



Universidad Nacional Autónoma de México



Guía de Laboratorio

Espectroscopia Raman

Laboratorio Universitario de Caracterización
Espectroscópica (LUCE)

Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT)

Dra. Araceli Solís Gómez
LUCE-ICAT-UNAM
Correo: araceli.solis@icat.unam.mx

Contenido

1. Introducción
2. Objetivos
3. Teoría acerca de espectroscopia Raman e Infrarroja
 - 3.1. Historia del efecto Raman
 - 3.2. Efecto Raman
 - 3.3. Espectroscopia Raman
4. Aplicaciones
5. Ruidos en espectroscopía Raman
6. Modos vibracionales
7. Interpretación de espectros
8. Parámetros experimentales
9. Referencias

1. Introducción

El objetivo de la espectroscopia vibracional (Raman e Infrarrojo) es sondear las vibraciones moleculares, probando la transición entre un estado fundamental y estados vibratorios excitados. Cada molécula tiene un conjunto específico de bandas vibratorias que se definen por su frecuencia, forma e intensidad.

La frecuencia de una transición ($\sim 50\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) depende directamente de la masa reducida de la unidad vibratoria. Por lo tanto, las masas reducidas más pequeñas dan lugar a frecuencias más altas. Dependiendo de la naturaleza de la vibración molecular, la transición puede ser activa en Raman y/o infrarrojo. Esas técnicas, por lo tanto, deben utilizarse complementariamente, porque algunas bandas que son infrarrojas inactivas pueden ser activas por Raman y viceversa. Sin embargo, el principio físico detrás de Raman y la espectroscopía infrarroja es muy diferente.

La espectroscopía Raman es una técnica de dispersión (esparcimiento) en la que la intensidad de las bandas es proporcional a la concentración y a la sección transversal de dispersión de las unidades vibratorias. La espectroscopía infrarroja es una técnica de absorción donde la intensidad de las bandas es proporcional a la concentración y al coeficiente de absorción de las unidades vibratorias. Típicamente, el tiempo necesario para registrar un espectro es del orden de segundos a decenas de minutos. Sin embargo, para aumentar la relación señal / ruido, varias acumulaciones son habituales.

La espectroscopía Raman es una herramienta para la investigación y caracterización no destructiva de todo tipo de materiales. Tiene una amplia gama de aplicaciones, que van desde la ciencia fundamental hasta el control de calidad in situ en líneas de producción. Cuando un espectrómetro Raman se combina con un microscopio confocal (microscopio Raman), incluso es posible visualizar la distribución de materiales en la escala micrométrica. Las muestras pueden reutilizarse para otras investigaciones.

En este experimento de laboratorio, los estudiantes aprenderán a pensar sobre las propiedades de una molécula y luego a medir esas propiedades de manera experimental. Las dos propiedades más importantes son los números de onda del modo normal vibratorio (frecuencias) y las energías de transición electrónicas.

2. Objetivos

Los Objetivos de la práctica de espectroscopia Raman son:

1. Brindarle una experiencia práctica de las posibilidades, las caídas y las limitaciones de la espectroscopia Raman,
2. Dar a conocer la configuración experimental y el funcionamiento de un microscopio Raman,
3. Aprender el manejo básico de un instrumento para realizar espectroscopía Raman,

4. Obtener los espectros de las muestras de estudio,
5. Identificar los modos vibracionales de los espectros obtenidos.

Con los últimos puntos se pretende darle al alumno una experiencia de los desafíos cotidianos de la investigación académica.

3. Teoría acerca de espectroscopia Raman e Infrarroja

3.1. Historia del efecto Raman

En 1928, el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman, demostró la existencia de un tipo de dispersión diferente al usual en la luz visible. Raman se inspiró en los trabajos realizados anteriormente por Rayleigh. Raman y Krishnan afirmaron que existen dos tipos de dispersión: 1.- la luz dispersada es la misma que la luz incidente, 2.- la luz dispersada es modificada, es decir tiene una longitud distinta a la de la luz incidente. El primer caso se lo atribuyó a propiedades ópticas normales de los átomos o moléculas, y el segundo caso a las fluctuaciones de su estado normal.

Para probar esta afirmación, usó un rayo de luz solar que enfocó por medio de un telescopio y con una serie de filtros hizo incidir la luz saliente al medio dispersor (vapores o líquidos libres de impurezas), usando el método de filtros de luz complementarios observó que la luz dispersada se componía de dos tipos, a saber, la misma que la incidente y otras modificadas.

El efecto fue probado en 60 líquidos comunes diferentes en los cuales demostró que el efecto no era debido a la fluorescencia del material sino más bien una verdadera dispersión. [1] Los resultados de dicho efecto fueron publicados como: “A new type of Secondary Radiation”, *Nature* 1928, 501-502; lo que supuso la obtención del premio Nobel de física en 1930 y que dio el nombre al fenómeno inelástico de dispersión de luz que permite el estudio de rotaciones y vibraciones moleculares.

3.2. Efecto Raman

Cuando un fotón (sin suficiente energía para excitar las transiciones electrónicas) interactúa con una molécula, puede dispersarse tanto elásticamente (dispersión de Rayleigh) como inelásticamente. La parte dispersa inelástica se llama dispersión Raman, y comúnmente se debe a los fotones que se unen a vibraciones moleculares o fonones en el material. En la dispersión inelástica, los fotones pueden sufrir un desorden de energía (dispersión de Stokes) o una ganancia de energía (dispersión anti-Stokes). La energía ganada o liberada por el fotón es la energía entre el estado fundamental y el primer nivel vibratorio salido de la molécula. Es importante notar que el fenómeno dominante es la dispersión de Rayleigh, y solo una pequeña cantidad de luz se dispersa inelásticamente.

El efecto Raman puede describirse fácilmente usando el enfoque clásico, considerando el campo electromagnético (caracterizado por una frecuencia ν_L) Como una perturbación que induce en la molécula un momento dipolar $\mu_i = \alpha E$.

La polarizabilidad (α) depende de las coordenadas de los átomos en la molécula, que varía con el tiempo en la frecuencia de vibración molecular $\nu_{1,2}$ ($\ll \nu_L$). Si la amplitud vibratoria es pequeña, la polarizabilidad se puede expandir en el primer orden:

$$\alpha(t) = \alpha^0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_{t=0} Q(t)$$

Considerando el caso particular de la molécula diatómica obtenemos:

$$\mu_i = E^0 \left\{ \alpha^0 \cos(2\pi\nu_L t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) \frac{Q}{2} [\cos(2\pi(\nu_L + \nu_{1,2})t) + \cos(2\pi(\nu_L - \nu_{1,2})t)] \right\}$$

el primer término de la ecuación describe la dispersión elástica, mientras los otros términos describen la dispersión inelástica.

Para una descripción completa de los fenómenos, es necesario un enfoque cuántico. En la descripción cuántica, la energía vibratoria de la molécula se cuantifica y la interacción con la luz se describe utilizando la teoría de la perturbación. El fotón entrante excita la molécula a un estado virtual, que decae a un estado de energía inferior (Fig. 1).

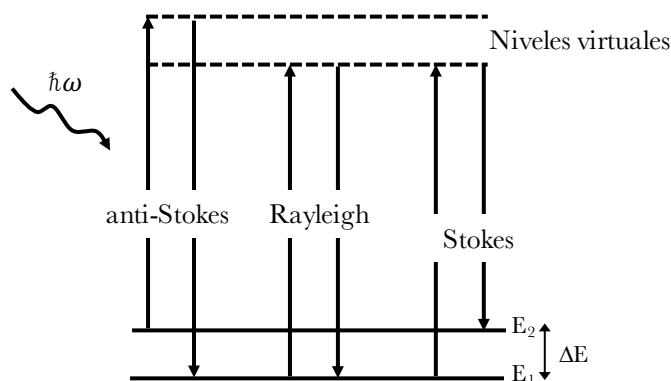


Figura 1 Imagen esquemática de los estados de energía durante la dispersión de Rayleigh y Raman

El número de moléculas en el estado base (a temperatura ambiente) es mayor que el número de moléculas en el estado excitado, la dispersión de Stokes tiene una mayor probabilidad que la dispersión anti-Stokes (Fig. 2).

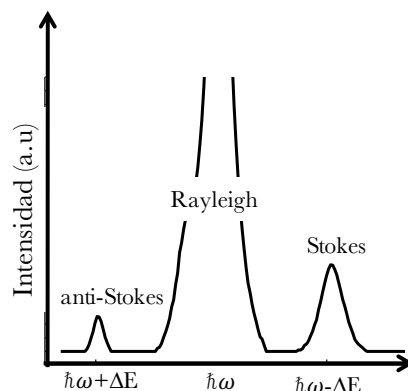


Figura 2 Espectro resultante del proceso Raman

Utilizando una aproximación cuántica de la intensidad de la dispersión de la luz puede ser estimada de la siguiente manera:

$$I_{Stokes} \propto \frac{(v_L - v_{1,2})^4}{v_{1,2}} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 n_1 ; I_{anti-Stokes} \propto \frac{(v_L + v_{1,2})^4}{v_{1,2}} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 n_2$$

Dos resultados importantes provienen directamente de esas expresiones; primero, la dispersión Raman solo tiene lugar si:

$$\frac{\delta \alpha}{\partial Q} \neq 0$$

La luz dispersa de Stokes es más intensa que la anti-Stokes, debido al factor de Boltzmann ($n_1 > n_2$). El espectro generalmente se traza como el cambio de energía de los fotones en relación con la energía del láser (independiente de la longitud de onda del laser). Por convención, la unidad utilizada para trazar el cambio de Raman es el número de onda (cm^{-1}).

3.3. Espectroscopia Raman

En un experimento de espectroscopia Raman, la muestra se irradia con luz monocromática; la frecuencia de luz debe elegirse para evitar la excitación de niveles electrónicos. La luz dispersa se detecta para recoger los espectros vibratorios de la muestra.

4. Aplicaciones

Es muy útil para campos como la industria petroquímica (para resolver problemas de control de calidad en polímeros y emulsiones), aplicaciones biomédicas (estudio de proteínas y estructuras polipépticas en su estado fisiológico natural como colesterol, lípidos y moléculas biológicamente activas), industria alimentaria (determinar presencia de macrocomponentes como proteínas, lípidos, carbohidratos y agua), medio ambiente (análisis de compuestos en suelos y aguas además de determinar su contaminación de otros compuestos como complejos metálicos, fenoles, etc.), análisis de polímeros e identificación de materiales.

5. Ruidos en espectroscopía Raman

Uno de los problemas inherentes a la adquisición de cualquier señal es el ruido presente en la medida. En el caso de la obtención de espectros Raman los ruidos más habituales pueden ser clasificados en cinco grupos diferentes:

- Ruido shot: es el resultado de la naturaleza aleatoria de la luz.
- Ruido generado por la muestra: Incluye emisiones ópticas no deseadas y generadas por la propia muestra como es el caso de la fluorescencia.
- Ruido generado por la instrumentación: depende del diseño específico de la instrumentación empleada en el análisis, incluye los ruidos introducidos por el detector (ruido térmico, ruido de lectura o la dependencia de la eficiencia cuántica del detector con la longitud de onda).
- Ruido computacional: Es generado por la conversión de la señal del detector a un archivo digital.
- Ruido generado por fuentes externas: Generalmente está causado por alguna fuente de luz externa que contamina la señal en algún punto del equipo.

6. Modos Vibracionales

Las energías de los estados vibracionales contienen mucha información sobre la muestra, como la composición química, la tensión / deformación indicada, las simetrías cristalinas y la calidad del cristal (Fig. 3). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la composición química se investiga por espectroscopía.

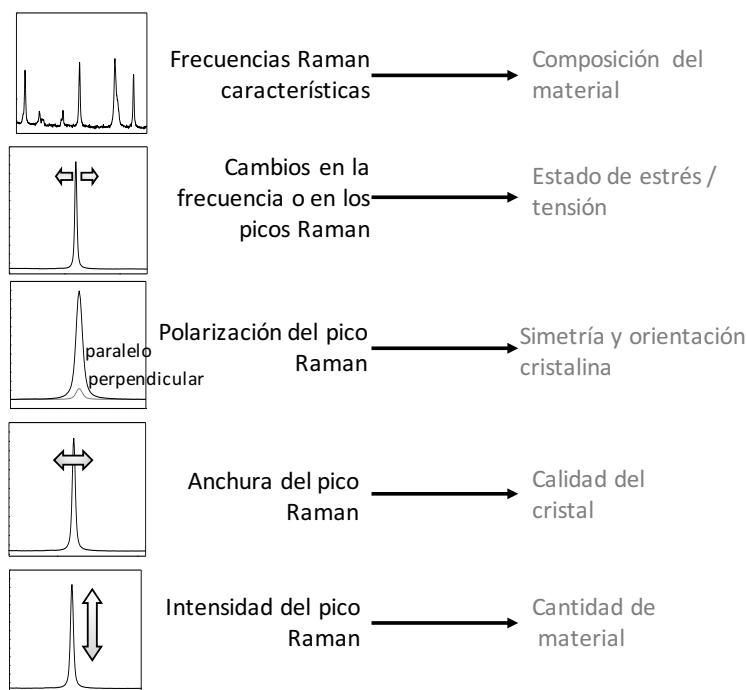


Figura 3 Información accesible por espectroscopía Raman

La dependencia de las energías de los estados vibratorios en la composición química se puede ilustrar mediante el modelo simple del oscilador armónico. Si imaginamos una masa oscilante (átomo o fragmento de molécula) que está conectada por un resorte (enlace químico) y suponemos un oscilador armónico, los estados de energía de este sistema pueden derivarse inmediatamente.

Para este oscilador armónico, los niveles de energía vienen dados por:

$$\omega = \sqrt{\frac{\kappa}{m}} \quad E_v = h\omega(v + 1/2)$$

Para el primer estado excitado ($v = 1$) tenemos como regla general que la posición de una banda Raman es proporcional a la raíz cuadrada de la fuerza de unión dividida por la masa del átomo oscilante. Esta es una buena guía para evaluaciones rápidas, pero obviamente un espectro real es mucho más complicado. Otra cosa que influye en la energía de la banda Raman es el modo vibratorio.

Hay dos tipos principales de vibraciones, a saber, el estiramiento y la deformación (flexión). El estiramiento cambia la longitud del enlace químico y generalmente requiere más energía que la deformación (Fig 4).

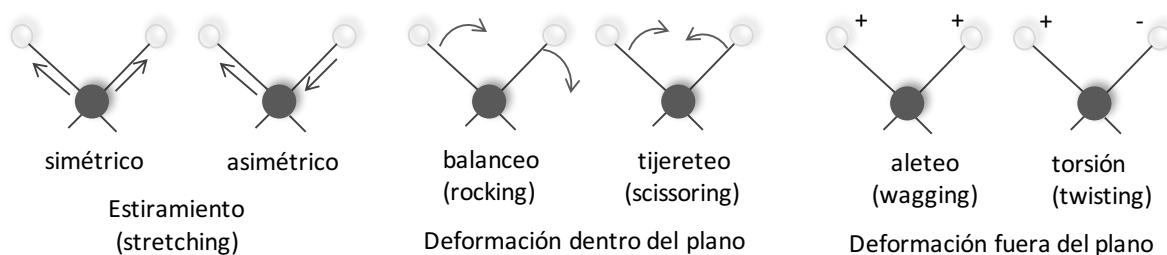


Figura 4 Modos vibracionales

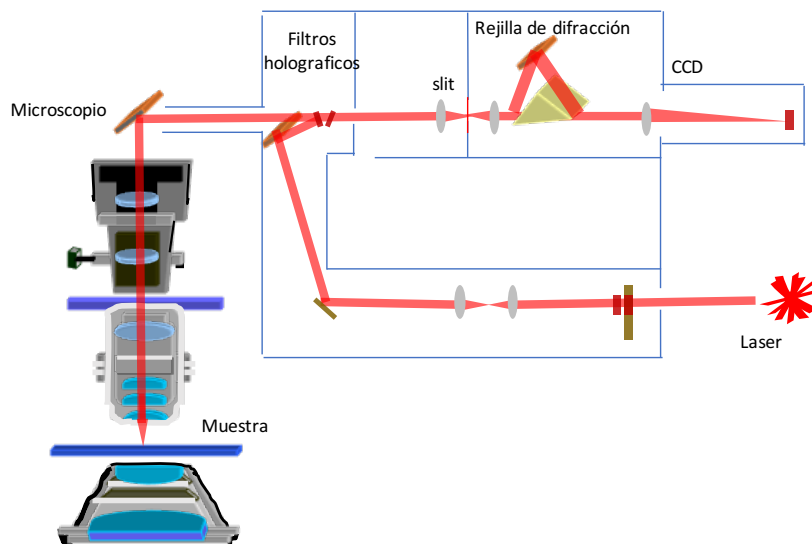
7. Interpretación de espectros

La información más importante que se puede obtener usando la espectroscopía Raman es la composición química de la muestra. La interpretación de cada una de las bandas es un caso ideal y requiere un conocimiento previo de la muestra.

Grupos funcionales específicos tales como alifático, aromático, carbonato, etc. tienen bandas características que parecen algo independientes del resto de la molécula. El siguiente paso después de identificar los enlaces H y C es buscar grupos de bandas que estén asociados con grupos funcionales. Desafortunadamente, no existen reglas simples para este procedimiento y la identificación de grupos funcionales es un procedimiento tedioso que requiere experiencia y la ayuda de un libro de referencia.

8. Parámetros experimentales

Usando un microscopio Raman, se deben considerar muchos parámetros experimentales relacionados con el microscopio, el espectrómetro y la fuente láser. Los parámetros más importantes: 1) Longitud de onda del láser, 2) Potencia láser, 3) Tiempo de adquisición, 4) Acumulaciones, 5) Magnificación objetiva.



9. Diseño experimental:

Equipo: Raman dispersivo Almega-XR. Láser (longitud de onda, 532 nm). Microscopio Olympus BX51.

Muestra a caracterizar: Carbohidratos, Vitaminas, Ácidos nucleicos, aminoácidos

Se tomarán 5 diferentes de las muestras propuestas para su estudio y caracterización por espectroscopia Raman. La adquisición de señales Raman (5 espectros mínimo por muestra) se realizará en forma metódica y rutinaria de grupos de moléculas con características a definir; es decir, con grupos funcionales parecidos o diferentes.

9. Referencias

- [1] C. Raman, K. Krishnan. "A new type of Secondary Radiation", *Nature* 1928 (121), 501.
- [2]. N.B. Colthup, L.H. Daly, and S.E. Wiberley. "Introduction to infrared and Raman spectroscopy", *Academic Press Inc.*, 3rd edition, 1990.
- [3] Practical Raman Spectroscopy. Gardiner and Graves (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1989 (chapter 3)

- [4] P. Larkin, "Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation", Elsevier, 2011.
- [5] A. Fadini, and F.-M. Schnepel. Vibrational Spectroscopy, Methods and applications, John Wiley & Sons, 1989. (chapter 2)
- [6] Ferraro, John R.; Nakamoto, Kazuo and Brown, Chris W. "Introductory Raman Spectroscopy", Elsevier Inc. (2003)
- [7] D.A. Long, "The Raman Effect-a unified treatment of the theory of Raman Scattering by Molecules", John Wiley & Sons (2002)
- [8] J.G. Grasselli and B.J. Bulkin, "Analytical Raman Spectroscopy", John Wiley & Sons (1991)
- [9] K. Nakamoto, "Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. part A: Theory and applications in inorganic chemistry", Wiley, New York, 1997.
- [10] Esau Araiza-Reyna, Roberto Sato-Berrú, América Vázquez-Olmos; "Quantification of Solid Residues by Raman Spectroscopy", Optics and Photonics Journal 3(5A) (2013) 01.