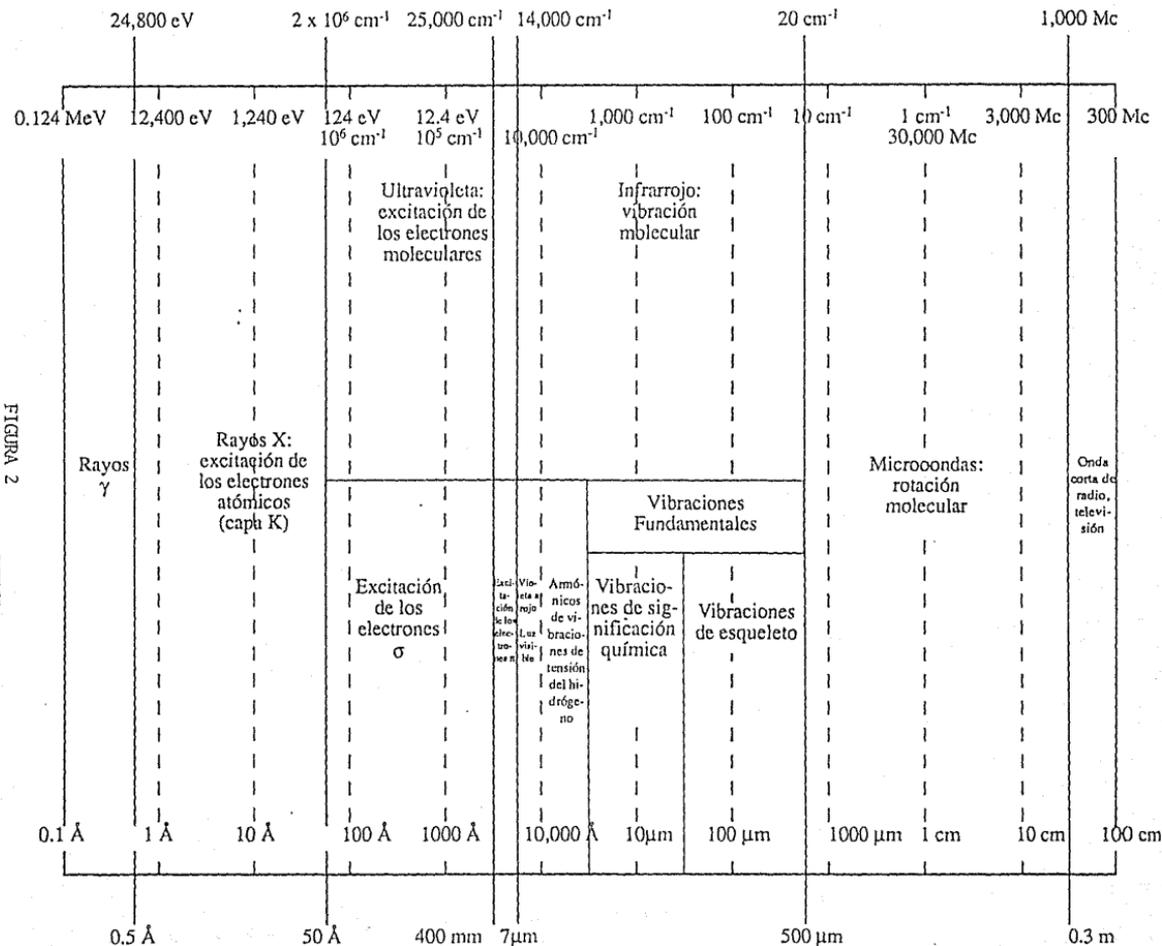
	frecuencia (cm-1)	longitud de onda (μ m)
1.- INFRARROJO CERCANO	13300-4000	0.75-2.5
2.- ROTACION-VIBRACION FUNDAMENTAL	4000-400	2.5 -25
3.- INFRARROJO LEJANO	400-20	25 -500

De las tres subdivisiones del infrarrojo, se pondrá mas atención a la llamada de rotación-vibración fundamental, pues es la región mas utilizada.

b.- EL ESPECTRO

Un espectro infrarrojo es la curva obtenida en un plano radiación emitida vs. longitud o número de onda. La cantidad de radiación emitida es entonces, función de la longitud de onda ó la frecuencia y también depende de la temperatura y de su emisividad. Por ejemplo, si la radiación emitida por una fuente al calentarla, es representada frente a la longitud de onda, se obtiene la curva de trazo discontinuo de la fig. 3 . Al introducir una sustancia en la trayectoria de la radiación, se obtiene la curva de trazo continuo y se observa que presenta variaciones pronunciadas. Esto se debe a que la sustancia absorbió ciertas longitudes de onda específicas de energía del haz de radiación. {1}

EL ESPECTRO ELECTROMAGNETICO



Intensidad

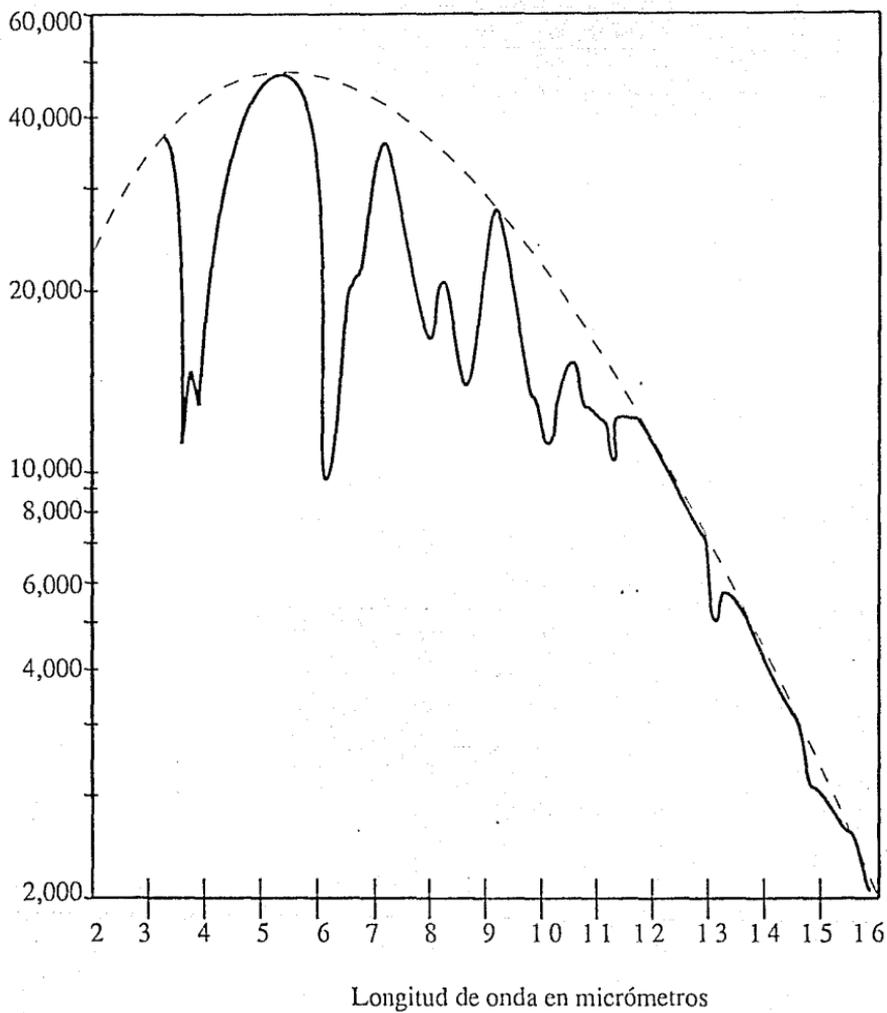


FIGURA 3

REPRESENTACION GRAFICA DE LA RADIACION IR EMITIDA EN
FUNCION DE LA LONGITUD DE ONDA Y DE LA ABSORCION DE LA MUESTRA

Cuando se colocan diferentes sustancias en la trayectoria del haz radiante se observa que cada una de estas sustancias absorbe energía asociada con diferentes longitudes de onda, y por ello pueden distinguirse de las otras ya que presentan o carecen, según sea el caso, de bandas particulares de absorción de energía. Otro fenómeno interesante es que mezclando varias sustancias, se obtiene una curva de absorción compuesta, que corresponde a la suma de los constituyentes individuales{1}. También se observa que determinadas absorciones representan una medida de la concentración de alguna de las sustancias de la mezcla.

Las bandas de absorción infrarroja se pueden relacionar con los movimientos de los átomos individuales que forman la molécula. En una manera aproximada se puede suponer que las partes aisladas de una molécula pueden vibrar independientemente del resto de la molécula. Por ejemplo, un grupo OH que forma parte de un grupo mayor de átomos, se encuentra en un movimiento vibratorio. Dicho movimiento produce una banda de absorción que se observa en todas las moléculas que contienen este grupo, de esta forma de vibración surge el concepto de frecuencias de grupo.{1}

c.-VIBRACIONES MOLECULARES

Los espectros moleculares pueden ser de tres clases: electrónicos, de rotación y de vibración. Los espectros electrónicos se deben a cambios en la energía de la molécula provocados por diferentes arreglos de los electrones{4}, los espectros de rotación se originan por la absorción de fotones por parte de las moléculas con la conversión completa de la energía del fotón en energía de rotación molecular. Los espectros de vibración son aquellos en los cuales la absorción de energía radiante produce cambios en la energía de la vibración molecular{1}. La diferencia de energía encontrada en los espectros de vibración es, como se mostrará mas adelante, aproximadamente 100 veces mas grande que la correspondiente a los espectros de rotación y puesto que los cambios espectrales de rotación son relativamente pequeños, tienen como efecto el ensanchar la banda de vibración-rotación.{2}

Se puede considerar un modelo de molécula como un conjunto de bolas y resortes; siendo las bolas los núcleos y los resortes los enlaces químicos. Este sistema puede vibrar de acuerdo con un amplio número de esquemas

complicados. Puede esperarse un espectro de absorción bastante complejo para la mayoría de los compuestos porque una molécula que contenga n átomos tiene $3n-6$ vibraciones normales ($3n-5$ para una molécula lineal).

La cantidad $3n-6$ se obtiene porque con el fin de describir el movimiento de los núcleos de una molécula, tienen que especificarse tres coordenadas para cada núcleo, así que para una molécula con n átomos se requieren un total de $3n$ coordenadas y se dice que la molécula tiene tres n grados de libertad, sin embargo, no todos reflejan modos de vibración ya que tres de ellos describen la translación de la molécula como una unidad rígida (las tres coordenadas del centro de masa). Además, la rotación de una molécula, está dada completamente por tres coordenadas; dos ángulos que describen la orientación de una línea fijada en la molécula con referencia al sistema de coordenadas fijo en el espacio y por un tercer ángulo que describe la rotación alrededor de esta línea (1,4). Los restantes $3n-6$ grados de libertad tienen entonces que describir movimientos relativos de los núcleos, entre sí con el sistema como un todo fijo en el espacio, o sea movimientos vibratorios. Por lo tanto hay un total de $3n-6$ vibraciones fundamentales. Sin embargo no siempre aparecen en el espectro este número exacto de bandas. Dicho número puede aumentar debido a bandas no fundamentales tales como, los tonos de combinación, los armónicos y los tonos de diferencia. Un tono de combinación es la suma de dos o mas frecuencias diferentes, por ejemplo ν_1 y ν_2 , es decir que el fotón absorbido excita las vibraciones 1 y 2 al mismo tiempo, un armónico es un múltiplo de una frecuencia dada $2\nu, 3\nu, \dots$ (primer armónico, segundo armónico, ...) y un tono de diferencia es la diferencia entre dos frecuencias como ν_1 y ν_2 , es decir, la molécula se encuentra en un estado de vibración excitado (ν_2) y absorbe energía adicional para alcanzar otro estado excitado de vibración. (1)

d.-RÓTOR RIGIDO

Una molécula en rotación, puede representarse en forma simple considerando dos átomos de masas m_1 y m_2 como puntuales unidas entre sí a una distancia r desde los extremos de una varilla rígida sin peso. En este modelo se desecha el tamaño finito de los átomos y el hecho de que los mismos no se encuentran rigidamente unidos, ya que en realidad su distancia puede variar debido a la rotación de la molécula.

En mecánica clásica la energía de rotación de un cuerpo rígido (E), está dada por :

$$E = \frac{1}{2} I \omega^2 \quad (i)$$

donde ω es la velocidad angular de rotación e I es el momento de inercia del sistema alrededor del eje de rotación. De igual manera se tiene que :

$$\omega = 2\pi \nu_{rot} \quad (ii)$$

donde ν_{rot} es la frecuencia rotacional,

$$I = \sum m_i r_i^2 \quad (iii)$$

y el momento angular del sistema es:

$$L = I \omega \quad (iv)$$

Para el modelo propuesto tenemos que el momento de inercia será:

$$I = m_1 r_1^2 + m_2 r_2^2$$

donde

$$r_1 = \frac{m_2}{m_1 + m_2} r$$

$$r_2 = \frac{m_1}{m_1 + m_2} r$$

y r_1 y r_2 son las distancias entre las masas m_1 y m_2 del centro de gravedad, y r la distancia entre las dos masas puntuales. Al sustituir se tiene:

$$I = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} r^2$$

y si,

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

el momento de inercia es el mismo que el de una masa

$$I = \mu r^2 \quad (v)$$

a una distancia r del eje; μ es la masa reducida. Por lo tanto, se puede considerar la rotación de una masa sencilla alrededor de un punto a una distancia fija r del eje de rotación. Este sistema se conoce como rotor rígido simple.

Aplicando a (v) la condición de Bohr de que el momento angular está cuantizado en unidades de $h/2\pi$ (4)

$$L = I\omega = Jh/2\pi, \quad J = 0, 1, 2, \dots$$

tenemos de (i)

$$E_J = \frac{1}{2} I \omega^2 = \frac{\frac{1}{2} (I \omega)^2}{I} = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J^2$$

sin embargo tratamientos posteriores plantean que L está dado por

$$L = I \omega = \sqrt{J(J+1)} \quad h/2\pi$$

por lo tanto de (i)

$$E_J = \frac{1}{2} I \omega^2 = \frac{h^2}{8\pi^2 I} J(J+1) \quad (vi)$$

De acuerdo a la electrodinámica clásica, un movimiento intermolecular conduce a la radiación de luz sólo si existe un momento dipolar variable asociado con él. Para un rotor rígido esto puede originarse por una masa puntual rotatoria con una carga o asociada a un momento dipolar permanente. Lo anterior se aplica a todas las moléculas diatómicas constituidas por átomos distintos, porque para éstos los centros de las cargas positivas y negativas no coinciden, es decir, tales moléculas tienen un momento dipolar permanente que está en el eje internuclear. Durante la rotación, el componente del dipolo en una dirección fijada cambia periódicamente, lo que según la teoría clásica significa que debe emitirse luz de una

frecuencia vrot. Para moléculas constituidas por dos átomos iguales no aparece un dipolo permanente, y, en consecuencia no se emite luz.

e.-OSCILADOR ARMONICO

El concepto mas sencillo sobre la forma de vibración de una molécula diatómica es que cada uno de los átomos se acerca o se aleja con movimiento armónico, o sea, que el desplazamiento de la posición de equilibrio es una función sinusoidal del tiempo. Tal movimiento de los dos átomos puede reducirse con facilidad a la vibración armónica de una sola masa puntual alrededor de una posición de equilibrio, es decir, al modelo del oscilador armónico.

En mecánica clásica, un oscilador armónico se puede definir como un punto de masa m , que está sometido a una fuerza F proporcional a la distancia x y dirigida hacia la posición de equilibrio.

$$F = -kx = m \frac{d^2x}{dt^2} \quad (\text{vii})$$

la solución de la ecuación diferencial es

$$x = x_0 \text{ sen}(2\pi \nu_{\text{osc}} t + \phi) \quad (\text{viii})$$

aquí la frecuencia de vibración está dada por

$$\nu_{\text{osc}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/m} \quad (\text{ix})$$

la amplitud de la vibración es X_0 y ϕ es una constante de fase dependiente de las condiciones iniciales.

La energía potencial es:

$$V = \frac{1}{2} k x^2 = 2\pi^2 m \nu_{osc}^2 x^2 \quad (x)$$

La fuerza mutua ejercida por dos átomos de una molécula cuando se desplazan de su posición de equilibrio es, aproximadamente proporcional a la vibración de la distancia internuclear. Si se supone que esta relación se mantiene con exactitud, se deduce que los átomos en la molécula ejecutarán vibraciones armónicas, cuando queden sueltos después de haber sido desplazados de sus posiciones de equilibrio.

Para el primer átomo de masa m_1 ,

$$m_1 \frac{d^2 r_1}{dt^2} = -k(r - r_e)$$

y para el segundo átomo de masa m_2 ,

$$m_2 \frac{d^2 r_2}{dt^2} = -k(r - r_e)$$

donde r_1 y r_2 son las distancias de los dos átomos al centro de gravedad, r es la distancia entre los dos átomos y r_e es la distancia de equilibrio. Por sustitución de la ecuación (iii), obtenemos a partir de las dos ecuaciones

$$\left[\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \right] \frac{d^2 r}{dt^2} = -k(r - r_e)$$

Por introducción de la masa reducida μ y sustitución de r bajo el signo diferencial por $(r-r_e)$ pues r_e es constante, resulta

$$\mu \frac{d^2(r-r_e)}{dt^2} = -k(r-r_e) \quad (\text{xi})$$

Por tanto, las vibraciones de los dos átomos de una molécula se han reducido a la vibración de una sola masa puntual, cuya amplitud es igual al cambio de la distancia internuclear en la molécula. Y también se deduce que la frecuencia de vibración clásica de la molécula es

$$\nu_{\text{osc}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu}$$

Puesto que la energía vibracional está cuantizada, los niveles de energía del oscilador armónico son discretos y un tratamiento cuántico del mismo da para la ecuación de Schrödinger aplicada a un solo átomo de masa m sujeta a un potencial (ix)

$$\mathcal{E}\psi = -\frac{\hbar^2}{8\pi^2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + \left(\frac{1}{2}kx^2\right)\psi$$

entonces

$$\mathcal{E} = (r + 1/2) \frac{h}{2\pi} \sqrt{k/\mu} = (r + 1/2) h \nu_{\text{osc}} \quad (\text{xii})$$

Esta ecuación indica que los niveles de energía del oscilador armónico están igualmente separados y para el nivel más bajo donde $v=0$

$$E = \frac{1}{2} h \nu_{\text{osc}}$$

La banda fundamental se define como la banda para la cual el número cuántico vibracional cambia de $v''=0$ a $v'=1$. Se puede describir esta banda utilizando la ecuación anterior, así es que, sustituyendo los números cuánticos para la banda fundamental en la ecuación se obtiene

$$E' - E'' = h\nu = h\nu_{\text{osc}} \left[\left(1 + \frac{1}{2}\right) - \left(0 + \frac{1}{2}\right) \right]$$

$$\nu = \nu_{\text{osc}}$$

así es que el número de onda calculado correspondiente a la transición es igual al número de onda del oscilador armónico.

ECUACION OSCILADOR ARMONICO-ROTOR RIGIDO

Se ha visto que una banda de absorción representa transiciones moleculares que se relacionan tanto con cambios de energía rotacionales al igual que vibracionales. Los niveles de energía rotacional vibracional para una molécula que vibra como un oscilador armónico y rota como un rotor rígido están dados por

$$E = \left[h\nu_{\text{osc}} \left(v + \frac{1}{2} \right) \right] + \left[\frac{h^2 J(J+1)}{8\pi^2 I} \right] \quad (\text{xiii})$$

Vibración

rotación

g.-MOLECULAS DIATOMICAS

Absorción del infrarrojo.

Como se ha mencionado, la absorción molecular de la radiación es selectiva; solo la radiación de ciertas longitudes de onda será absorbida por una molécula dada. Además hay ciertas moléculas que no son capaces de absorber radiación infrarroja discreta. Además como se mencionó anteriormente, solo las moléculas diatómicas con un momento dipolar permanente absorberán radiación infrarroja(2).

Un modelo para describir la absorción, es el de una molécula en la cual los átomos ligados por enlaces químicos están vibrando, mientras que la molécula completa se encuentra rotando. Este modelo es bueno, porque toma en cuenta tanto la energía rotacional como la vibracional de la molécula. En este modelo se define una molécula diatómica en estado vibracional cuando sus enlaces químicos se mueven hacia afuera y hacia adentro de ellos mismos debido al alternado estiramiento y contracción. Este movimiento vibratorio está superpuesto a la rotación de la molécula alrededor de un eje perpendicular al enlace químico. Por otro lado cuando una vibración infrarroja de una frecuencia apropiada incide en la molécula y es absorbida, la vibración y/o la rotación es alterada, por lo tanto cuando la energía vibracional de la molécula es afectada, los átomos vibrarán en una mayor amplitud y el enlace químico se alargará un poco y si la energía rotacional de la molécula es afectada, entonces rotará en una frecuencia más alta que en la que rotaba antes de que la radiación fuera absorbida.(1)

Si se considera la longitud de onda de mayor radiación infrarroja absorbida por la molécula diatómica que resulta sólo en un cambio en el movimiento vibratorio de ésta, la longitud de onda de esta radiación absorbida localiza una banda de absorción llamada fundamental en el espectro infrarrojo de la molécula(1). Las moléculas diatómicas tienen sólo una banda fundamental de absorción.

Si la radiación infrarroja absorbida excita tanto cambios vibracionales como rotacionales en la molécula, en lugar de una sola frecuencia de radiación infrarroja ν_1 , una banda de frecuencias centradas alrededor de ν_1 tomará el lugar de la banda fundamental(2). Por otro lado la energía vibracional está cuantizada, es decir, la molécula sólo puede

vibrar a ciertas energías discretas y por ello, los niveles de energía pueden ser indicados por valores enteros de un número cuántico v , por lo tanto el menor nivel se asigna al valor de $v=0$ y el siguiente nivel superior es $v=1$.

El cambio fundamental para una molécula es un salto de $v''=0$ a $v'=1$.(2)

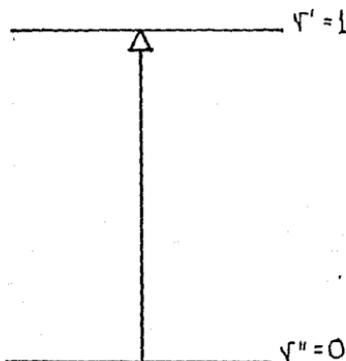


FIGURA 4

TRANSICION DE ENERGIA VIBRACIONAL

la flecha representa la transición. Esta transición fundamental corresponde a la banda de absorción vibracional fundamental.

Como se explica anteriormente esta banda tiene un ancho finito como resultado de cambios simultáneos en la energía rotacional y vibracional de la molécula. Por lo tanto, para representar una banda ó indicar como ocurren las transiciones de energía cuando se absorbe radiación y se forman bandas infrarrojas, siempre se deben tomar en cuenta

tanto los niveles de energía rotacional como vibracional. Los niveles de energía rotacionales también están cuantizados y se representan por el número cuántico $J = 0, 1, 2, \dots$, es decir, J entero sólo permitirá valores múltiplos de $h/2$.

La magnitud de los cambios de energía rotacional en las moléculas es menor que los cambios de energía vibracional, y por lo tanto, los niveles de energía rotacionales se representan más juntos que los niveles vibracionales. (fig.5)(2)

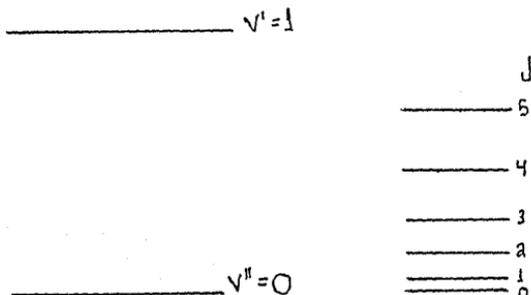


FIGURA 5

NIVELES DE ENERGIA VIBRACIONALES Y ROTACIONALES

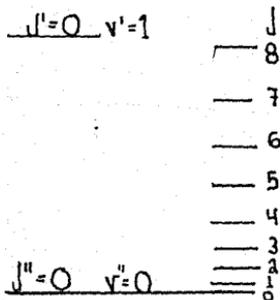


FIGURA 6

NIVEL VIBRACIONAL-ROTACIONAL

En la fig. 6 están combinados los niveles rotacionales y vibracionales de una molécula, es decir, que un nivel de energía puede estar dado por la suma de energía rotacional y vibracional, y estos dos tipos de energía juntos nos dan un nivel de energía fijo para la molécula que es llamado nivel vibracional-rotacional. {2}

Si se considera un gran número de moléculas de un mismo compuesto, se encuentran diferentes energías vibracionales y rotacionales. Sin embargo, la mayor parte de las moléculas se encuentran en el nivel vibracional mas bajo $v''=0$ pero con diferentes energías de rotación cuyos niveles J'' pueden estar distribuidos desde $J''=0$ hasta $J''=20$. {2}

Las distintas formas de una banda de absorción para una molécula diatómica está relacionada con el número de moléculas que efectúan diferentes transiciones de energía. {1}

h.-MOLECULAS POLIATOMICAS

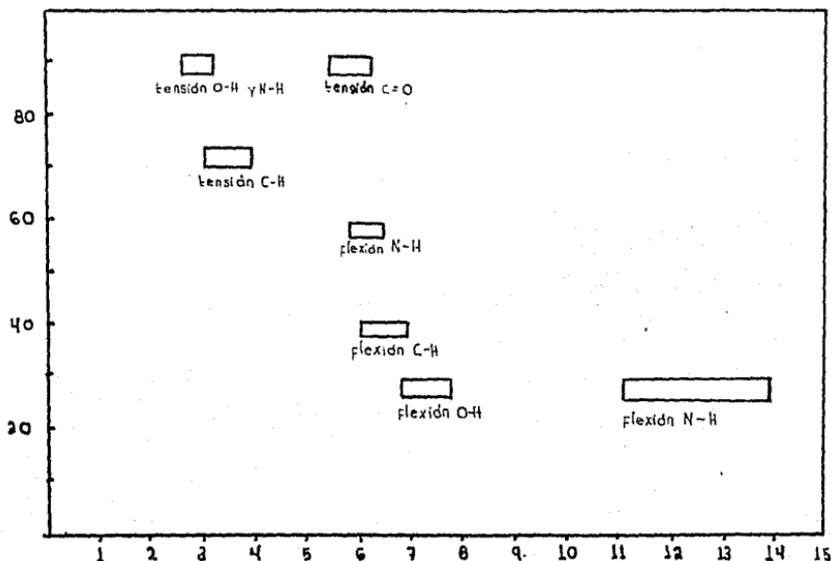
Las bandas de absorción pueden estar relacionadas con los movimientos de los átomos que componen una molécula. En una aproximación muy simple se asume que las partes aisladas de una molécula pueden vibrar independientemente del resto de la molécula, lo anterior se había afirmado anteriormente al introducir el concepto de frecuencia de grupo.

Un modelo más general involucra movimientos complejos de todos los átomos de la molécula. Este movimiento complejo de todas direcciones puede ser dividido en un número menor de movimientos básicos que pueden ser designados como las vibraciones fundamentales de una molécula que como se mostró anteriormente, son alrededor de $3N-6$.

i.-FRECUENCIAS DE GRUPO

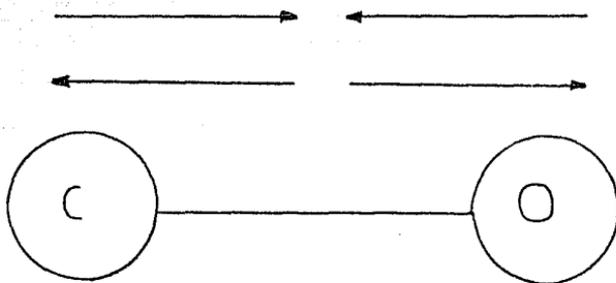
El espectro infrarrojo de un compuesto orgánico muestra un cierto número de bandas de absorción asociadas a ciertas unidades estructurales de la molécula. A las frecuencias características de estas bandas se les llama, como ya se mencionó anteriormente, frecuencias de grupo. La figura 7 muestra algunos de los grupos fundamentales más comunes y sencillos. Se puede apreciar como las bandas de absorción de frecuencias superiores (5000 a 1000 cm^{-1}) resultan

de las vibraciones de tensión y flexión de grupos que son diatómicos; C-H, N-H, O-H, C=O, C=C, etc., igualmente se aprecia que al disminuir las masas de los átomos, la frecuencia aumenta, así como que la variación de la constante de fuerza muestra un efecto similar; hay que recordar que esta depende del número de enlaces que une al par de átomos.

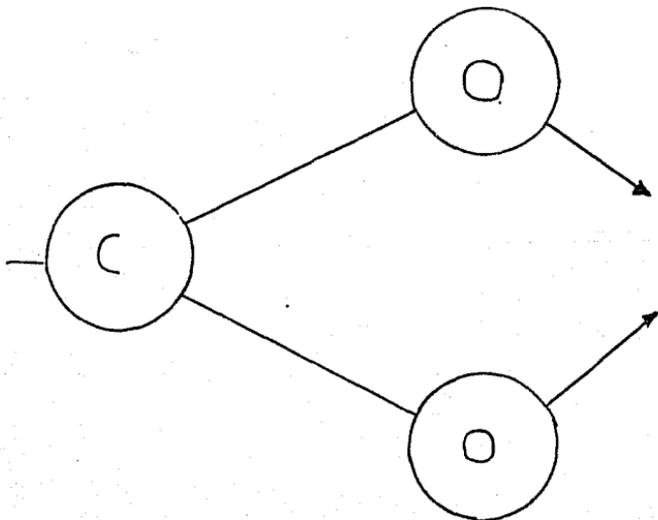


Las frecuencias de grupo se describen en términos de los movimientos que realizan los núcleos de un grupo estructural de la molécula durante la vibración. Se tienen así las siguientes vibraciones:

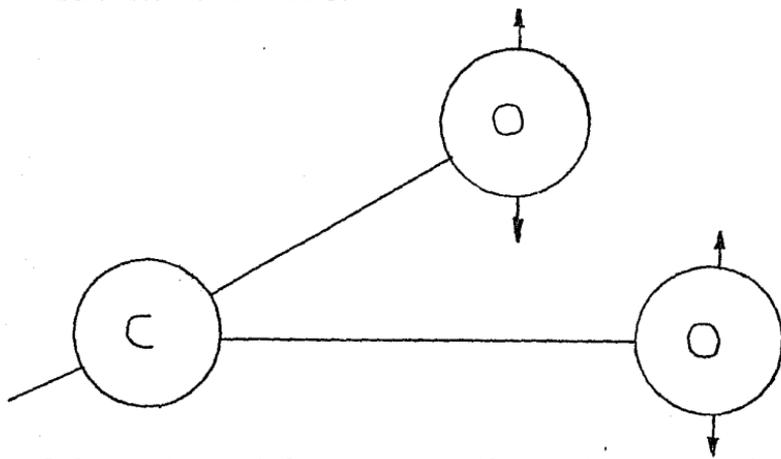
1.- Vibraciones de tensión simétricas y antisimétricas: Si los átomos se mueven hacia adentro y afuera en fase se trata de un movimiento simétrico y si un átomo se mueve hacia adentro y el otro hacia afuera alternadamente, se trata de un movimiento antisimétrico.



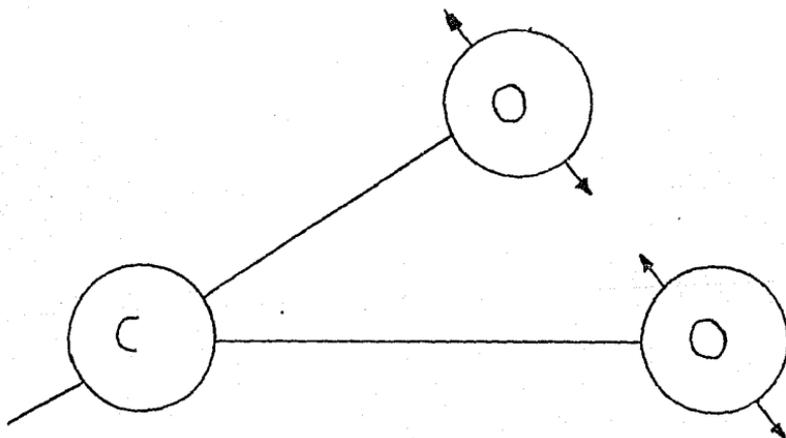
2.- Vibraciones de flexión simétricas y antisimétricas: Todos los movimientos que no sean de tensión se consideran vibraciones de deformación. Si el número total de vibraciones de una molécula es $3N-6$, se encuentra que $n-1$ son de tensión mientras que $2n-5$ son deformaciones. Para las vibraciones de flexión, si uno de los átomos se mueve hacia adentro y el otro hacia afuera, se trata de una flexión asimétrica, mientras que si los dos se mueven hacia adentro, se trata de una flexión simétrica.



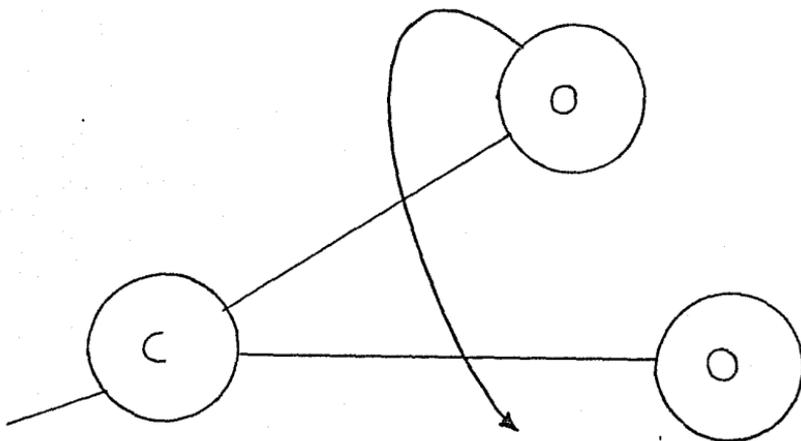
3.- Deformación de aleteo: Si los dos átomos se mueven en fase arriba y abajo del plano del átomo al que están enlazados se le llama deformación de aleteo.



4.- Deformación de balanceo: Se le llama a la que produce un cambio en el ángulo del enlace, al mismo tiempo en que los dos átomos se mueven en fase.



5.- Deformación de torsión: Se le llama al movimiento del plano de los tres átomos como una unidad sobre el enlace formado por un cuarto átomo.



INSTRUMENTACION

a.-COMPONENTES

El aparato utilizado para el desarrollo de esta técnica es un Perkin-Elmer 267 cuyo rango de operación es de $2.5\ \mu\text{m}$ a $50\ \mu\text{m}$. Este aparato consta de dos unidades, la óptica y la de registro.

Unidad óptica	{	<ul style="list-style-type: none"> -Fuente de radiación infrarroja -Monocromador -Detector
---------------	---	---

Unidad de registro	{	<ul style="list-style-type: none"> -Tablero -Graficador -Controles
--------------------	---	---

En la figura 8, se observa la trayectoria óptica y los componentes principales del espectrofotómetro. La radiación infrarroja de la fuente es reflejada por los espejos M_s y M_r para dar dos rayos idénticos que se enfocan sobre las celdas con muestra y de referencia respectivamente. La radiación transmitida por cada celda se dirige a un espejo dividido en sectores S_m . En un instante dado, este espejo giratorio envía energía radiante desde la muestra a la entrada de la rendija S_e , en el siguiente instante, incide energía radiante desde la celda de referencia enfocada por el espejo M_1 . El espejo M_2 colima el haz y lo refleja a una red de difracción que, a su vez, devuelve una estrecha banda de frecuencias al espejo colimador M_2 . El espejo M_m enfoca el haz a la rendija de salida S_x y por último, desde el espejo M_5 se remite a un espejo de focalización M_6 , que envía al detector la banda seleccionada de frecuencias infrarrojas.

Cuando no hay absorción por la muestra, la cantidad de radiación que llega al detector es igual para los dos

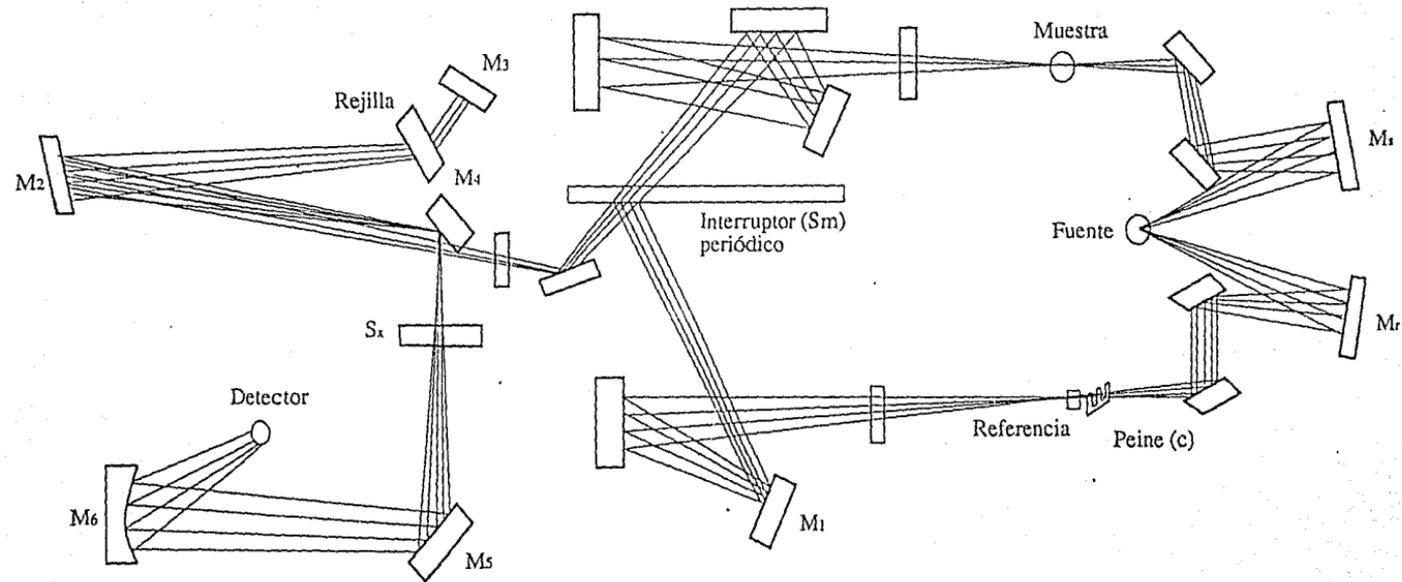


FIGURA 8

TRAYECTORIA OPTICA DE UN ESPECTROFOTOMETRO IR DE DOBLE HAZ

haces y el detector no produce ninguna señal. Sin embargo, cuando la muestra absorbe radiación, los dos haces transmitidos no son iguales y el sistema giratorio envía un pulso de frecuencias al detector. El detector transforma esta radiación incidente en una señal eléctrica pulsante de la misma frecuencia que el espejo giratorio.

La señal es amplificada y utilizada para mover un atenuador de peine C1 en el haz de referencia. Este peine reduce la cantidad de energía del haz de referencia hasta que se establece el equilibrio energético entre la muestra y la referencia y en ese momento, el detector cesa de emitir señales, accionando a su vez el mecanismo de la pluma que registra el espectro.

En la figura 9, se puede observar un diagrama general de los componentes básicos de la unidad óptica del espectrofotómetro.

Hay principalmente dos tipos de materiales que se emplean como fuente de energía radiante, pueden ser sustancias refractarias que se calientan al rojo vivo o hilo de nicromel que se calienta por resistencia hasta la incandescencia. La radiación de estos materiales se emite con una distribución de longitudes de onda características de la temperatura de los mismos. En el caso del instrumento utilizado en el laboratorio, se trata de un tubo de cerámica que es calentado por medio de un filamento metálico situado en su interior, a una temperatura de aproximadamente 12000 grados centígrados que produce un espectro de radiación continua que cubre la región de 4000 cm^{-1} hasta 200 cm^{-1} (2.5-50 μm).

La imagen enfocada sobre la rendija de entrada del monocromador (Se, fig 2) conserva toda la energía espectral emitida por la fuente, si se supone que no ha habido absorción de energía antes de entrar en el monocromador. El espejo colimador refleja en forma de radiación paralela el haz infrarrojo que atravesó la rendija de entrada y la radiación se dispersa por la rejilla en su espectro. Con ayuda del espejo (M3, fig 2) una porción estrecha de la luz dispersada se pasa de nuevo através de la rejilla, se vuelve a dispersar y se enfoca por el espejo colimador sobre la rendija de salida (Sx, fig 2). La rendija de salida permite sólo el paso de un estrecho intervalo de frecuencias de la radiación dispersada, y este intervalo de frecuencias es muy próximo a la radiación monocromática.

Los principales tipos de detectores empleados en los espectrofotómetros infrarrojos son: bolómetros,

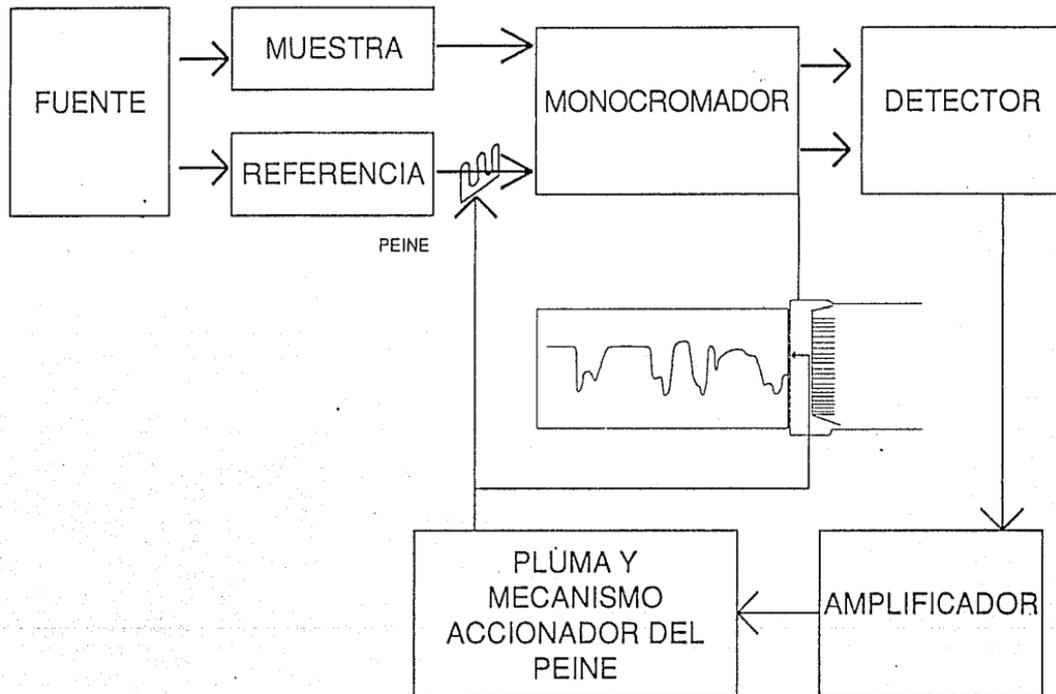


FIGURA 9

COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTOMETRO TIPICO DE IR DE DOBLE HAZ

termopares y celdas neumáticas de Golay. Todos estos dispositivos se basan en el efecto térmico producido cuando la radiación infrarroja se absorbe del haz incidente. El detector convierte la energía de radiación que incide sobre él, en un potencial eléctrico, las variaciones en el potencial eléctrico se registran en la pluma del graficador.

Este aparato utiliza un termopar de gran sensibilidad que consiste en una tira de oro ennegrecida y soldada a dos alfileres. La radiación incidente es absorbida por la hoja de oro y experimenta un aumento de temperatura. Esta diferencia de temperatura entre las uniones del termopar, es la que genera una señal de potencial termoeléctrico que a su vez mueve la pluma graficadora.

b.-PREPARACION DE MUESTRAS

Las muestras se obtuvieron usando como solventes Nujol(aceite mineral) y DMSO (dimetilsulfóxido).

El Nujol es un solvente muy utilizado en técnica IR ya que cuenta sólo con un pico de absorción alrededor de 2800 cm^{-1} y otros dos picos bien definidos en la región de 1300-1500 cm^{-1} , dejando así gran parte de la región infrarroja libre de absorción del solvente. El DMSO se utilizó ya que en el laboratorio, es usado como uno de los principales conservadores de la Nistatina en solución.

Las muestras se preparaban de manera directa en tubos de ensayo a diferentes concentraciones y posteriormente con ayuda de una jeringa provista de un adaptador en la punta se inyectaba suficiente cantidad de la muestra a la cámara de ventanas de CsI (yoduro de cesio). Se usaron ventanas de CsI por ser las únicas en existencia con el resto del equipo. Sin embargo hay ventanas de otros materiales (i.e. cloruro de sodio) que permiten analizar con mas precisión diferentes regiones del IR.(Tabla 1)

Material	Intervalos de frecuencias (cm^{-1})
NaCl	5000 - 650
KBr	1100 - 385
CsI	2000 - 200

Tabla 1

Las cámaras se armaban de la siguiente manera:

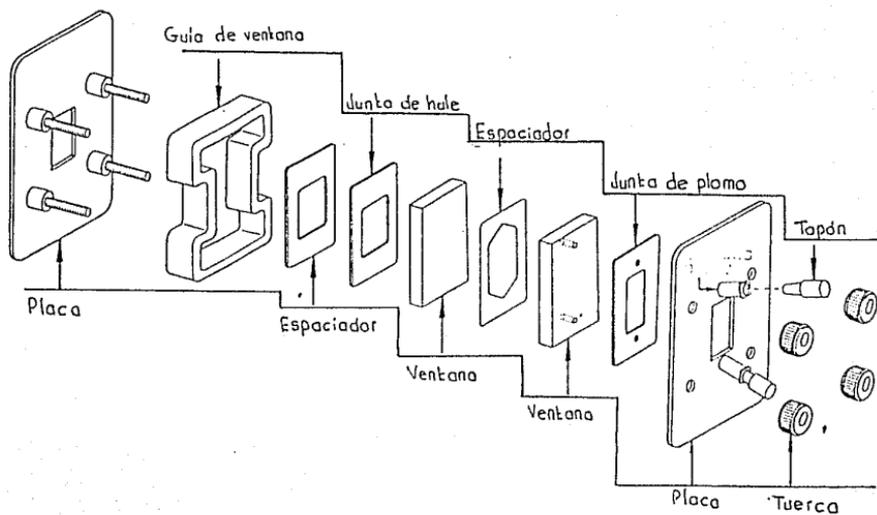


FIGURA 10

ANALISIS DE ESPECTROS

a.-CALIBRACION

La muestra que se analizó primeramente fue Nujol. Esto fue con el fin de calibrar el aparato, ya que como se mencionó anteriormente su espectro se registra usualmente dentro de la bibliografía(1,2,3).

Posteriormente se analizó la pureza de la Nistatina. Para ello se corrió un espectro de Nistatina en Nujol a una concentración de 2mg/ml, tal y como se propone en la bibliografía (3).

Una vez calibrado el espectrofotómetro y comprobada la pureza de la Nistatina en existencia en el laboratorio, se procedió a obtener los espectros.

b.- CALCULO DE FRECUENCIAS DE VIBRACION

Cuando se cuenta con una gran experiencia analizando espectros, se puede tener una buena idea de la región de absorción de una muestra sin necesidad de obtener su espectro; sin embargo, teóricamente se puede calcular la región del espectro correspondiente a la absorción de un par de átomos. Para ello es necesario conocer las masas de los átomos y la constante de fuerza del enlace. Con esta información se emplea la ley de Hooke para el oscilador armónico (cap. 2), y se calcula una frecuencia de vibración aproximada. Estos cálculos son simplificados y nos dan sólo una primera aproximación razonable de la posición de la vibración del par de átomos.

Si la ecuación IX se modifica para expresar como frecuencia en número de onda (cm-1), como la masa reducida del par de átomos (calculada a partir de los pesos atómicos en gramos), y k como la constante de fuerza en unidades de 10 dinas/cm la ecuación se puede reescribir como

$$\sqrt{\nu_{cm-1}} = [307] \sqrt{k/m} \quad (xiv)$$

En este caso se procedió a calcular (sustituyendo en XIV) la frecuencia en número de onda para los enlaces O-H, N-H y C-H.

1.- O-H

Constante de fuerza= 7.66

$$\mu = \frac{m_o m_H}{m_o + m_H} = 0.95$$

$$\therefore \nu_{(O-H)} = 1307 \sqrt{7.66/0.95} = 3711$$

2.- N-H

Constante de fuerza=6.35

$$\mu = \frac{m_H m_N}{m_H + m_N} = 0.942$$

$$\therefore \nu_{(N-H)} = 1307 \sqrt{6.35/0.942} = 3393$$

3.- C-H

Constante de fuerza=5.15

$$\mu = \frac{m_c m_H}{m_c + m_H} = 0.932$$

$$\therefore \nu_{(C-H)} = 1307 \sqrt{5.15/0.932} = 3072$$

Como las absorciones debidas a estos enlaces, se pueden encontrar en un espectro IR de Nistatina en Nujol, se procedió igualmente a obtener el espectro correspondiente. (Espectro A)

c.- INTERPRETACION DE ESPECTROS INFRARROJOS.

Originalmente, la idea era obtener espectros de Nistatina en diferentes solventes, y algunos de estos eran Decano, Dimetilsulfoxido (DMSO), Metanol y Nujol. Sin embargo, debido a que el Decano y el Metanol reaccionaban daffando las cámaras del equipo, se utilizaron unicamente como solventes al DMSO y Nujol.

Para poder realizar una interpretación de la Nistatina en DMSO y Nujol, es necesario conocer las regiones de absorción de los grupos funcionales de los solventes y el soluto. A continuación se presenta la discusión de los grupos y las regiones.

ALCANOS

Vibraciones de tensión de carbono-hidrógeno

Todos los compuestos orgánicos tienen bandas entre 3100 y 2750 cm^{-1} debidas a las vibraciones de tensión del carbono-hidrógeno.

Vibraciones de flexión de carbono-hidrógeno

Las vibraciones de deformación de los grupos C-H muestran una banda de absorción en la región de 1460 a 1470.

AMINAS

Vibraciones de tensión del nitrógeno-hidrógeno

Las aminas primarias, tanto alifáticas como aromáticas, muestran vibraciones de tensión del -NH_2 similares a las del grupo metileno (CH_2). Se observa una absorción de tensión asimétrica del N-H cerca de 3490 cm^{-1} . La banda de tensión simétrica del N-H absorbe cerca de 3400 cm^{-1} .

Vibraciones de flexión de nitrógeno-hidrógeno

Aparece una banda entre 1640 y 1560 cm^{-1} y otra segunda difusa y ancha entre la región de 900 a 650 cm^{-1} . Ambas bandas se deben a la deformación del N-H.

ACIDOS CARBOXILICOS

La vibración de tensión del O-H del ácido monómero absorbe cerca de 3595 cm^{-1} . La forma dimerizada muestra una banda ancha de tensión en la región de 3000 a 2500 cm^{-1} . Normalmente esta es la región de tensión del C-H y es típica de los ácidos carboxílicos.

COMPUESTOS DE AZUFRE

Vibraciones de tensión de azufre-oxígeno del grupo S=O absorben en la región de 1080 a 1000.

Una vez que se ha consultado las regiones en donde se deben esperar las absorciones de los compuestos, se procede a interpretar algunos espectros.

El espectro 1 es Nujol y podemos observar la banda de absorción de 3000 a 24000 cm^{-1} producida por la tensión de C-H. La flexión del C-H presenta el pico en 1420 y la banda entre 1350 y 1300 cm^{-1} . La banda en 720 cm^{-1} es producida por la vibración del metileno.

El espectro 2 es Nistatina en Nujol y se puede observar un gran ensanchamiento en la banda principal del Nujol y esto se debe a la contribución de los grupos OH de tensión de la Nistatina (3900 a 3600 cm^{-1}) y de NH₂ de 3500 a 3000.

El DMSO está representado por el espectro 3. Entre 3100 y 2800 cm^{-1} se encuentran sus dos bandas características. La primera se debe a la tensión asimétrica del CH₃ y la segunda a la tensión simétrica. La banda entre 1250 y 1450 cm^{-1} es producida por la flexión del CH₃. La banda entre 1050 y 800 cm^{-1} se debe a la deformación de balanceo del grupo CH₃.

En el espectro 4 que es de Nistatina en DMSO se observa que las dos bandas del DMSO entre 3100 y 2800 cm^{-1} se uniformizan debido a la contribución de absorción en la misma región del grupo NH_2 de la Nistatina.

d.-Ley de Beer-Lambert

Se puede decir que en general, la determinación cuantitativa de un componente específico de una mezcla se realiza por comparación de la intensidad de una banda determinada de absorción con la misma banda del componente puro en disoluciones de concentración conocida. Puesto que el método espectrofotométrico de IR registra la intensidad relativa de luz que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra, se necesita conocer la relación entre la radiación que alcanza el detector y la concentración del componente en solución antes de realizar un análisis cuantitativo. A esta relación se le conoce como ley de Beer-Lambert o ley de Beer; esto se debe a que la primera formulación de las leyes de absorción las realizó Lambert en 1730 y hasta 1850 Beer la hizo extensible a concentraciones variables.

Una de las formas en que se puede expresar la ley de Beer-Lambert es:

$$A = \log P_0/P = abc$$

donde A= la absorbancia de la muestra
 P_0 = la radiación incidente en la muestra
 P = la radiación transmitida por la muestra
 a = la absorcividad de un componente a una longitud de onda particular (constante)
 b = el espesor de la celda
 c = la concentración del componente

Teóricamente se podría considerar que a es una función única del componente en cuestión a una frecuencia para la cual está determinada y una gráfica de absorbancia (A) contra concentración (c) debería ser una línea

recta. Sin embargo, generalmente esta aseveración no es correcta ya que la gráfica solo es recta en un rango pequeño de concentraciones.

En la práctica la constante a es una función de las condiciones de operación así como del componente y la frecuencia. Por lo tanto esta constante debe ser determinada para un tipo de muestra específico, a una frecuencia específica, bajo condiciones de operación específicas.

Quando la gráfica absorbancia contra concentración no es una línea recta a través de un gran intervalo de concentraciones se debe principalmente al comportamiento no ideal de la muestra. En muchos de los casos, las desviaciones en la línea recta se deben a interacciones moleculares tales como la asociación de las moléculas del soluto entre sí o con moléculas del solvente. {1,2}

El propósito es estudiar algunos espectros de Nistatina en Nujol y DMSO a distintas concentraciones y así determinar la probable formación de complejos Nistatina-Nistatina o Nistatina-solvente.

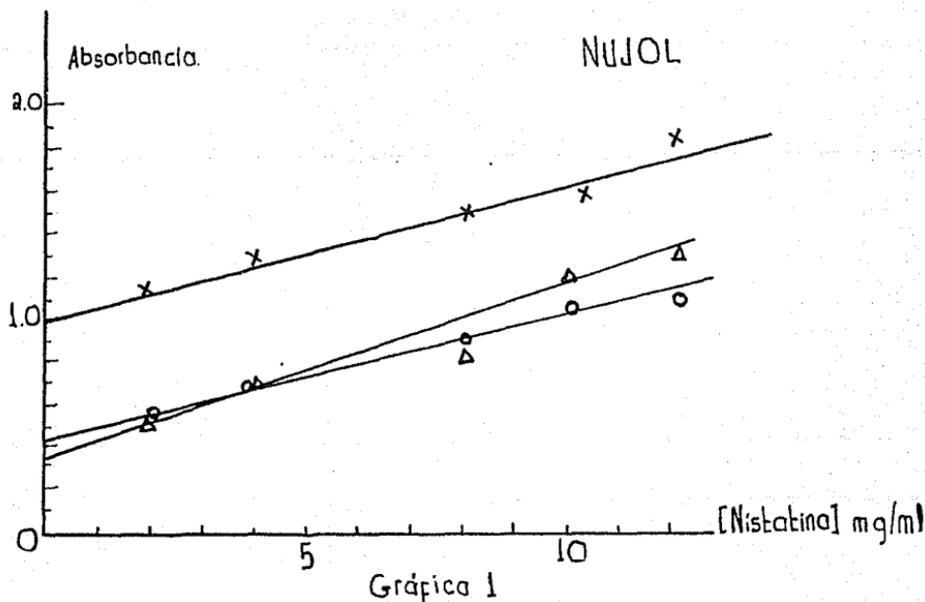
Los espectros se obtuvieron a las siguientes concentraciones de Nistatina:

a.- Para el Nujol se corrieron espectros para concentraciones de 2,4,8,10 y 12 mg/ml

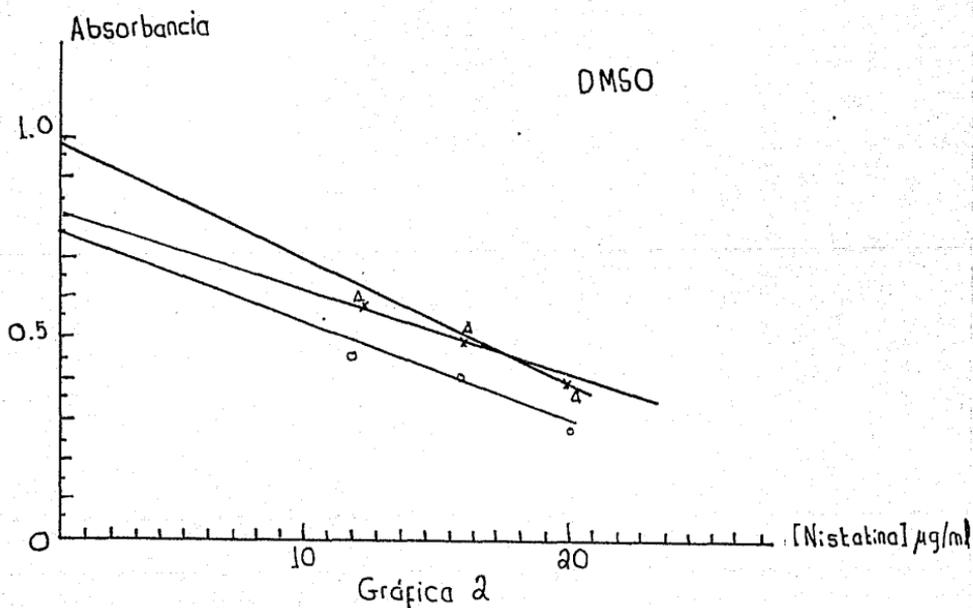
b.- En DMSO se obtuvieron espectros con concentraciones de 1.2,2.4,4.8,7.2, y 9.6 mg/ml y 12,16 y 24 g/ml

Después de correr los espectros a las concentraciones indicadas, se escogieron algunos de los picos mejor definidos en los espectros y se midieron los valores de absorbancia en la longitud de onda para las diferentes concentraciones y se graficaron, es decir, los resultados se presentaron en una gráfica absorbancia en una longitud de onda específica vs. concentración de Nistatina.

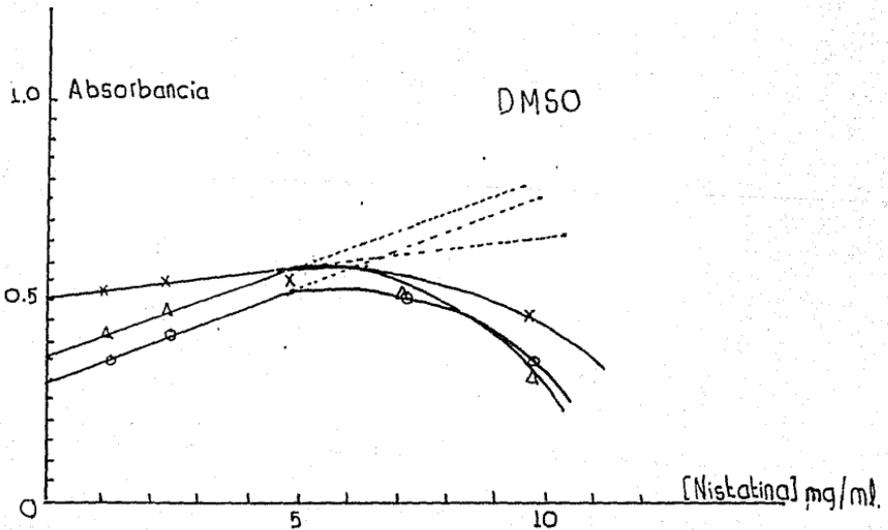
[N] mg/ml	Absorbancia		
	355 μm	694 μm	735 μm
2	1.1 ± 0.05	0.55 ± 0.01	0.5 ± 0.01
4	1.3 ± 0.05	0.7 ± 0.01	0.7 ± 0.01
8	1.5 ± 0.05	0.85 ± 0.05	0.8 ± 0.01
10	1.6 ± 0.05	0.95 ± 0.05	1.1 ± 0.05
12	1.9 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.3 ± 0.05
	$m=0.067$	$m=0.05$	$m=0.075$
	$b=0.967$	$b=0.45$	$b=0.35$



[N] $\mu\text{g/ml}$	Absorbancia		
	263 μm	513 μm	633 μm
12	0.47 \pm 0.01	0.6 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01
16	0.39 \pm 0.01	0.52 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01
20	0.28 \pm 0.005	0.37 \pm 0.01	0.43 \pm 0.01
	m = -0.0238	m = -0.0288	m = -0.0188
	b = 0.76	b = 0.9567	b = 0.867



[NI mg/ml]	Absorbancia		
	263 μm	513 μm	633 μm
12	0.35 \pm 0.01	0.4 \pm 0.01	0.52 \pm 0.01
24	0.41 \pm 0.01	0.47 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01
48	0.53 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01
72	0.45 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01
96	0.34 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.46 \pm 0.01
	m=0.005	m=0.004	m=0.0005
	b=0.29	b=0.36	b=0.51a



Gráfica 3

CONCLUSIONES

Al observar el espectro A, se encuentran las líneas predichas teóricamente para el par de átomos, sin embargo, puesto que el cálculo de la frecuencia de vibración del par de átomos solo refleja sus masas y la constante de fuerza del enlace que los une, debería esperarse que las absorciones correspondientes aparecieran en una línea en lugar de en una región. Lo que sucede es que las vibraciones del par se ven afectadas por las estructuras moleculares unidas a ambos átomos. Este efecto estructural se refleja en los desplazamientos de las bandas de absorción en zonas relativamente estrechas del espectro (Tabla 1).

Al interpretar los espectros 1-4 se muestra la confiabilidad de la técnica IR, para reconocer muestras, ya que los espectros dan suficiente información sobre los grupos funcionales como para poder identificar enteramente a la solución. Por otro lado, también se puede observar la gran contribución en la absorbancia de los grupos hidroxilo y amina de la Nistatina. (Espectr. 2,4)

En este punto es necesario reconocer que un argumento en contra del uso de la espectroscopia IR en el estudio de sistemas biológicos puede ser la complejidad de las moléculas; ya que de acuerdo a la discusión del capítulo 2, las vibraciones normales de una molécula de N átomos es $3N-6$, además de las bandas no fundamentales (armónicos, tonos de combinación, etc.). De aquí que la superposición de bandas de absorción dificulta la identificación de una línea en particular. En el caso de la Nistatina, simplemente el número de bandas fundamentales es 219, ya que su molécula cuenta con 75 átomos.

Al analizar las medidas de absorbancia de los picos a las longitudes indicadas en los espectros B y C obtenidos observamos que la solución Nistatina-Nujol se comporta de acuerdo a una relación tipo Beer-Lambert por lo que no se encuentra evidencia para suponer que exista alguna asociación de moléculas ya sea de Nistatina-Nistatina ó Nistatina-Nujol.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

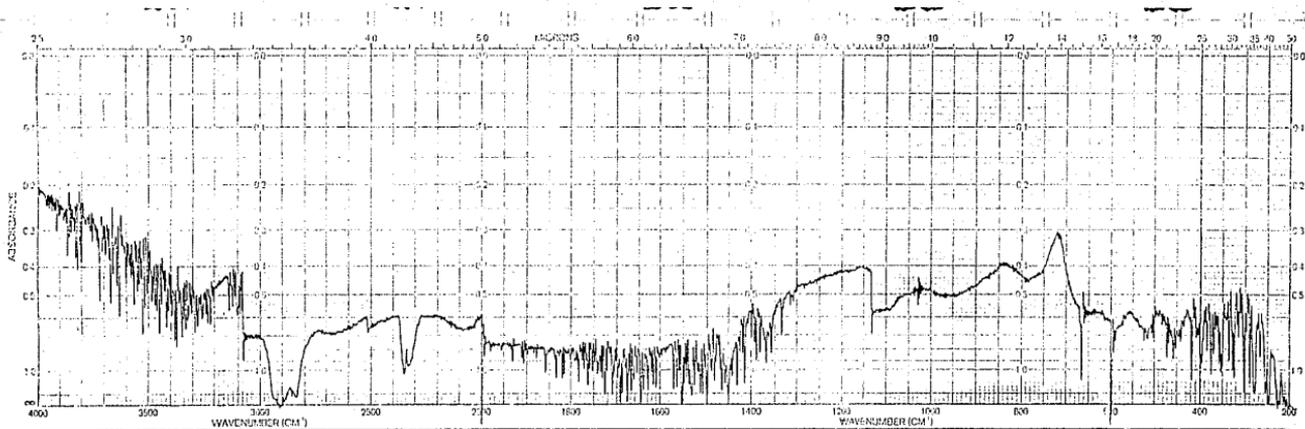
La solución Nistatina-DMSO a altas concentraciones muestra desviaciones del modelo Beer-Lambert que se deben probablemente a la formación de agrupaciones micelares. Esta interpretación se ha confirmado recientemente por dispersión UV de soluciones de Nistatina, que aparentemente forman dímeros dentro del rango de concentraciones fisiológicas (16). La formación de agregados micelares de mas alta molecularidad que absorben menos luz, produciría la disminución que se observa en la desviación de los puntos del comportamiento lineal. A bajas concentraciones de Nistatina en DMSO la absorbancia baja debido a que disminuye la actividad del solvente.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- R.T. CONLEY, Espectroscopia Infrarroja, Alhambra, Madrid, 1979.
- 2.- N.L. ALPERT, W.E. KEISER y H.A. SZYMANSKI, IR-Theory and Practice of Infrared Spectroscopy, Plenum-Rosetta, New York, 1970.
- 3.- D. DOLPHIN y A.E. WICK, Tabulation of Infrared Spectral Data, John Wiley and Sons, New York, 1977.
- 4.- G.M. BARROW, Introduction to Molecular Spectroscopy, Instituto Cubano del Libro, 1972.
- 5.- S.H. PINE, J.B. HENDICKSON, D.J. CRAM y G.S. HAMMOND, Química Orgánica, McGraw-Hill, 1982.
- 6.- G. HERZBERG, Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, Van Nostrand, 1945.
- 7.- M. ALONSO y E.J. FINN, Física, Interamericana, 1982.
- 8.- D.R. BROWNING, Espectroscopia, Toray-Masson, 1971.
- 9.- W.S. SAWYER, Methods of Studying Membrane Fluidity, Allan R. Lies, 1984.
- 10.- A. CASS, A. FINKELSTEIN y V. KRESPI, Journal of General Physiology, 56 (1970) 100.
- 11.- W.J. BAILEY y R.B. FOX, Journal of Organich Chemistry, 28 (1963) 531.
- 12.- V.C. FARMER y R.H. THOMSON, Spectrochimica Acta, 16 (1960) 559.
- 13.- S. GALINA, S. LABIANO y R. RIDAURA, Análisis Infrarrojo de Nistatina en diferentes solventes, Memorias del XXX Congreso Nacional de Física, Mérida, 1987.
- 14.- S. GALINA, S. LABIANO y R. RIDAURA, Medida de absorbancia de Nistatina en diferentes solventes, Memorias del XXXI Congreso Nacional de Física, Monterrey, 1988.

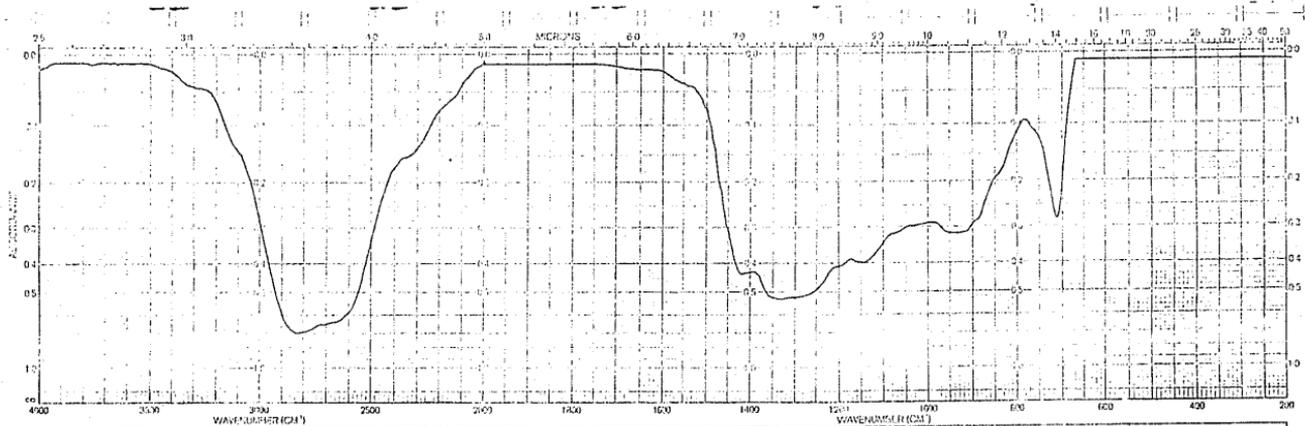
15.- S. GALINA, S. LABIANO y R.RIDAURA, Análisis de frecuencias de vibración en soluciones de Nistatina, Memorias del XXXII Congreso Nacional de Física, León, 1989.

16.- S.GALINA, S.LABIANO, A.TRIGO y S.URIBE, Nistatina y Anfotericina B: Conformaciones en solución y efectos en Membranas Artificiales, Memorias del XXXII Congreso Nacional de Física, León, 1989.



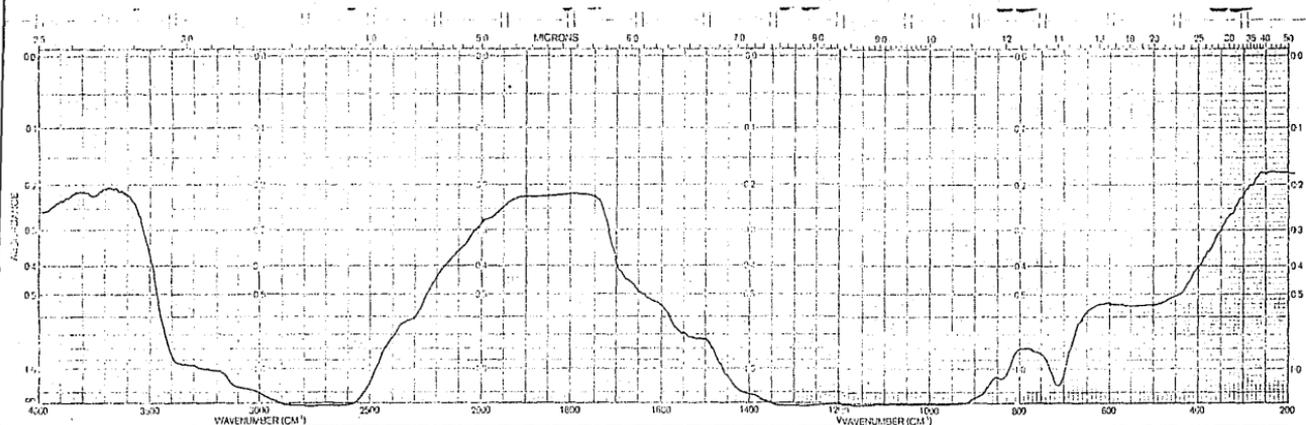
SAMPLE _____	SOLVENT _____	REMARKS _____	SCAN MODE _____	OPERATOR _____
CONCENTRATION _____	CELL PATH _____		SPLIT _____ TIME CONSTANT _____	DATE _____
ORIGIN _____	REFERENCE _____		PIETKIN ELMER'S PART No S100 4358	RLF No _____

ESPECTRO A

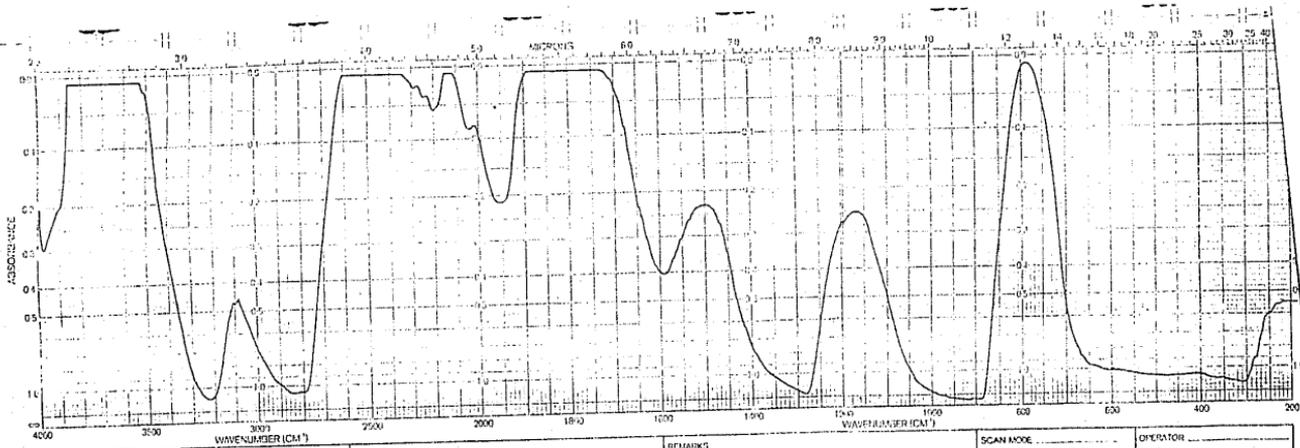


SAMPLE	SOLVENT	NEWMARKS	SCAN MODE	OPERATOR
			SPLIT	DATE
ORIGIN	CONCENTRATION		PERKIN ELMER	REF No.
	CELL PATH		PART No. 5110 426A	
	REFERENCE			

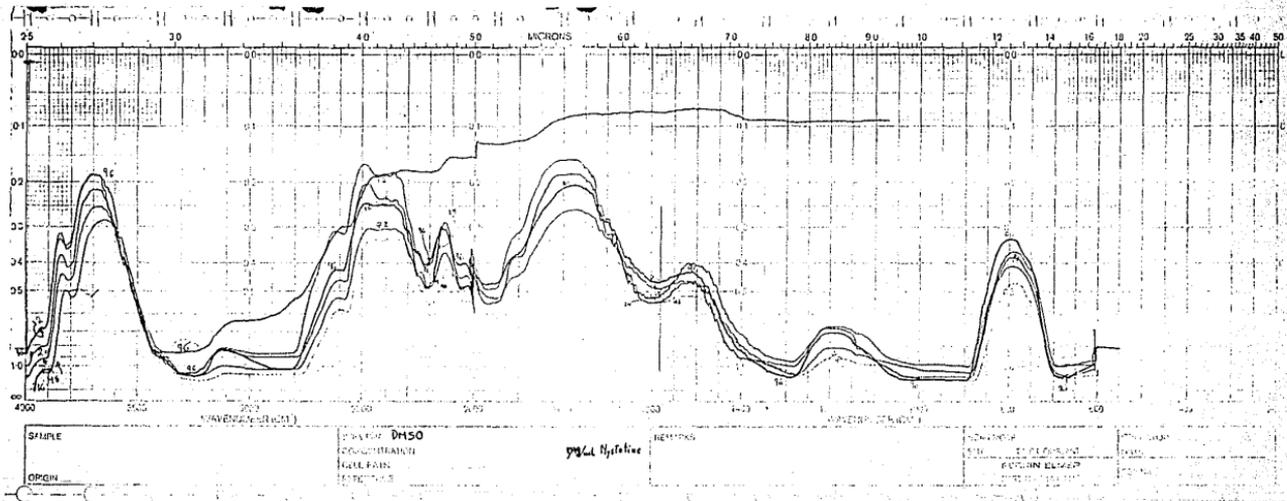
ESPECTRO 1



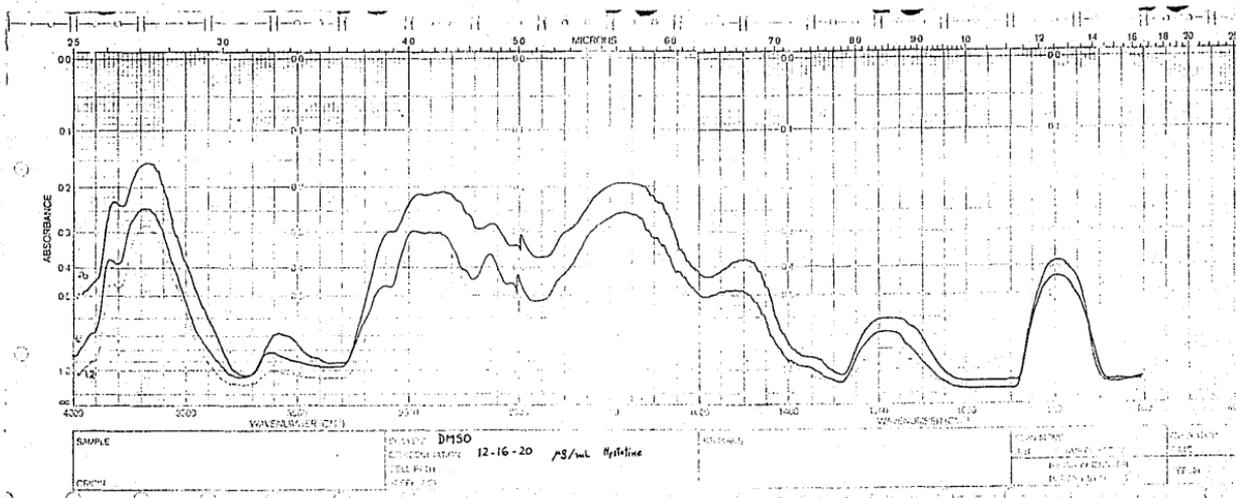
SAMPLE	SOLVENT	WAVENUMBER	SCALE	OPERATOR
	CONCENTRATION		SPLIT	DATE
ORIGIN	CELL PATH		TIME CORRECTED	
	REFERENCE		PERFORMER	REF No.
			PART No. 5100 4368	



SAMPLE		REMARKS		SCAN MODE	OPERATOR
SOLVENT				SLIT	DATE
CONCENTRATION				PERKIN ELMER	
CELL PATH				PART No. 5159 4316	
REFERENCE				REF No.	



ESPECTRO 5



ESPECTRO 6