

Espectroscopía de Raman en Carbohidratos

Martínez Mendoza Ángel Michell* y Pilatowsky Cameo Saúl**
*Laboratorio de Física Contemporánea II, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología,
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
 Av. Universidad 3000, Circuito Exterior S/N. Delegación Coyoacán, C.P. 04510,
 Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México.*

(Dated: Octubre 24, 2018)

Resumen

Los carbohidratos son compuestos extendidos que se forman naturalmente y forman parte de los constituyentes esenciales para los organismos vivos. Los carbohidratos sirven como fuentes de energía y como componentes estructurales esenciales para los organismos; además, forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos los cuales contienen la información genética de los seres. Los estados vibracionales que presenta una molécula dependen de su estructura y conformación. Al conjunto de energías asociadas a los estados vibracionales de una molécula se le conoce como el espectro (Raman) de la molécula. Encontrar estos espectros resulta tener una gran utilidad en la identificación de sustancias en diferentes compuestos. En este trabajo reportamos los espectros vibracionales obtenidos de los sacáridos Sacarosa, D-(-)-Fructuosa, D-(+)-Maltosa, α -Lactosa y D-(+)-Galactosa. Se logró caracterizar los espectros de todos los compuestos a partir de publicaciones anteriores y simulaciones utilizando el método de Hartree-Fock.

Palabras clave:

Espectro vibracional - Estructura molecular - Sacáridos

I. INTRODUCCIÓN

A. Vibraciones dentro de una molécula

Una molécula está compuesta por un arreglo de átomos. Éste está determinado por la fuerza electromagnética debida a las distribuciones de carga dentro de ella. En el estado de base, la molécula está estática. Sin embargo, existen estados de excitación con energías asociadas más altas debido modos vibracionales de las diferentes componentes de la molécula. Éstos se conocen como estados vibracionales de la molécula.

Existen seis diferentes modos básicos de vibración mostrados en la figura 1. Cada estado vibracional corresponde a una mezcla de éstos. Para caracterizarlos, se buscan los modos dominantes y se denota el movimiento con una letra ν , ν_s , ν_a , β , δ , ρ , ω o τ como se muestra en la figura 1.

B. Espectroscopía Raman

Los estados vibracionales que presenta una molécula dependen de su estructura y conformación. Al conjunto de energías asociadas a los estados vibracionales de una molécula se le conoce como el espectro (Raman) de la molécula. Encontrar estos espectros resulta tener una

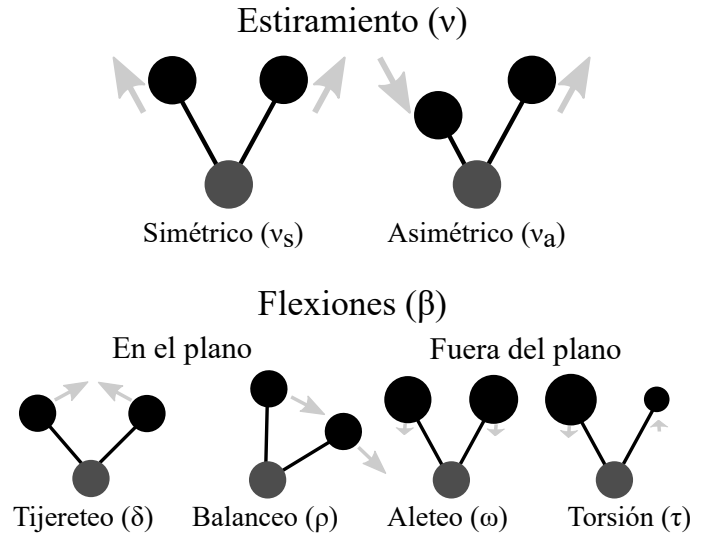


Figura 1. Esquema de los diferentes modos vibracionales de un arreglo de tres átomos.

gran utilidad en la identificación de sustancias en diferentes compuestos.

Para poder medir los espectros de una sustancia, se hace incidir luz monocromada de cierta longitud de onda λ_0 sobre la muestra. Si el estado base corresponde a la energía $E_0 = 0$, la luz excitará a la molécula a un estado virtual con energía $E_{\lambda_0} = \frac{hc}{\lambda_0}$. Donde h es la constante de Plank y c la velocidad de la luz en el vacío. Dado que el estado virtual asociado a E_{λ_0} no corresponde a un estado real de la molécula, ésta pronto decaerá a un estado

* miichmtz@ciencias.unam.mx

** saulpilatowsky@ciencias.unam.mx

excitado de energía E_1 , emitiendo un fotón de energía $E_{\lambda_1} = E_{\lambda_0} - E_1$ de longitud de onda $\lambda_1 = \frac{hc}{E_{\lambda_1}}$. Si detectamos un fotón con tal longitud de onda, podemos saber que el estado E_1 corresponde a un estado vibracional de la molécula.

El caso $E_1 = E_0$ se conoce como dispersión Rayleigh. Dado que no cambia la energía del fotón incidente y emitido, se dice que es dispersión elástica. Resulta que ésta es la dispersión dominante, y, dado que no aporta información sobre los estados vibracionales de una muestra, se suele filtrar antes de llegar al detector. El caso inelástico $E_1 > E_0$ se conoce como dispersión Raman. Es importante observar que la medición de E_1 no depende de la longitud de onda incidente λ_0 . Esto resulta muy útil pues permite escoger una longitud de onda adecuada para estudiar cada muestra. Por ejemplo, es conveniente escoger longitudes de onda donde la muestra no muestre fluorescencia.

Los espectros Raman suelen reportarse en términos, no de la energía de E_1 , sino del número de onda asociado $\tilde{\nu} = \frac{E_1}{hc}$ en cm^{-1} .

C. Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos extendidos que se forman naturalmente y forman parte de los constituyentes esenciales para los organismos vivos. Los carbohidratos sirven como fuentes de energía y como componentes estructurales esenciales para los organismos; además, forman parte de la estructura de los ácidos nucleicos los cuales contienen la información genética de los seres.

Estos compuestos se dividen en cuatro grupos principales: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. La mayoría de los monosacáridos, o simplemente azúcares, se encuentran en moras, otras frutas, y la miel por ejemplo. A pesar de que contienen de tres a nueve átomos de carbono, los más comunes están compuestos por cinco o seis carbonos unidos en una forma de cadena molecular. Tres de los azúcares más importantes-glucosa (también conocida como dextrosa, azúcar de mora, y azúcar de maíz), fructuosa (azúcar de fruta), y galactosa-tienen la misma fórmula molecular, ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), pero, debido a que sus átomos tienen diferentes arreglos estructurales, los azúcares tienen características distintas, i.e., son isómeros.

La energía en los enlaces químicos de la glucosa provee indirectamente la mayoría de las cosas vivas con la cantidad de energía necesaria para llevar a cabo sus actividades. La galactosa, que es raramente encontrada como un azúcar simple, se encuentra típicamente combinada con otros azúcares simples para formar moléculas más grandes.

Dos moléculas de azúcar simple que se encuentran ligadas la una a la otra forman un disacárido, o azúcar doble. El disacárido sacarosa, o azúcar de mesa, consiste de una molécula de glucosa y una molécula de fructosa; la fuente más familiar de sacarosa es el dulce de betabel

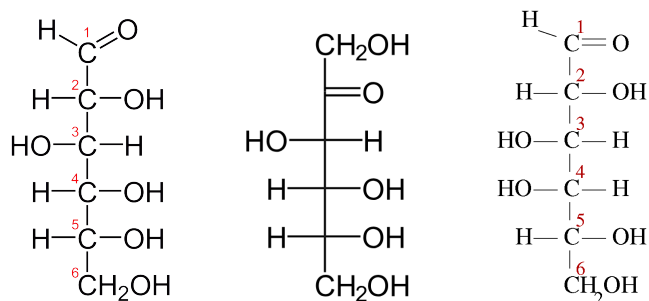


Figura 2. Estructuras de cadena abierta de los monosacáridos principales. (De izquierda a derecha: Glucosa, Fructosa y Galactosa)

y el azúcar de caña. El azúcar de leche, o lactosa, y la maltosa también son disacáridos.

D. Monosacáridos

Los monosacáridos, de acuerdo a la IUPAC, constituyen los grupos de carbohidratos mas simples compuestos de una sola unidad sin ningún enlace glucosídico a otras unidades. Químicamente se representan aldehidos polihidroxídicos o cetonas con tres o más átomos de carbono. [3] Los monosacáridos pertenecen a subgrupos definidos de acuerdo al número de átomos de carbono (e.g., tetrosas, pentosas, etc.), el tipo de grupo carbonilo (aldosas, cetonas) o actividades quirales. [5] En general, son incoloros, sólidos cristalinos, insolubles en solventes no polares y la mayoría de ellos tienen sabor dulce. Los monosacáridos son parte importante de compuestos que tienen un rol crucial en muchos procesos biológicos, e.g. 2-desoxiribosa es parte de los nucleótidos mientras que la glucosa es un combustible ubicuo en la biología y la unidad básica para los oligo y polisacáridos. [4] En esta sección, 2 de los monosacáridos más comunes en la naturaleza (D-(-)-fructuosa y D-(+)-galactosa) son descritos en detalle.

La espectroscopía vibracional es lo suficientemente sensible para distinguir los monosacáridos, incluso si estos coexisten en una mezcla. Por ejemplo, se ha implementado espectroscopía de Raman e IR para un análisis cuantitativo de fructosa y glucosa presentes en muestras de miel. [6]

1. Fructuosa

D-Fructuosa es un miembro bien conocido de la familia de las cetonas. Es un monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa, ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), pero con diferente estructura, es decir, es un isómero de esta (ver Figura 4). Es una cetohehexosa (6 átomos de carbono y un grupo cetona). Su nombre sistemático es 1,3,4,5,6 pentahidroxi-2-hexanona. Es levógira y tiene tres carbonos asimétricos. En disolución acuosa se encuentra predominantemente en la forma β -prianosa y en la forma β -furanosa.

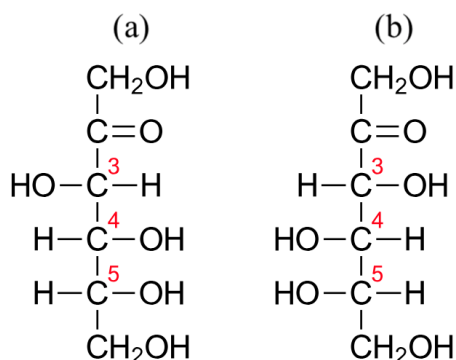


Figura 3. Isómeros de la fructosa: (a) D-Fructosa y (b) L-Fructosa. (Forma de cadena abierta)

La fructosa cristalina adopta una estructura cíclica que le provee de estabilidad de sus enlaces internos de hidrógeno y hemiacetales. Esta forma es comúnmente llamada formalmente D-fructofuranosa. Durante el proceso

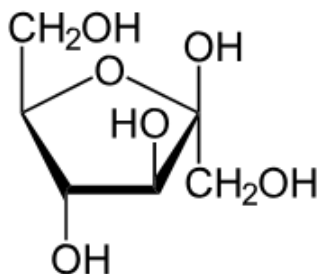


Figura 4. Proyección de Hamworth de la β -D-fructofuranosa (D-fructosa)

metabólico de poliol, la fructosa se sintetiza a partir de la glucosa en los vesículos seminales y es secretada en el semen como una fuente de mayor energía. El semen humano es una mezcla de muchos componentes (fructosa, albumen, lisosima, lactato y urea). [9] en particular, la región de Raman entre 800 y 850 cm^{-1} con bandas asignadas a las vibraciones de stretching CC [8, 11] se han encontrado mediante el uso de detección de fructosa en muestras de semen. [7, 10]

2. Galactosa

La galactosa es un azúcar monosacárido cuya molécula difiere de la glucosa por una diferente orientación del grupo hidroxilo en el C-4 (ver Figura 5). La Galactosa existe en formas de cadena abierta y cíclica. Cuatro isómeros son cíclicos, dos de los cuales con un anillo pirano (seis carbonos), de las cuales la más común es la forma cristalina de la α -D-Galactopiranososa.

El grupo hidroxilo con diferente orientación en el carbono 4 de la estructura de la D-(+)-galactosa en comparación con la D-(+)-glucosa resulta en diferencias impor-

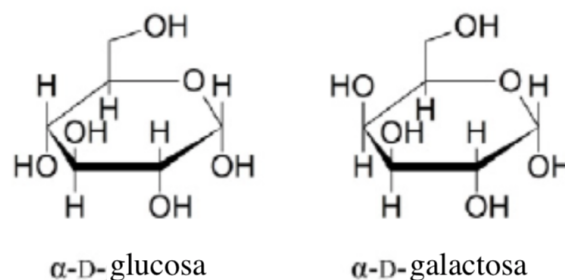


Figura 5. Diferencias entre la molécula de la glucosa y galactosa en su forma cristalina.

tantes en las posiciones e intensidades de muchas bandas en los espectros Raman. [2]

E. Disacáridos

Los disacáridos constan de dos monosacáridos unidos por un enlace glucosídico. Se forman mediante la reacción de condensación y se pueden romper a través de hidrólisis catalizada por enzimas del grupo disacaridasas. En los organismos vivos sirven como una fuente de energía a través de proveer los monosacáridos. Los disacáridos más comunes son la sacarosa, maltosa y lactosa. [12]

1. Sacarosa

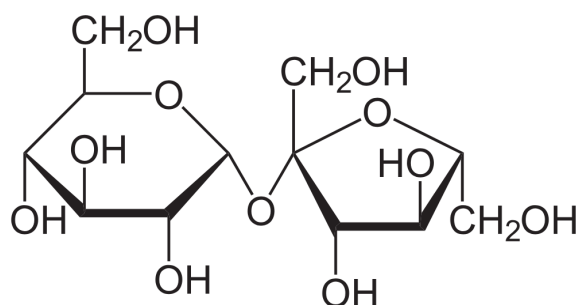


Figura 6. Molécula del disacárido sacarosa formada por una molécula de glucosa (izquierda) y una molécula de fructosa (derecha).

La estructura cristalina y molecular de la sacarosa ((2-[3,4-dihidroxi-2,7-bis(hidroximetil)oxalano-2-il]oxi-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol) se ha determinado a partir de reflexión de rayos [13, 14] y análisis de difracción de neutrones. Por largo tiempo, un número considerable de experimentos relacionados con la sacarosa han sido publicados debido a sus múltiples aplicaciones. Sus soluciones acuosas se usan generalmente para regular las

propiedades físicas de los alimentos congelados en la comida industrial [15] y para calcular el potencial osmótico de las plantas. [16] Se ha observado [17] mediante el uso

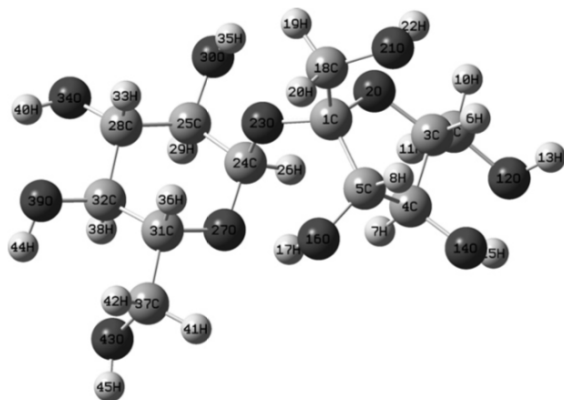


Figura 7. Modelo tridimensional de la estructura de la sacarosa a partir de modelos computacionales. [17]

de espectroscopía de Raman que en la sacarosa existe un corrimiento hacia frecuencias altas inducidas por presión en los modos asociados con las vibraciones CH, CO y CC. Existen bandas bien definidas debido a estiramiento del OH alrededor de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ y las bandas asociadas a los OH no ligados de la sacarosa para bajas frecuencias, indicando la formación de enlaces de hidrógeno inducidos por presión.

2. Lactosa

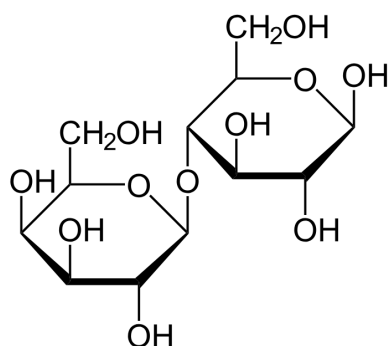


Figura 8. Molécula del disacárido lactosa formada por una molécula de galactosa (izquierda) y una molécula de glucosa (derecha).

El azúcar de leche, mejor conocida como lactosa tiene el nombre químico de 4-O- β -D-Galactopiranosil- α -D-glucopiranosil. Diferentes estudios muestran que estructuralmente en solución acuosa este disacárido posee dos isómeros, α y β .

Ambos isómeros tienen diferentes solubilidades en el agua y solo difieren en la orientación del grupo OH en

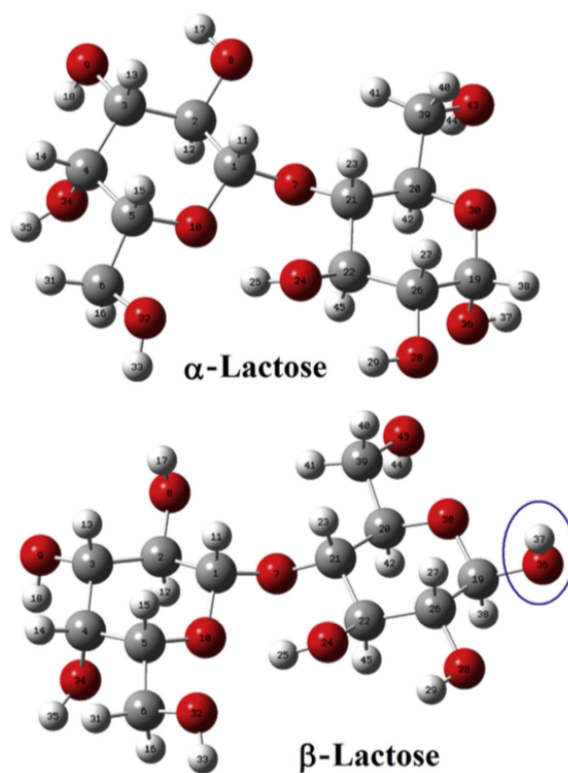


Figura 9. Modelo tridimensional de la estructura de la α y β lactosa a partir de modelos computacionales. [22]

el carbono C1 de la glucosa y, la proporción de cada uno es determinado por la temperatura. [18] Por tanto, los estudios de las propiedades fisicoquímicas de diversos sistemas de lactosa en agua o en diferentes solventes son de interés de la industria y la farmacéutica para conocer las interacciones solvente-soluto y soluto-soluto y el tipo de sistemas formados. [19–21]. En particular, la inter-conversión de soluciones de lactosa y los procesos de cristalización son características importantes en la fabricación de lactosa compresible en tabletas. [19, 20] Dentro de este contexto, una técnica fácil y común para identificar y cuantificar los diferentes sistemas con lactosa es la espectroscopía vibracional, como se reporta en la literatura. [23–25]

3. Maltosa

La maltosa es un disacárido formado por dos glucosas unidas por un enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow4)$. El enlace entre las dos moléculas de glucosa se establece entre el oxígeno del carbono anomérico (proveniente de -OH) de una glucosa y el oxígeno unido al cuarto carbono de la otra. Su nombre completo es, por ello, α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosil. Al producirse dicha unión se desprende una molécula de agua y ambas moléculas de glucosa quedan unidas mediante un oxígeno que actúa como puente (enlace glicosídico). La maltosa presenta el OH

hemiacetalico libre (en la segunda glucosa) por lo que es un azúcar reductor que da la reacción de Maillard y la reacción de Benedict.

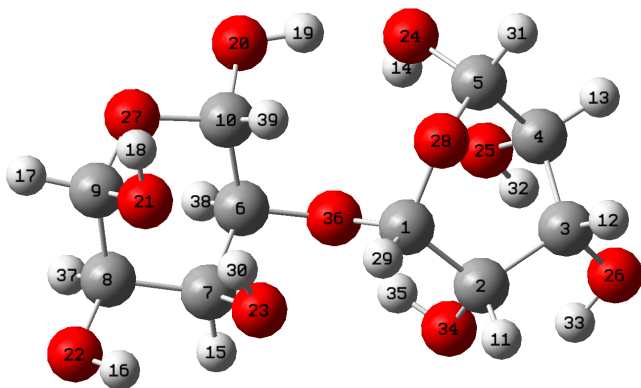


Figura 10. Molécula de maltosa.

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se utiliza un equipo Thermo Nicolet Almaga XR con un láser de $\lambda = 532$ nm. Para calibrar, se introduce una muestra de silicio cuyo espectro Raman consiste en un único pico en 521 cm^{-1} . La diferencia entre el pico medido y este valor se resta a todas las mediciones subsiguientes. Se tomaron espectros de muestras de Sacarosa, D-(-)-Fructuosa, D-(+)-Maltosa, α -Lactosa y D-(+)-Galactosa. Para cada una, se obtuvo un espectro con el objetivo de 10x y con el de 100x. Luego se determinó en cuál espectro los picos eran más visibles y había menos ruido, y entonces se tomaron otras cuatro mediciones con el objetivo correspondiente.

Las asignaciones de todas las muestras salvo la maltosa se realizaron basándose en artículos publicados.

El análisis de la maltosa se realizó con un modelo computacional con el programa Gaussian, utilizando el algoritmo de Hartree-Fock.

Se pretendió utilizar un espectroscopio Raman construido con un pequeño monocromador y detector de luz para analizar una de las muestras. Sin embargo, no fue posible hacerlo pues no aparecieron los máximos de la molécula. Se logró utilizar para ver las líneas del fósforo, pero no mostró ninguna en los clorhidratos. Se da una posible explicación en las conclusiones.

III. ANÁLISIS Y RESULTADOS

Los espectros obtenidos se muestran en las Figuras 11-15.

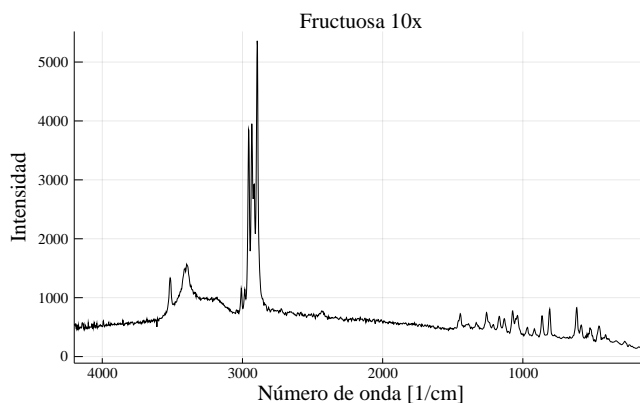


Figura 11. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 10x. Ver la figura 16 para el espectro analizado.

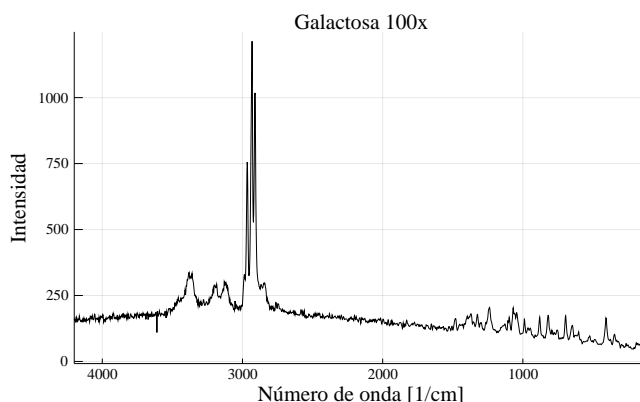


Figura 12. Espectro obtenido para la galactosa con el objetivo de 100x. Ver la figura 17 para el espectro analizado.

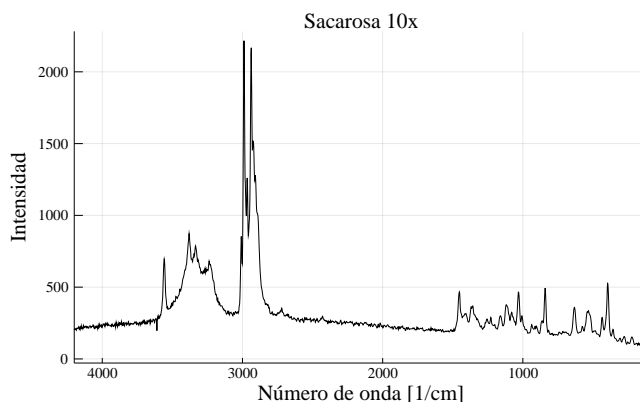


Figura 13. Espectro obtenido para la sacarosa con el objetivo de 10x. Ver la figura 18 para el espectro analizado.

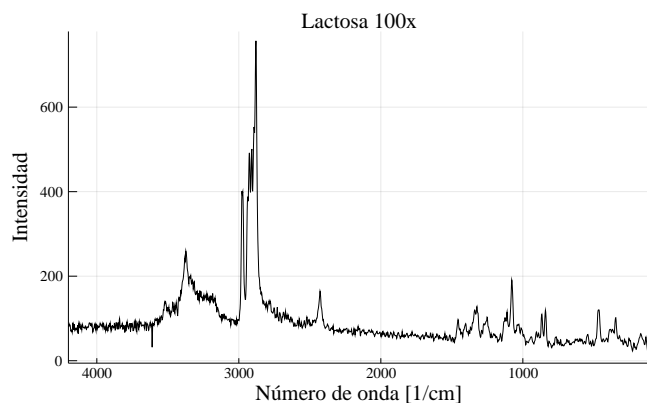


Figura 14. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 100x. Ver la figura 19 para el espectro analizado.

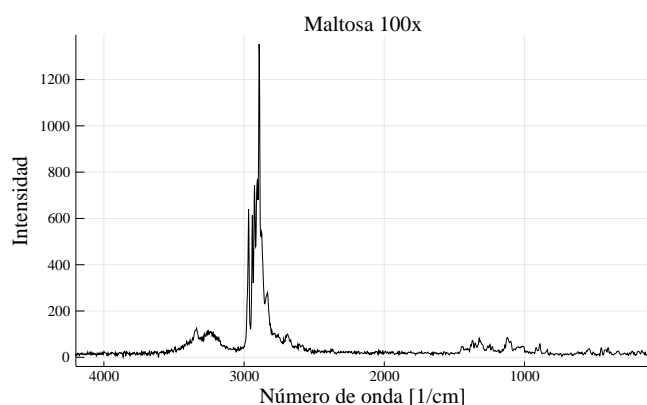


Figura 15. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 100x. Ver la figura 20 para el espectro analizado.

Para cada espectro, se normalizan los valores de intensidad a 1.0 y se realiza la corrección del silicio. Luego se calcula una línea base haciendo una regresión polinómica de segundo orden con los valores mínimos en 20 intervalos a lo largo del espectro. Esa línea base se resta al espectro. Entonces se buscan los máximos locales y sólo se conservan aquellos mayores a 1 % de la escala vertical, con el fin de ignorar el ruido. Finalmente se buscan las asignaciones correspondientes conservando sólo aquellos máximos que se consideran relevantes.

A. Región de estiramiento del CH

Los espectros analizados de las 5 moléculas estudiadas se muestran en el Apéndice A, en las figuras 16-20. En cada éstas se observa una región de entre 3500-2800 cm^{-1} caracterizada por vibraciones de estiramiento (ν) de CH principalmente. Nótese que en el espectro de la D-(-)-Fructuosa y D-(+)-Galactosa (Figuras 16 y 17) se identificaron dos picos debido a estiramiento de OH en las frecuencias altas del espectro. Por otro lado, a todos los compuestos estudiados se les logró identificar entre 5

y 11 modos fundamentales de estiramiento en CH.

Los modos de vibración de estiramiento encontrados en la D-(-)-Fructuosa y D-(+)-Galactosa son el mismo número, sin embargo se presentan con diferentes densidades y un tanto recorridas en ambos espectros, lo cual hace evidente las diferencias que existen entre dos compuestos que aunque tienen la misma fórmula química su estructura molecular es diferente. Por ejemplo, estos dos compuestos comparte el mismo estiramiento de CH_2 en el C-6 (ver Tablas I y II), sin embargo, éstos se presentan con intensidades y números de onda diferentes. Además, en el caso de la D-(-)-Fructuosa se trata de un estiramiento asimétrico (ν_a) mientras que en la D-(+)-Galactosa se presenta un estiramiento simétrico (ν_s). Por otro lado en las moléculas mencionadas se presenta el mismo estiramiento de CH en el C-3 en la misma región pero con diferente intensidad.

Por otro lado, las regiones de estiramiento de la D-(+)-Maltosa y α -Lactosa (ver figuras 18 y 19) comparten vibraciones en números de onda similares, sin embargo, son de intensidades distintas y de regiones diferentes en las moléculas. Esto ocurre debido a que a pesar de tener una molécula de glucosa en su estructura el sacárido diferente entre ellos le otorga una distribución diferente a la estructura molecular en ambos disacáridos.

En el espectro de la α -Lactosa (Tabla IV) se encontró un pico en 2440 cm^{-1} al cuál no se le pudo asignar ninguna vibración. Después de un análisis de los componentes y procedimientos en el experimento se concluyó que era luz de fondo percibida por el detector.

Con la simulación realizada para la D-(+)-Maltosa (Figura 20) se encontraron 9 modos de vibración estiramiento que se muestran en la Tabla V.

B. Frecuencias bajo 1600 cm^{-1}

Se ha encontrado [26, 27] que la mayoría de los modos normales de vibración en las moléculas de carbohidratos dentro de esta región se encuentran muy acopladas y por tanto son difíciles de identificar. Esto se observa en los monosacáridos estudiados (D-(-)-Fructuosa y D-(+)-Galactosa), y a que en su mayoría no se pudo encontrar en publicaciones anteriores los picos asociados dentro de la banda de 1150-900 cm^{-1} (Tablas I y II). Sin embargo, en el caso de la Fructosa, se identificaron 3 picos en la banda de 1500-1150 cm^{-1} (Tabla I).

Por otro lado, para los disacáridos estudiados si se lograron identificar con éxito las vibraciones dentro de las bandas en esta región. Para la Sacarosa (Tabla III) se encontró una banda con balanceos del tipo C-H (ρ) en 1500-1200 cm^{-1} , seguido de una banda estiramiento del tipo C-C y C-O en la región entre 1200-850 cm^{-1} . En la región de números de onda más bajos, i.e., menor a 800 cm^{-1} se encontraron tijereteos (δ) y torsiones (τ) entre las cadenas que conforman a la molécula.

Para la α -Lactosa se encontró la región del balanceo de C-H en la banda 1500-1300 cm^{-1} (Tabla IV), seguido

de una banda de estiramiento de los tipos C-O y CC en la banda 1300-860 cm^{-1} . Al igual que la molécula de la sacarosa, se identificó en la región menor a 800 cm^{-1} flexiones y torsiones en los enlaces O-C-O y O-H respectivamente. Esto puede deberse a que tanto la Sacarosa como la α -Lactosa contienen glucosa como uno de los dos monosacáridos que conforman sus moléculas.

En el caso de la D-(+)-Maltosa se pudieron identificar muy pocas vibraciones en esta región ya que esta molécula fue modelada en Gaussian con un método cuyos resultados no se parecían totalmente a los obtenidos experimentalmente. (Ver Tabla V)

IV. CONCLUSIONES

En todas las muestras se observan tres regiones importantes. Una región de estiramiento de enlaces O-H de 4000 a 3200 cm^{-1} , una de estiramiento de enlaces C-H entre 3200 y 2700 cm^{-1} con los máximos dominantes de los espectros, y finalmente una región con vibraciones diversas entre 1500 y 100 cm^{-1} . Las primeras dos tienen prácticamente la misma estructura, pues son resultado de enlaces comunes en las moléculas. La tercer región muestra lo que se conoce como huella digital de la muestra, y presenta los detalles estructurales de cada molécula.

Encontrar asignaciones en esta última región resulta mucho más complicado. Primero, porque en general hay menos investigación publicada en esta zona, y segundo

porque identificar los máximos resulta en sí más complicado. Esto pues diferentes movimientos de la molécula empiezan a ocurrir simultáneamente y asignar un modo de vibración a cada máximo se vuelve más difícil. Esto se vio reflejado en las asignaciones de la galactosa y fructuosa, donde las fuentes no tenían asignaciones detalladas en esta área, así como en el análisis realizado para la maltosa. El programa utilizado permite animar los movimientos de la molécula, y hay que identificar qué movimiento es el dominante en cada uno.

En las asignaciones de la sacarosa y maltosa se logró identificar adecuadamente todos los máximos observados. Esto dado que las referencias encontradas eran más detalladas. El análisis de la maltosa también tuvo problemas pues el espectro generado computacionalmente tuvo que multiplicarse por un factor para coincidir con lo obtenido experimentalmente. Sería conveniente utilizar otros algoritmos como el modelo del funcional de densidad (DFT) para ver si coinciden mejor con lo obtenido. También se recomienda utilizar los algoritmos computacionales para analizar la fructuosa y galactosa. Dado que son monosacáridos son moléculas más simples y además las publicaciones sobre éstas son escasas.

Finalmente, no se logró utilizar el segundo espectroscopio Raman para nuestras muestras. Se propone que la intensidad del espectro generado por compuestos orgánicos es mucho menor que aquél generado por el fósforo, y entonces el aparato no tenía la sensibilidad suficiente para percibir la luz Raman emitida por las moléculas.

-
- [1] W.A. Szarek, O.R. Martin. A Raman and infrared study of crystalline D-fructose, L-sorbose, and related carbohydrates. Hydrogen bonding and sweetness. Canadian Journal of Chemistry, 1984, 62(8): 1512-1518, <https://doi.org/10.1139/v84-258>
 - [2] E. Wiercigroch, E. Szafraniec, K. Czamara, M. Z. Pacia, K. Majzner, Kamila Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Volume 185, 2017, Pages 317-335, ISSN 1386-1425, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>.
 - [3] A. D. McNaught, Nomenclature of carbohydrates (Recommendation 1996), Carbohydr. Res. 297 (1997) 1-92, [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)83449-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(97)83449-0).
 - [4] D. L. Nelson, M.M. Cox, Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway, Lehninger Princ. Biochem. fourth ed. Worth Publishers, New York 2004, pp. 521-559.
 - [5] J. McMurry, Biomolecules Carbohydrates, Org. Chem, Ninth ed. Cengage Learning, USA 2016, pp. 832-869.
 - [6] A.N. Batsoulis, N.G. Siatis, A.C. Kimbaris, E.K. Alisandrakis, C.S. Pappas, P.A. Tarantilis, P.C. Harizanis, M.G. Polissiou, FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 207-210, <http://dx.doi.org/10.1021/jf048793m>.
 - [7] K. Virkler, I.K. Lednev, Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids, Forensic Sci. Int. 181 (2008) e1-e5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.08.004>.
 - [8] M. Ibrahim, M. Alaam, H. El-Haes, A. F. Jalbout, A. de Leon, Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose, Ecletica Quim. 31 (2006) 15-21, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000300002>.
 - [9] D.H. Owen, D.F. Katz, A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant, J. Androl. 26 (2005) 459-469, <http://dx.doi.org/10.2164/jandrol.04104>.
 - [10] K. Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, Forensic Sci. Int. 188 (2009) 1-17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>.
 - [11] M. Mathlouthi, J.L. Koenig, Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 44 (1987) 7-89, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60077-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60077-3).
 - [12] A.D. McNaught, A. Wilkinson, Compendium of Chemical Terminology, Blackwell Science, Oxford, 1997.
 - [13] Hynes, R. C.; Le Page, Y. J. Appl. Crystallogr. 1991, 24, 352-354.
 - [14] Hanson, J. C.; Sieker, L. C.; Jensen, L. H. Acta Crysta-

- llogr., Sect. B 1973, 29, 797-808.
- [15] Uraji, T.; Kohno, H.; Yoshimura, H.; Shimoyamada, M.; Watanabe, K. *Food Sci Technol. Int.* 1996, 2, 38–42.
 - [16] Burlyn, E. M. *Plant Physiol.* 1972, 50, 196–198.
 - [17] A. B. Brizuela, L. C. Bichara, E. Romano, A. Yurquina, S. Locatelli, S. A. Brandán, A complete characterization of the vibrational spectra of sucrose, *Carbohydrate Research*, Volume 361, 2012, Pages 212-218, ISSN 0008-6215, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.009>.
 - [18] Roos YH. Chapter 2, solid and liquid states of lactose, advanced dairy chemistry. In: McSweeney PLH, Fox PF, editors. *Lactose, water, salts and minor constituents*, vol. 3. Springer Science Business Media, LLC; 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5-2>.
 - [19] Brech M, Nijdam JJ, Pearce D, Bagga P. *J Med Bioeng* 2013;2(3):207e13.
 - [20] Bolhuis G, Zuurman K. *Drug Dev Ind Pharm* 1995;21:2057e71.
 - [21] Ptak E, Brzozowski P, Bieniek J. *J Animal Feed Sci* 2012;21:251e62.
 - [22] M. J. Márquez, A. B. Brizuela, L. Davies, S. A. Brandán, Spectroscopic and structural studies on lactose species in aqueous solution combining the HATR and Raman spectra with SCRF calculations, *Carbohydrate Research*, Volume 407, 2015, Pages 34-41, ISSN 0008-6215, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.01.019>.
 - [23] Buckton G, Yonemochi E, Hammond J, Moffat A. *Int J Pharm* 1998;168:231e41.
 - [24] Nørgaard L, Hahn MT, Knudsen LB, Farhat IA, Engelsen SB. *Int Dairy J* 2005;15:1261e70.
 - [25] Gafour HM, Bouterfas M, Bekhti N, Derrar SN, Sekkal Rahal M. *J Mol Imag Dyn* 2011;1(1):1000102.
 - [26] P. D. Vaskoj, Blackwell, J. L. Koenig. *Carbohydr. Res.* 23, 407 (1972).
 - [27] J. J. Cael, J. L. Koenig, and J. Blackwell, *Carbohydr. Res.* 32, 79 (1974).

Apéndice A: Asignaciones de los espectros

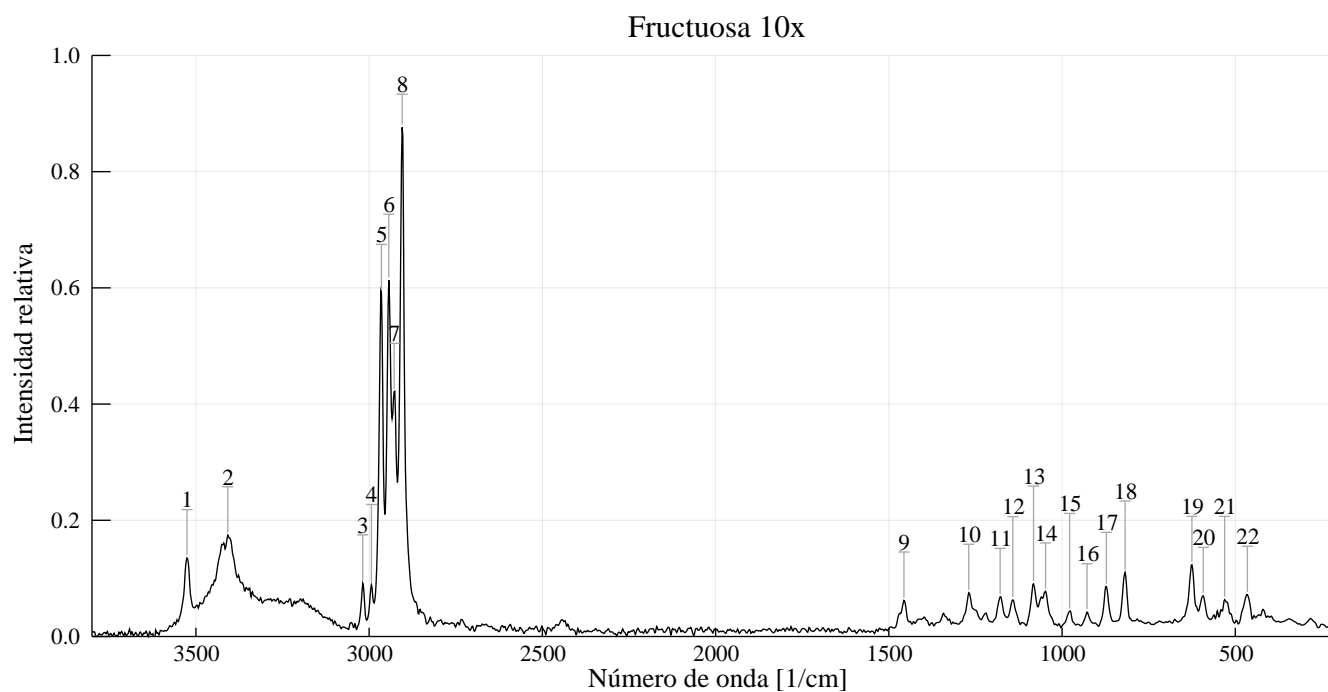


Figura 16. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 10x. Ver tabla I para la asignación.

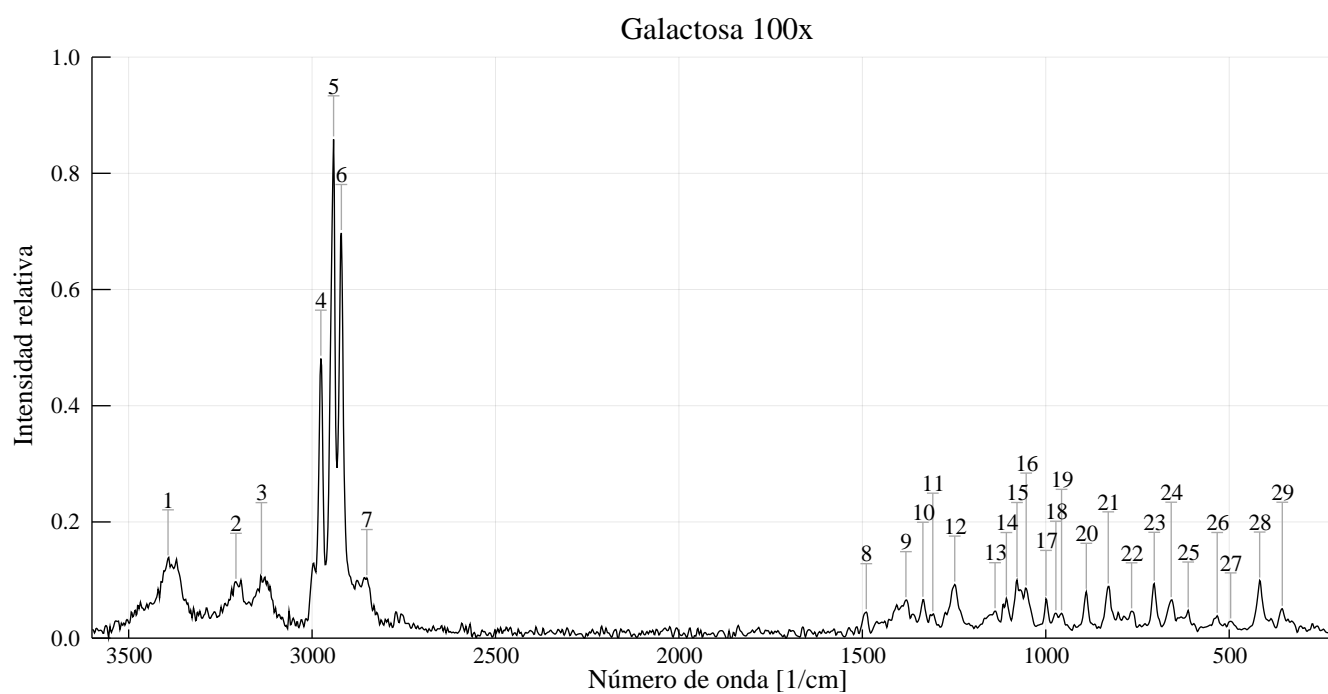


Figura 17. Espectro obtenido para la galactosa con el objetivo de 100x. Ver tabla II para la asignación.

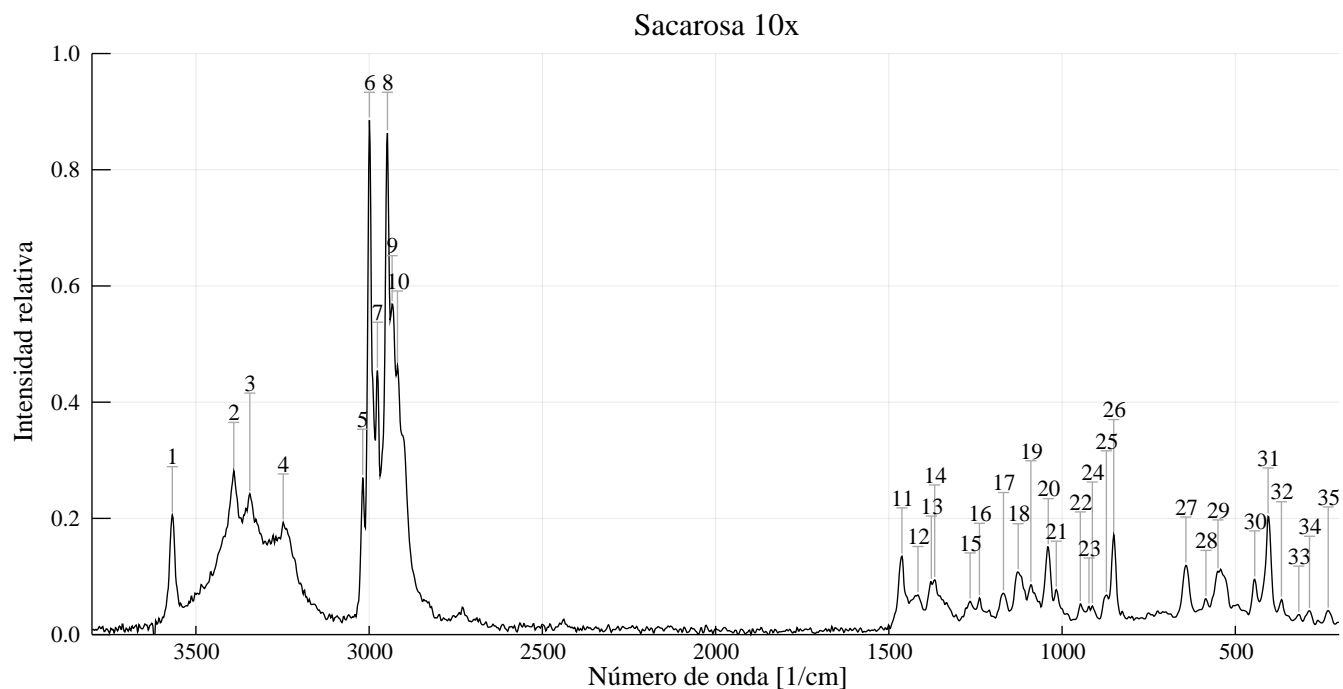


Figura 18. Espectro obtenido para la sacarosa con el objetivo de 10x. Ver tabla III para la asignación.

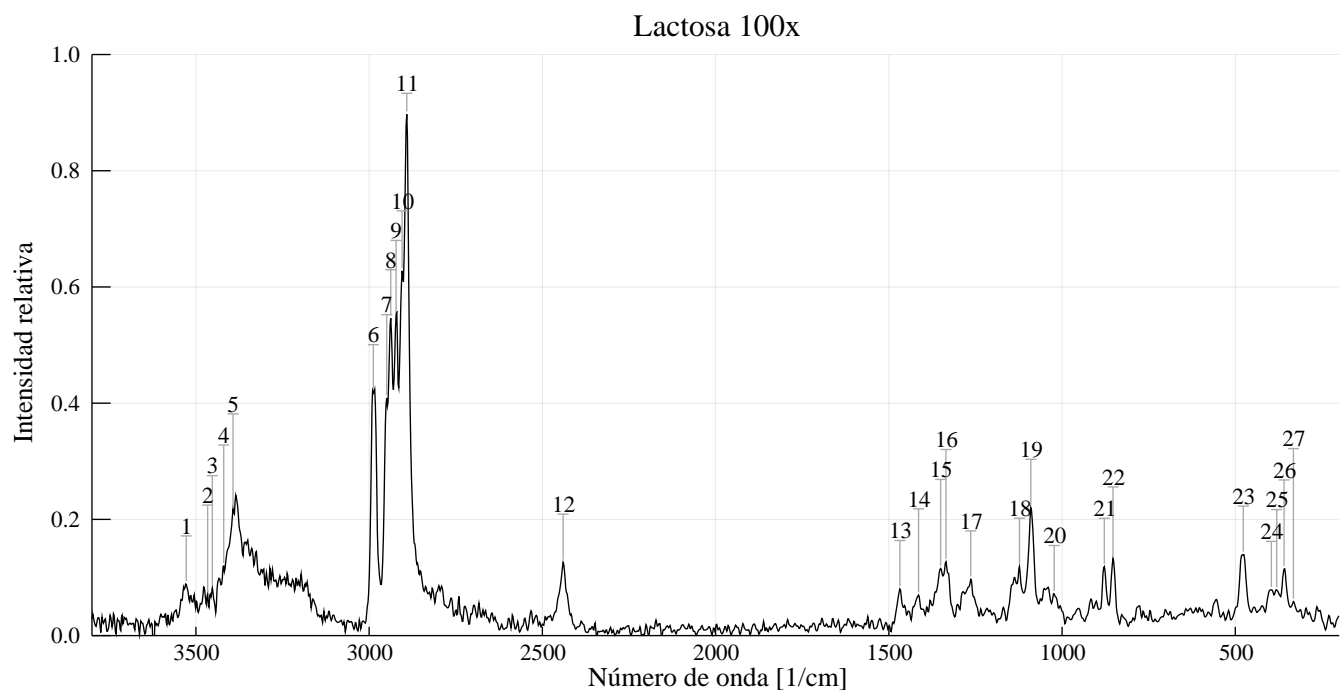


Figura 19. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 100x. Ver tabla IV para la asignación.

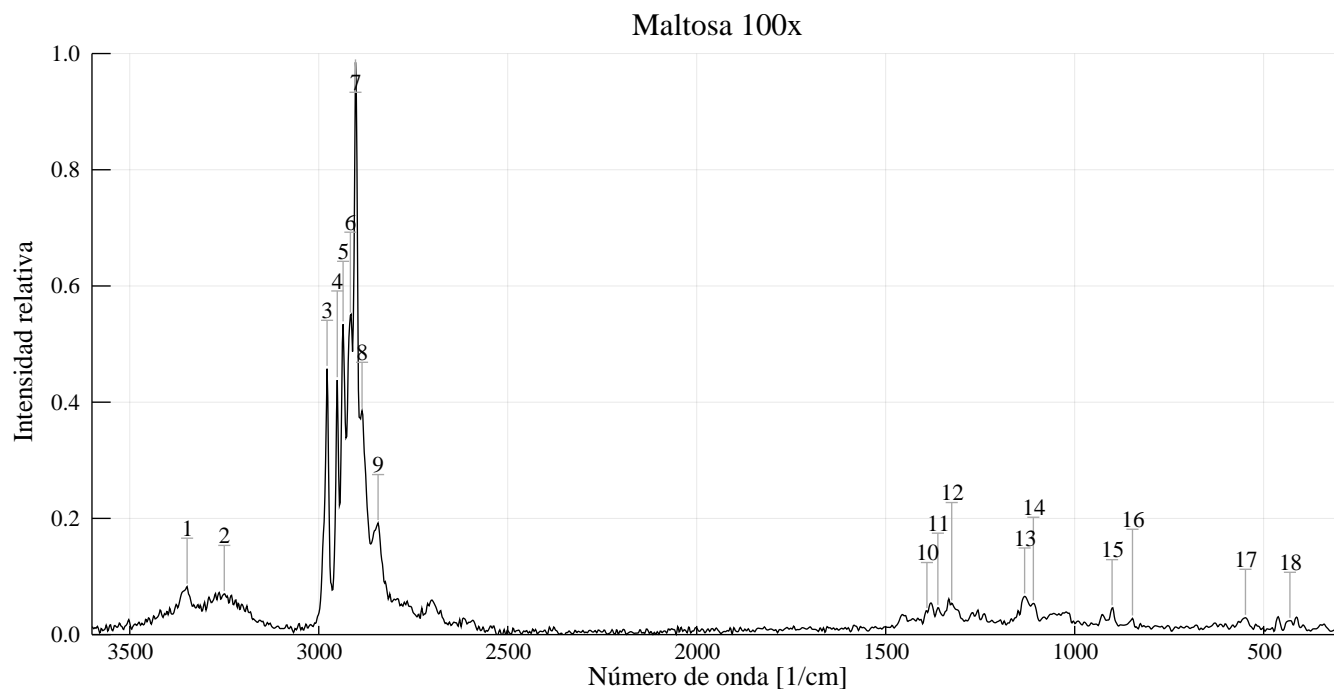


Figura 20. Espectro obtenido para la fructuosa con el objetivo de 100x. Ver tabla V para la asignación.

Fructuosa 100x				
Número	Número de onda [cm ⁻¹]	Referencia [1] [cm ⁻¹]	Error porcentual	Asignación
1	3526 w	3500	0.74 %	$\nu(\text{OH})$ de O-4-H...O-2
2	3408 w	3395	0.38 %	$\nu(\text{OH})$ de O-5-H...O-2
3	3019 vw	3014	0.17 %	$\nu_a(\text{CH}_2)$ de C-1
4	2993 vw	2987	0.2 %	$\nu_a(\text{CH}_2)$ de C-6
5	2965 s	2956	0.3 %	$\nu(\text{CH})$ de C-5
6	2943 s	2936	0.24 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$ de C-6
7	2928 m	2918	0.34 %	$\nu(\text{CH})$ de C-3
8	2905 vs	2895	0.35 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$ de C-1
9	1456 m	1455	0.07 %	$\beta(\text{CH}_2)$
10	1269 m	1263	0.48 %	$\tau\omega(\text{CH}_2)$
11	1179 vw	1263	6.65 %	$\nu(\text{C}-\text{O})$ $\beta(\text{H}-\text{C}-\text{O})$
12	1142 m	1142	0.0 %	
13	1082 m	1079	0.28 %	
14	1048 m	1047	0.1 %	
15	978 w	977	0.1 %	
16	928 w	925	0.32 %	
17	872 s	871	0.11 %	
18	818 s	817	0.12 %	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CO})$
19	625 s	626	0.16 %	Vibración de C=O
20	593 w	594	0.17 %	
21	531 w	524	1.34 %	
22	465 m	465	0.0 %	

Tabla I. Identificaciones en el espectro de la fructuosa con objetivo de 100x. La numeración de los picos corresponde a aquella en la figura 16. Ver la figura 3 para la numeración de los átomos y la figura 1 para el significado de la asignación. Referencia: [1].

Galactosa 100x				
Número	Número de onda [cm ⁻¹]	Referencia [2] [cm ⁻¹]	Error porcentual	Asignación
1	3393 m	3383	0.3 %	$\nu(\text{OH})$
2	3208 s	3207	0.03 %	$\nu(\text{OH})$
3	3138 s	3140	0.06 %	$\nu(\text{OH})$
4	2976 s	2974	0.07 %	$\nu(\text{CH})$ de C-4
5	2941 vs	2939	0.07 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$ de C-6
6	2920 vs	2918	0.07 %	$\nu(\text{CH})$ de C-3
7	2851 vw	2853	0.07 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$ de C1
8	1489 w	1489	0.0 %	$\nu(\text{CH}_2)$
9	1381 w	1379	0.15 %	$\nu(\text{CH}_2)$
10	1335 w	1333	0.15 %	$\nu(\text{CH}_2)$
11	1308 vw	1310	0.15 %	$\nu(\text{CH}_2)$
12	1248 m	1248	0.0 %	$\nu(\text{CH}_2)$
13	1138 vw	1138	0.0 %	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CO}), \nu(\text{OH})$
14	1107 w	1107	0.0 %	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CO}), \nu(\text{OH})$
15	1078 m			
16	1053 w	1055	0.19 %	$\nu(\text{CC}), \nu(\text{CO}), \nu(\text{OH})$
17	999 w	999	0.0 %	$\nu(\text{CCH}), \nu(\text{CCO})$
18	972 vw	972	0.0 %	$\nu(\text{CCH}), \nu(\text{CCO})$
19	957 vw	959	0.21 %	$\nu(\text{CCH}), \nu(\text{CCO})$
20	889 m	889	0.0 %	$\nu(\text{CC})$
21	830 m	830	0.0 %	$\nu(\text{CC})$
22	766 vw	766	0.0 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
23	704 m	705	0.14 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
24	658 w	662	0.6 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
25	612 vw	615	0.49 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
26	533 vvw	534	0.19 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
27	496 vvw	494	0.4 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
28	417 m	417	0.0 %	$\nu(\text{CCC}), \nu(\text{CCO}), \nu(\text{OCO})$
29	355 w			

Tabla II. Identificaciones en el espectro de la galactosa con objetivo de 100x. La numeración de los picos corresponde a aquella en la figura 17. Ver la figura 5 para la numeración de los átomos y la figura 1 para el significado de la asignación. Referencia: [2].

Sacarosa 10x				
Número	Número de onda [cm ⁻¹]	Referencia [17] [cm ⁻¹]	Error porcentual	Asignación
1	3568 s	3566	0.06 %	$\nu(\text{O14-H15})$
2	3391 m	3391	0.0 %	$\nu(\text{O12-H13})$
3	3344 m	3339	0.15 %	$\nu(\text{O30-H35})$
4	3248 m	3244	0.12 %	$\nu(\text{O39-H44})$
5	3019 m	3014	0.17 %	$\nu(\text{C24-H26})$
6	2999 vs	2994	0.17 %	$\nu_a(\text{CH}_2)$
7	2976 s	2972	0.13 %	$\nu(\text{C28-H33})$
8	2947 vs	2943	0.14 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$
9	2934 m	2929	0.17 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$
10	2918 m	2913	0.17 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$
11	1462 m	1462	0.0 %	$\delta(\text{CH}_2)$
12	1416 w	1420	0.28 %	$\rho(\text{C28-H33}), \rho'(\text{C25-H29})$
13	1377 w	1378	0.07 %	$\rho(\text{C5-H8})$
14	1368 w	1367	0.07 %	$\rho(\text{C31-H36})$
15	1266 vw	1262	0.32 %	$\rho'(\text{C3-H6})$
16	1239 vw	1239	0.0 %	$\delta(\text{O14-H15})$
17	1169 w	1171	0.17 %	$\nu(\text{C1-C18})$
18	1127 w	1126	0.09 %	$\nu(\text{C5-O16})$
19	1090 w	1089	0.09 %	$\nu(\text{C24-O23})$
20	1040 m	1039	0.1 %	$\nu(\text{C4-C3})$
21	1017 vw	1014	0.3 %	$\nu(\text{C3-O4})$
22	947 vvw	946	0.11 %	$\nu(\text{C28-C32})$
23	922 vvw	922	0.0 %	$\nu(\text{C32-C31})$
24	913 vvw	913	0.0 %	$\nu(\text{C1-O2})$
25	872 vw	871	0.11 %	$\delta(\text{O23-C24-C25})$
26	851 m	850	0.12 %	$\tau\omega(\text{CH}_2)$
27	643 w	642	0.16 %	$\beta R_1(\text{A5})$
28	585 vw	585	0.0 %	$\delta(\text{O16-C5-C4})$
29	550 w	552	0.36 %	$\delta(\text{O2-C1-O23})$
30	444 w	443	0.23 %	$\delta(\text{C31-C37-O43})$
31	405 m	403	0.5 %	$\delta(\text{C9-C3-O2}), \delta(\text{O14-C4-C3})$
32	367 vw	365	0.55 %	$\tau(\text{O26-H17})$
33	317 vvw	315	0.63 %	$\delta(\text{C31-C37-O43})$
34	286 vw	286	0.0 %	$\tau(\text{O34-H40})$
35	232 vw	231	0.43 %	$\tau(\text{O12-H3})$

Tabla III. Identificaciones en el espectro de la sacarosa con objetivo de 10x. La numeración de los picos corresponde a aquella en la figura 18. Ver la figura 7 para la numeración de los átomos y la figura 1 para el significado de la asignación. Referencia: [17].

Lactosa 100x				
Número	Número de onda [cm ⁻¹]	Referencia [22] [cm ⁻¹]	Error porcentual	Asignación
1	3528 w	3532	0.11 %	$\nu(\text{O34-H35})$
2	3466 vw	3467	0.03 %	$\nu(\text{O43-H44})$
3	3453 w	3455	0.06 %	$\nu(\text{O46-H47})$
4	3420 vw	3417	0.09 %	$\nu(\text{O9-H18})$
5	3393 m	3409	0.47 %	$\nu(\text{O24-H25})$
6	2988 s	2996	0.27 %	$\nu_a(\text{CH}_2)$
7	2949 w	2948	0.03 %	$\nu(\text{C4-H14})$
8	2938 s	2934	0.14 %	$\nu(\text{C3-H3})$
9	2922 s	2919	0.1 %	$\nu(\text{C21-H23})$
10	2905 s	2908	0.1 %	$\nu_s(\text{CH}_2)$
11	2891 s	2898	0.24 %	$\nu(\text{C26-H27})$
12	2440 m			Luz de fondo
13	1468 w	1463	0.34 %	$\delta(\text{HOH})$
14	1414 w	1416	0.14 %	$\omega \text{ CH}_2$
15	1351 m	1351	0.0 %	$\rho'(\text{C19-H38})$
16	1335 m	1336	0.07 %	$\rho'(\text{C20-H42})$
17	1264 vw	1265	0.08 %	$\tau(\text{COHO}), \omega(\text{HOH})$
18	1123 w	1119	0.36 %	$\nu(\text{C19-O36})$
19	1090 m	1085	0.46 %	$\nu(\text{C20-C21})$
20	1023 w	1020	0.29 %	$\nu(\text{C22-O24})$
21	878 m	862	1.86 %	$\nu(\text{C3-C4})$
22	853 m	843	1.19 %	$\nu(\text{C19-C26})$
23	477 m	475	0.42 %	$\delta(\text{O30-C19-O36})$
24	396 w	395	0.25 %	$\delta(\text{O30-C20-C39})$
25	381 w	379	0.53 %	$\tau(\text{O9-H18})$
26	359 m	360	0.28 %	$\delta(\text{O8-C2-C3}), \delta(\text{O8-C2-C1})$
27	332 vw	332	0.0 %	$\tau(\text{COHO}), \omega(\text{HOH})$

Tabla IV. Identificaciones en el espectro de la lactosa con objetivo de 100x. La numeración de los picos corresponde a aquella en la figura 19. Ver la figura 9 para la numeración de los átomos y la figura 1 para el significado de la asignación. Referencia: [22].

Maltosa 100x				
Número	Número de onda [cm ⁻¹]	Referencia [22] [cm ⁻¹]	Error porcentual	Asignación
1	3348 m	3343	0.15 %	$\nu(\text{O25-H33})$
2	3250 w	3304	1.63 %	$\nu(\text{O20-H19})$
3	2978 s	2910	2.34 %	$\nu(\text{C2-H11})$
4	2951 s	2921	1.03 %	$\nu(\text{C1-H29})$
5	2936 s	2902	1.17 %	$\nu(\text{C7-H15})$
6	2916 s	2886	1.04 %	$\nu(\text{C5-H31})$
7	2903 vs	2880	0.8 %	$\nu(\text{C4-H13})$
8	2885 s	2852	1.16 %	$\nu_s(\text{H41-O40-H41})$
9	2843 m	2846	0.11 %	$\nu_s(\text{H44-O43-H45})$
10	1391 w	1386	0.36 %	$\rho(\text{H13-H32})$
11	1362 w	1365	0.22 %	$\delta(\text{H39-H30})$
12	1325 w	1334	0.67 %	$\delta(\text{H41-H42})$
13	1132 w	1136	0.35 %	$\tau(\text{H44-H45})$
14	1109 w	1079	2.78 %	$\rho(\text{H13})$
15	901 w	907	0.66 %	$\rho(\text{H41-H42})$
16	847 vw	848	0.12 %	$\rho(\text{H44-H45})$
17	548 w	536	2.24 %	$\tau(\text{Anillo de C1})$
18	431 vw	429	0.47 %	$\rho(\text{Anillo de C1})$

Tabla V. Identificaciones en el espectro de la maltosa con objetivo de 100x. La numeración de los picos corresponde a aquella en la figura 20. Ver la figura 10 para la numeración de los átomos y la figura 1 para el significado de la asignación. Se utilizó una simulación en el programa Gaussian para identificar los picos. El espectro generado se puede ver en la figura 21. Se multiplicó por un factor de 0.8

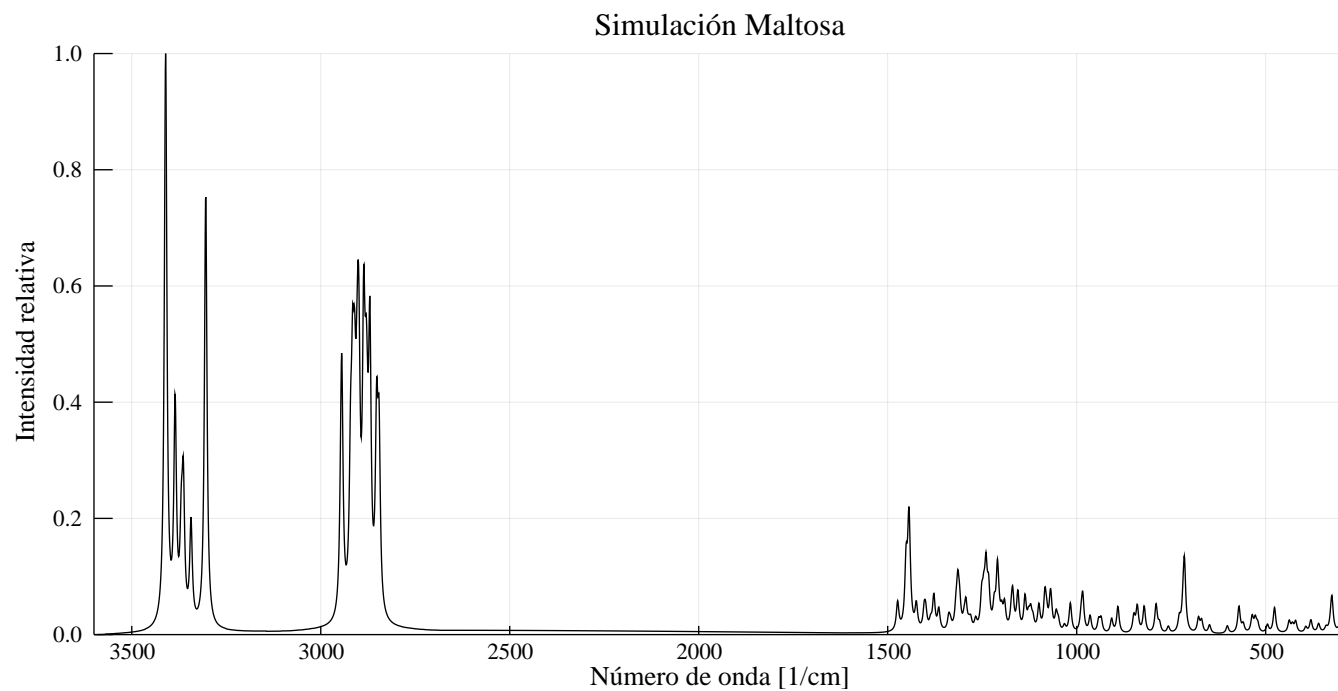


Figura 21. Simulación del espectro de la molécula de maltosa con el método de Hartree-Fock. El número de onda mostrado aquí es el resultado de multiplicar el resultado de la simulación por un factor de 0.8.