

Identificación de aglutinantes proteicos en obras de arte pictóricas cubanas

Ariadna Mendoza, Maurín Correa, Isis Maqueira, David Marrero*, N. Pérez Sieres*, Patricia Comas**

Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías Aplicadas. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. * Taller de Policromía del Gabinete de Conservación y Restauración, Oficina del Historiador. ** Laboratorio de Arqueometría, Colegio Universitario San Gerónimo de La Habana - Oficina del Historiador de La Habana, Obispo entre San Ignacio y Mercaderes, Habana Vieja, La Habana. arqueometria@cr.patrimonio.ohc.cu, ariadna@mail.org

Recibido: 3 de enero de 2011.

Aceptado: 5 de abril de 2012.

Palabras clave: aglutinantes proteicos, obras de arte, análisis histoquímico, espectroscopia IR, EITF.

Key words: artistic materials, histochemical analysis, IR spectroscopy, EITF.

RESUMEN. En este trabajo se implementaron metodologías de microanálisis mediante análisis histoquímico y Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF) para determinar la naturaleza del aglutinante en pinturas y la Cromatografía de Gases (CG) acoplada a Espectrometría de Masas (EM) para la identificación de los aglutinantes de origen proteico de uso común en la técnica al temple, con el objetivo de disponer de estos métodos como parte de la identificación de materiales artísticos en bienes patrimoniales cubanos que realiza el Laboratorio de Arqueometría de la Oficina del Historiador de la ciudad de La Habana. Las metodologías implementadas se evaluaron a través de muestras modelo de técnicas pictóricas tradicionales con variación del aglutinante proteico: yema y clara de huevo, caseína, aceite de nuez y cola envejecidos naturalmente durante cinco años. Las muestras modelo fueron correctamente identificadas. En el análisis histoquímico, se determinó la interferencia de pigmentos con presencia de nitrógeno con el colorante Amido Black. La Espectroscopia IR permitió diferenciar la técnica oleosa y mixta (aceite más proteína) y el temple con yema. Se identificó la técnica oleosa en pinturas murales de la iglesia San Francisco Nuevo (siglo XIX) y la Casa Obrapia (siglo XVII) y la técnica de temple con cola animal en la policromía del siglo XVIII que representa al evangelista San Juan perteneciente a la otrora iglesia San Juan de Letrán.

ABSTRACT. In this paper were implemented microanalysis methodologies by histochemical analysis, and infrared spectroscopy to determine the nature of the binder in paintings and Gas Chromatography (GC) coupled to Mass Spectrometry (MS) for identification of protein binders of common use in tempera technique with the aim of having these methods as part of the identification of artistic materials in Cuban cultural heritage carried out by Archaeometry Laboratory of Havana city's Historian Cabinet. The methodologies implemented were evaluated using model samples of traditional painting techniques with variable protein binder: yolk, egg white, casein, nut oil and animal glue; ageing for 5 years. The models samples were correctly identified. It was determined the interference of pigments with the presence of nitrogen by histochemical analysis with Amido Black dye. IR spectroscopy technique allowed to differentiate between oily and mixed (oil plus protein) techniques and tempera with yolk. Oily technique was identified in wall paintings of the New San Francisco church (XIX century) and the Obrapia House (XVII century) and the technique of tempera with animal glue in the polychrome of the XVIII century which represents St. John the Evangelist belonging to the San Juan de Letrán church.

INTRODUCCIÓN

Reconocer el vehículo y el aglutinante, sustancia cohesionadora de los pigmentos empleada en obras pictóricas como fijador de estos y por sus cualidades dispersivas resulta de gran importancia porque permite determinar la técnica artística (oleosa, temple o mixta). La caracterización química del aglutinante es importante tanto en la reconstrucción de la técnica pictórica usada en una pintura en particular, como para el establecimiento del programa de conservación y restauración de la obra en sí. Entre los materiales orgánicos naturales que han sido ampliamente usados como aglutinantes y adhesivos (proteínas, ceras, resinas y gomas), las proteínas

son una clase importante. Las pinturas son una matriz compleja, cuya composición química cambia continuamente en el curso del tiempo dependiendo de varios factores: interacciones específicas entre el pigmento y el aglutinante, condiciones desconocidas de conservación en el tiempo tales como cambios en la temperatura y humedad, exposición a contaminantes ambientales y la prolongada exposición a la luz natural o artificial. Desde el punto de vista analítico, los problemas relacionados con la caracterización de la técnica artística presentan varias dificultades: presencia simultánea de diferentes aglutinantes, degradación del material original como resultado del envejecimiento, la contaminación, la

pequeña cantidad de material disponible y las interferencias con otros componentes presentes como los pigmentos por lo que la identificación de aglutinantes de origen natural utilizados en pintura constituye aún en la actualidad un problema.

Los métodos no destructivos (sin extracción de muestra) y de microanálisis (extracción de una diminuta muestra) son los idóneos para las investigaciones de bienes patrimoniales. Tradicionalmente para la identificación de los aglutinantes se han usado las pruebas microquímicas a la gota basadas en tinciones con colorantes selectivos; luego los métodos espectrométricos moleculares: Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (EITF) y Raman,¹⁻⁴ los métodos cromatográficos y en menor frecuencia, los híbridos con espectrometría de masas (EM). Entre los métodos empleados en materiales artísticos orgánicos parece ser la cromatografía de gases, la más aplicada.⁵⁻¹² Los métodos cromatográficos se han utilizado fundamentalmente en sus variantes: Cromatografía Gaseosa (CG), Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-EM 5), Pirolysis-CG-EM¹² y Cromatografía Líquida de Alta Resolución y acoplada a EM.^{13,14} Las técnicas que se aplican actualmente difieren en sus límites de detección y la cantidad de muestra requerida para el análisis; demandan diferentes procedimientos de preparación de muestra y varían en el volumen de información final obtenida, tiempo y costo de análisis.^{15,16}

En este trabajo, como soporte de las investigaciones de obras de arte pictóricas en el Laboratorio de Arqueometría de la Oficina del Historiador de la ciudad de La Habana, se propuso establecer una estrategia para la identificación de los aglutinantes proteicos. Para ello, se trazaron los objetivos específicos siguientes: implementar y evaluar el análisis histoquímico para la identificación de la naturaleza del aglutinante, el IR para una identificación más sensible de la naturaleza del aglutinante y un procedimiento de identificación del aglutinante proteico específico a través de la determinación de aminoácidos por CG-EM; además de identificar la técnica artística a través del aglutinante proteico utilizado en obras de arte pictóricas por el análisis combinado de las metodologías implementadas.

La metodología general propuesta se aplicó al análisis de aglutinantes en pinturas murales de la Casa Obrapia (siglo XVII) y de la Iglesia San Francisco Nuevo (siglo XX). Se identificó la técnica artística también en las esculturas policromadas del siglo XVIII, que representan a los evangelistas pertenecientes a la otrora iglesia San Juan de Letrán de la Orden de los Dominicos, donde se estableciera entre 1728 y 1902, la Universidad de San Gerónimo, actual Colegio Universitario San Gerónimo de La Habana.

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Muestras de aglutinantes puros

Caseína industrial Pelican, de México, clara y yema de huevo, estas últimas extraídas directamente de un huevo de gallina cubana.

Muestras modelo

No existen muestras de referencia certificadas de pintura para evaluar los métodos de análisis, por ello para este estudio, se prepararon muestras modelo (denominadas según un código de matriz por la ubicación en la tabla de modelos preparados de pintura siguiendo recetas tradicionales empleadas por los artistas, teniendo

en cuenta la variación en la capa de preparación y las técnicas artísticas más comunes en la época de desarrollo de la obra plástica cubana (F.1a).^{17,18} A continuación se describe su composición:

Fondo caseína (5.1 y 5.3): Preparación basada en caseína industrial aplicada en un medio acuoso. [yeso natural, blanco de cinc ZnO, agua, caseína en proporción 1 : 1 : 2 : 1. Se aplican dos capas].

Fondo de aceite (7.1): Encolado previo de la tabla, preparación agua de cola, de yeso (CaSO₄) y blanco de cinc ZnO en proporción 1 : 1 y aglutinados en proporción 1 : 2 con aceite de nuez (imprimación oleosa).

Fondo mixto (6.1): Superposición de preparación magna: estrato de yeso como sustancia de carga y blanco de cinc (ZnO) como pigmento cubriente aglutinado con cola de conejo en un medio acuoso y estrato de imprimación oleosa con aceite de linaza (7.1).

Capa pictórica (2.1): Estrato gris basado en blanco de plomo (PbCO₃ · Pb(OH)₂) y negro marfil (carbono 15-20 %, Ca₃(PO₄)₂ 60 %, CaSO₄ 20 %) aglutinado con clara de huevo, sobre fondo de creta (CaCO₃) aglutinado con cola de conejo.

Capa pictórica (4.1): Estrato gris basado en blanco de plomo y negro marfil aglutinado con yema de huevo, sobre fondo de creta aglutinado con cola de conejo.

Capa pictórica (9.1): Estrato de blanco de plomo aglutinado con aceite de nuez, sobre fondo de creta aglutinado con cola de conejo.

Capas pictóricas azules: azul cerúleo (CO₂SnO₄) aglutinado con aceite de linaza; azul ftalocianina (C₂₆H₁₈N₆CN) aglutinado con aceite de linaza, azul de Prusia {Fe₄[Fe(CN)₆]₃} aglutinado con aceite de linaza. Las muestras azules se utilizaron para evaluar la interferencia de los pigmentos con presencia de nitrógeno en la identificación del aglutinante proteico por el método de fuscina ácida.

Muestras de obras de arte

Se analizaron muestras extraídas de pinturas murales del período colonial, expuestas en la Casa de la Obrapia [cinco muestras: azul (R1), siena claro (R2), siena oscuro (R3), verde (R4) y ocre oscuro (R5)]; de la iglesia San Francisco Nuevo (una muestra verde olivo (R6)) y de la escultura policromada que representa al evangelista bíblico San Juan [cinco muestras: carnación (R7), azul (R8), siena claro (R9), blanco (R10 y R11)], además de

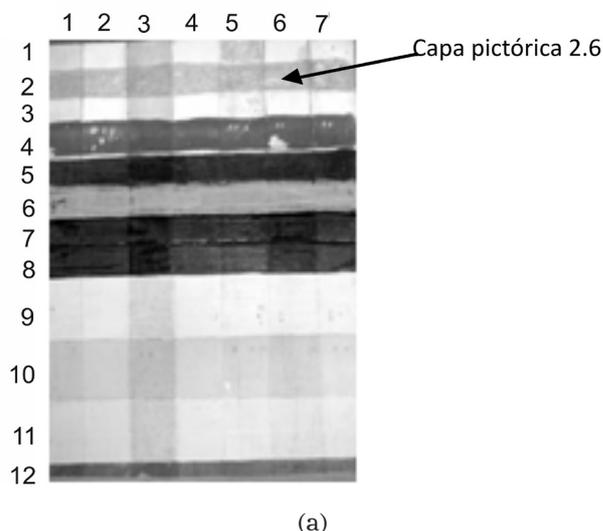


Fig. 1. (a) Tabla de las muestras modelo utilizadas: con diferentes técnicas artísticas (aglutinantes), (ej.: código dado, 2.6.).

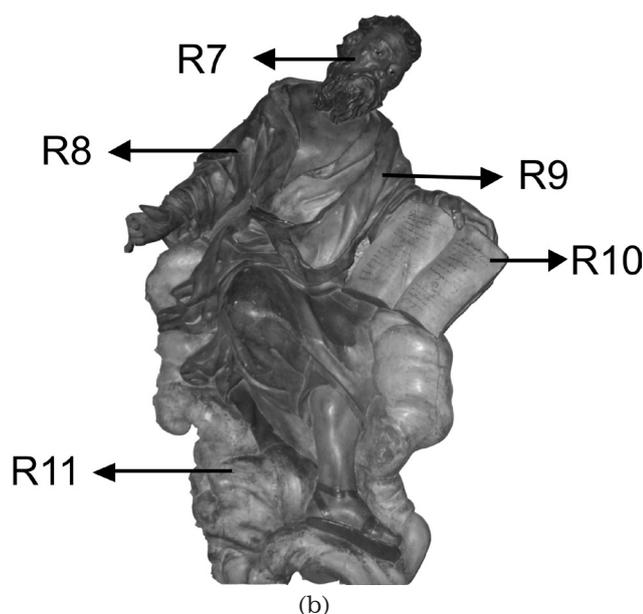


Fig. 1. (b) Foto de policromía que representa al evangelista San Juan.

dos fragmentos de sección transversal [(R12 y R13), (F. 1b)] que se expondrán en el Colegio Universitario San Jerónimo del centro histórico de la ciudad, por haber formado parte de la otrora iglesia del Convento San Juan de Letrán situada en el mismo sitio que ocupa hoy la recién inaugurada universidad.

Muestreo:

Se tomaron las muestras con bisturí y escalpelo, para las pruebas microquímicas procurando seleccionar todos los estratos presentes en las tablas de pinturas modelo y en las obras de arte y para los análisis por EITF y CG-EM, se tomaron las muestras con bisturí de la superficie de las muestras modelo y de objetos de arte.

Método de análisis histoquímico:

Se prepararon estratigrafías, para el análisis de las muestras incluyendo las de secciones transversales de pintura en una resina sintética (Technovit 4004). Los bloques así obtenidos, se lijaron hasta dejar la muestra en la superficie.

El análisis histoquímico se realizó mediante las pruebas de tinción sobre la estratigrafía con disoluciones de fuscina ácida (FA) y Amido Black (AB2) y la observación al microscopio óptico.

Se empleó un microscopio óptico con fibras ópticas para la iluminación de las muestras y cámara EverFocus acoplada conectada a computadora para obtención de las microfotografías de antes y después de la tinción. Los programas de captura de imagen de la cámara utilizados fueron AMCap y Power Director Program. Para ajustar el brillo y el contraste de las imágenes se utilizó el programa Adobe Photoshop 7.

Método de análisis por Espectroscopia Infrarroja:

Las muestras en polvo, para los análisis por EITF, fueron preparadas en pastillas de KBr¹⁹ (1 mg de muestra en 60 mg de KBr) y las líquidas—obtenidas por extracción de las primeras muestras—fueron depositadas entre láminas finas de NaCl. Se realizó extracción de líquido respecto al aceite a las muestras 6.1 (fondo mixto) y 9.1 (capa pictórica con aceite de nuez), para lo cual se disolvió 0,1 g de muestra sólida con 1 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), se decantó, se trasvasó el líquido y se evaporó el diclorometano, con lo que se obtuvo la muestra líquida.

Las muestras se analizaron en un espectrómetro in-

frarrojo con transformada de Fourier modelo Vector 22 de la Bruker, con detector DTGS y Beamsplitter de ZnSe, en el intervalo de 4000-650 cm⁻¹. El programa utilizado en el procesamiento de las muestras es el OMNIC V 5.2, 2000. La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta las bandas de los grupos funcionales, cuadros de correlación y comparación con los espectros EITF obtenidos de las muestras de aglutinantes puros frescos y envejecidos, en las muestras modelo de pintura y a partir de una base de datos de pigmentos por EITF^{20,21}

Análisis por Cromatografía Gaseosa con Espectrometría de Masas acoplada:

Se emplearon patrones de ácidos grasos (AG) y aminoácidos (AA) y se preparó una disolución de referencia que contenía 100 ng/μL de cada aminoácido. La preparación de las muestras se realizó mediante una variante de la metodología descrita por Colombini y cols.^{8-12,22} A la muestra, se le adicionaron 400 μL de disolución de amonio 2,5 N y 0,5 mL de n-hexano, se colocó en baño ultrasónico a 60 °C por 4 h para separar las fases. La disolución de amonio extraída (proteínas disueltas), se evaporó a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno a 90 °C, luego, fue sometida a hidrólisis ácida directa con 0,5 mL de HCl 6 mol/L a 110 °C por 24 h se dejó enfriar y se llevó a sequedad en las condiciones anteriores y se derivatizó con 80 μL de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) Luego, se adicionaron 80 μL de piridina, 20 μL de hexano y se dejó reaccionar a 85 °C por 45 min para tomar una alícuota para el análisis por CG-EM. La fase hexánica (extracto lipídico) se sometió a una hidrólisis ácida con 0,5 mL de la DME a 85 °C por 2 h y se agitó ocasionalmente, se enfrió y se añadieron 0,5 mL de la disolución de NaOH 2 mol/L y se dejó reposar por 3 min para tomar la alícuota de análisis. Se analizó 1 μL de muestra.

Se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N con detector selectivo de masas cuadrupolar 5975B, para el análisis de las muestras acoplado en línea con un sistema computadorizado para la adquisición y procesamiento de datos (Agilent Technologies, CA, USA). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna cromatográfica capilar de sílice fundida (30 m x 0,25 mm d.i.), con diámetro de película 0,25 μm de fase enlazada tipo HP-5MS (J&W Scientific, Agilent Technologies, CA, USA). Flujo de gas portador (He): 1,0 mL/min. Inyección en modo *splitless*. Temperaturas: inyector a 300 °C, fuente iónica a 230 °C, interface a 280 °C y cuadrupolo a 150 °C. La energía de ionización (IE) fue de 70 eV. Barrido de masas de 40-800 dalton en modo de corriente iónica total. El programa de temperaturas utilizado para el análisis de los AG fue desde 70 °C (1 min) hasta 180 °C a 20 °C/min, entonces se incrementó hasta 210 °C a 2 °C/min, finalmente, hasta 320 °C a 20°C/min y 10 min a la temperatura final. El programa de temperaturas para la determinación de los AA fue desde 100 °C (2 min) hasta 280 °C a 4 °C/min, entonces se mantuvo por 15 min a la temperatura final.

La identificación de los componentes dentro del perfil cromatográfico se llevó a cabo por CG-EM, mediante la comparación de los espectros obtenidos por impacto electrónico con los de la base de espectros Wiley275, así como con los de patrones comerciales y con los de otros trabajos publicados. Se utilizaron

los derivados TMS para los AA y para los AG los ésteres metílicos. La determinación del porcentaje relativo de cada compuesto (C_i) en las muestras, se basó en el método semi-cuantitativo de normalización interna según la ecuación siguiente:

$$C_i = \frac{\text{Área del compuesto } (i)}{\sum \text{Áreas de todos los compuestos}} \times 100 (\%)$$

Donde:

A_i representa el área de cada pico.

Se debe considerar que los aminoácidos reactivos (con grupos funcionales ácidos, bases, sulfuros e hidroxilos) son más afectados por la interacción con los pigmentos, los cuales interfieren en las reacciones de derivatización reduciendo las concentraciones de estos aminoácidos, lo que depende del tipo de pigmento y del proceso de derivatización.⁶ Por ello, para la identificación de aglutinantes en bienes culturales analizados con este método es aún más necesario seleccionar muestras con presencia de los pigmentos blanco de cinc o de plomo constituyentes de las pinturas modelo de referencia. Los espectros característicos de los ácidos grasos saturados en forma de ésteres metílicos y de los aminoácidos en forma trimetilsilil se identifican por su ion molecular determinado a través del espectrómetro de masas acoplado. Las proteínas se identifican teniendo en cuenta la abundancia relativa de sus aminoácidos más importantes: alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, serina y valina.⁸

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras modelo

Fondos de preparación:

Las muestras de fondo analizadas (5.1, 6.1 y 7.1) fueron teñidas con AB2 y FA. La primera al ser teñida con AB2 tomó una coloración azul oscuro y al reaccionar con la FA adquirió una coloración rosada intensa. En el caso de la segunda, al reaccionar con el primer colorante tomó una coloración azul ligera y con la fucsina ácida una coloración rosada. Se determinó que la naturaleza del aglutinante era proteica por medio de los colorantes. En el tercer fondo (7.1) no se coloreó la estratigrafía con las tinciones empleadas, lo que reveló la ausencia de proteínas.

Capas pictóricas:

Se analizaron las muestras 2.1 y 4.1 En la primera, la capa de preparación se teñió de un azul claro con la tinción AB2, debido a la presencia de cola animal en el soporte de la pintura mientras que la capa pictórica, se coloreó de un azul oscuro lo que confirmó la naturaleza proteica del material aglutinante. En la segunda, se observó una coloración azul intensa. Al ser teñidas con FA la capa pictórica de ambas muestras fue coloreada de un color rosado intenso.

Estudio de la interferencia de pigmentos en la tinción con AB2:

La muestra de azul cerúleo no interaccionó con el reactivo colorante, con lo que quedó del mismo color la sección estratigráfica; esto se debió a la ausencia en su composición química de un grupo nitrogenado. Sin embargo, las muestras de azul ftalocianina y azul de Prusia teñidas adquirieron una coloración azul intensa. El grupo CN, se halla en pigmentos azules como la ftalocianina y el azul de Prusia, con el que reacciona el colorante,

teñiendo ambas muestras de color azul aunque fueron aglutinados con aceite de linaza. La interferencia de estos pigmentos con el AB2 puede producir resultados falsos positivos en los análisis de aglutinantes proteicos que contengan estos pigmentos en la composición de sus capas pictóricas.

Análisis por EITF

Los espectros de los aglutinantes permitieron diferenciar la clara de la yema del huevo por la presencia de la banda intensa y estrecha en $1740\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ de vibración *stretching* del grupo $\text{C}=\text{O}$, característica de los aceites a causa de la parte oleosa del huevo y tres bandas estrechas en la región *huella dactilar* alrededor de $1\ 165\text{ cm}^{-1}$. Los espectros de la caseína y la clara del huevo no fueron diferenciables por estar constituidos fundamentalmente por la proteína caseína y ovoalbúmina respectivamente. Se observaron las bandas de absorción correspondientes a las vibraciones de *stretching* de amida I en el intervalo de $1630\text{ a }1680\text{ cm}^{-1}$ y amida II en el intervalo de $1520\text{ a }1560\text{ cm}^{-1}$, que identifican en general los aglutinantes de naturaleza proteica. La cola animal (cola de conejo) presentó estas bandas características, pero con mayor intensidad en las bandas $1232\text{ y }1078\text{ cm}^{-1}$. Mientras que la cola de pescado se diferenció del resto de los aglutinantes proteicos analizados por una banda intensa y alrededor de 1104 cm^{-1} en la región de los sulfatos. Los espectros de todos los aceites analizados, presentaron las bandas características alrededor de $1745, 1458, 1162\text{ y }721\text{ cm}^{-1}$. La banda en 1745 cm^{-1} permitió identificar la presencia de aceite en pinturas por ser el único aglutinante que tiene banda en esta región de las cinco clases posibles, donde además no existe interferencia por las bandas de los grupos SO_4^{2-} y CO_3^{2-} , siempre presentes en los materiales inertes que se emplean en las preparaciones de los soportes de obras pictóricas.

En todas las muestras, se evaluó la presencia de las bandas de resinas, ceras, gomas y aceites. En el fondo de caseína (5.1) se identificó la banda de aceite en 1740 cm^{-1} debido a la presencia de aceites en la caseína y como aglutinante del pigmento blanco de cinc usado por el restaurador para dar consistencia a la disolución de caseína y bandas de SO_4^{2-} en $1622, 1144\text{ y }1093\text{ cm}^{-1}$ que se explican por el uso de una caseína industrial ácida (material

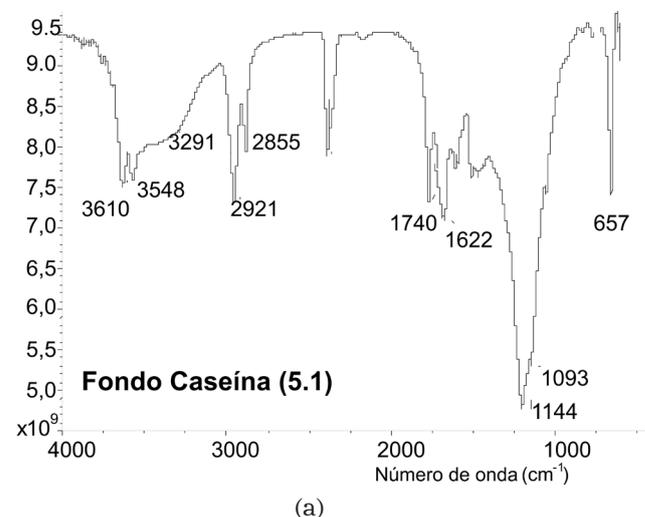


Fig. 2. Espectros por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier a) De la muestra 5.1.

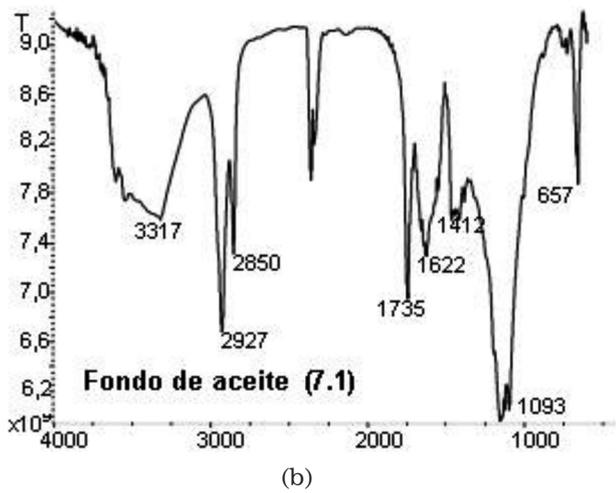


Fig. 2. Espectros por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier b) De la muestra 7.1.

más corriente), que en su proceso de fabricación emplea ácido sulfúrico que reacciona con el Ca presente y las bandas de proteínas se encuentran débiles y solapadas (F.2a). En la muestra modelo de fondo de aceite (7.1) se

identificaron tres bandas de SO_4^{2-} una banda en 1622 cm^{-1} y dos bandas intensas alrededor de 1093 cm^{-1} , por la presencia del yeso utilizado como material de carga en la preparación magra y la banda intensa de aceite en 1735 cm^{-1} (F.2b).

En la muestra de fondo mixto (6.1) se identificaron las bandas: de proteína en 1638 cm^{-1} , de CO_3^{2-} en 1416 y 872 cm^{-1} y el doblete del SO_4^{2-} en 1098 y 1150 cm^{-1} y la banda característica del aceite muy débil que luego fue confirmada en el espectro de la muestra extraída (respecto al aceite) donde se definieron todas las bandas características más intensas del aceite en 1746 , 1454 y 1153 cm^{-1} (F.3).

En la muestra de capa pictórica (2.1) se identificó la presencia de las bandas características de proteínas en 1658 y 1535 cm^{-1} en idéntica posición respecto al espectro de la clara de huevo y bandas estrechas e intensas de CO_3^{2-} en 1407 y 878 cm^{-1} (F.4a), como resultado del empleo de blanco de plomo como pigmento. En la muestra de capa pictórica (4.1), se identificó la presencia de aceite por la banda intensa y estrecha en 1745 cm^{-1} debido a la parte lipídica de la yema del huevo presente (F.4b). Se observan además bandas en 1653 y 1545 cm^{-1} de las amidas debido al aglutinante de naturaleza proteica y la banda en 1401 cm^{-1} debido al CO_3^{2-} aportado por el blanco de

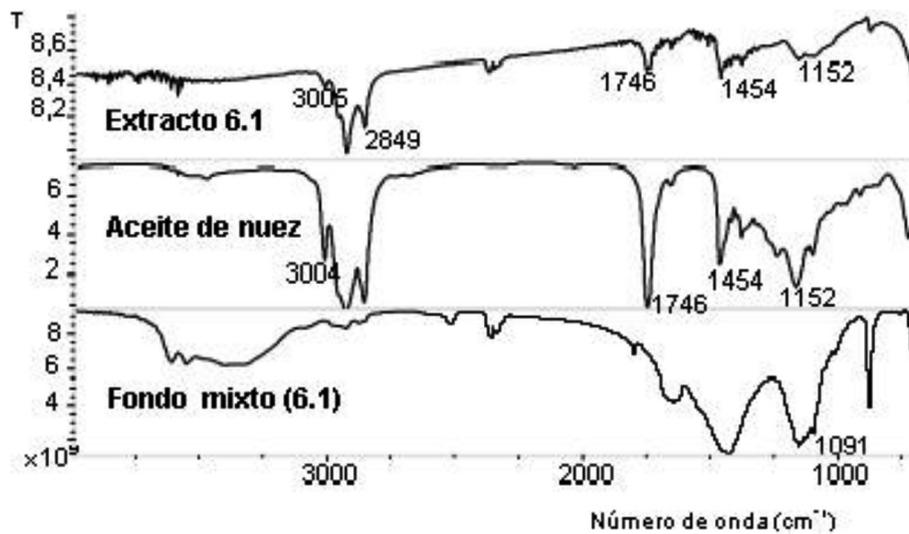
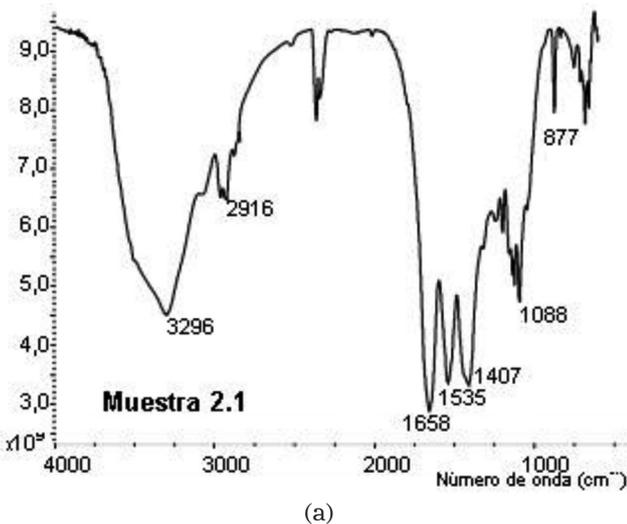
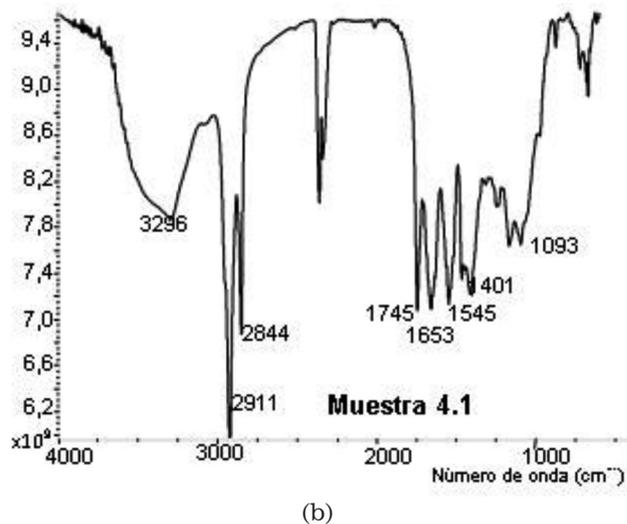


Fig. 3. Espectro por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier de la muestra 6.1.



(a)



(b)

Fig. 4. Espectros por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier a) De la muestra 2.1. b) De la muestra 4.1.

plomo y el fondo de creta de la preparación del soporte. Se identificó también un doblete débil alrededor de 1093 cm^{-1} por la presencia minoritaria de SO_4^{2-} . En la muestra de capa pictórica (9.1) se identificó la presencia de aceite en 1735 cm^{-1} y una banda ancha e intensa CO_3^{2-} en 1386 cm^{-1} , debido al blanco de plomo.

Fondo de caseína (5.1 y 5.3):

El aglutinante derivado de la leche, se determinó por sus porcentajes de leucina (Tabla 1, F.5a). Los porcentajes elevados de este aminoácido respecto a las demás muestras modelo analizadas es indicativo del proceso de degradación de esta proteína.^{6-8,22} No se identificaron los elevados de ácido glutámico, ácido aspártico y prolina, correspondientes a la caseína natural (derivado de la leche),²³ lo que se explica por el uso de la caseína ácida industrial.

Fondo mixto (6.1):

La presencia proteica pudo comprobarse mediante los porcentajes elevados de glicina, prolina e hidroxiprolina (Tabla 1), lo que identificó la cola animal como aglutinante de la preparación magra que forma el fondo mixto (Tabla 1; F.5b). En el fondo mixto, se confirmó la presencia de aceite a través de la detección de los ácidos grasos: cáprico, láurico, mirístico palmítico y esteárico (Tabla 1). En esta muestra, se descartó la presencia del aglutinante yema de huevo debido a la ausencia de colesterol en la fracción lipídica.²⁴ El conjunto de ácidos grasos hallados es característico de un aceite secante, lo que se confirmó porque la relación entre el ácido palmítico y el esteárico es mayor que la unidad.^{8,25}

Análisis por CG-EM

Tabla 1. Aminoácidos (%) presentes en las muestras modelos y ácidos grasos (%) presentes en la fracción oleosa del medio mixto.

Aminoácido	5.1	6.1	2.1	4.1		
Alanina	5,1	5,00	4,51	4,37		
Valina	2,73	1,43	1,37	2,48	Ácidos grasos	
Leucina	3,37	1,74	1,92	2,84	C10:0 cáprico	0,64
Isoleucina	1,80	1,11	1,37	1,84	C12:0 láurico	33,39
Prolina	3,07	6,57	3,25	3,72	C14:0 mirístico	18,99
Glicina	28,20	52,65	53,77	41,04	C16:0 palmítico	33,72
Serina	1,80	1,51	0,58	2,92	C18:0 esteárico	3,87
Treonina	0,70	0,62	0,44	1,21	C16:0/18:0	8,71
Ácido piroglutámico	3,11	5,70	8,47	7,02		
Ácido aspártico	1,62	3,68	3,58	5,72		
Hidroxiprolina	1,66	5,66	2,34	2,96		
Fenilalanina	0,96	0,74	1,12	1,58		
Lisina	0,13	1,13	1,69	1,90		
Tirosina	0,03	0,06	0,21	0,25		

un objeto de arte real la interferencia de los pigmentos. Esta pintura mural contiene verde cinabrio formado por la mezcla de los pigmentos azul de Prusia $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ y amarillo de cromo (PbCrO_2). La coloración tomada en este caso por la capa pictórica (2) de la muestra fue indicativo de la reacción que ha tenido lugar entre el CN y el AB2.

Pintura mural Casa de la Obrapia. Se analizaron las muestras de colores representativos R1, R2, R3, R4 y R5 de la pintura mural de la Casa de la Obrapia, y luego de la tinción, no se apreciaron cambios en la coloración de las capas lo que demostró el empleo de un aglutinante de naturaleza no proteica. Estos pigmentos no eran nitrogenados según análisis

Capa pictórica con clara de huevo (2.1):

La clara de huevo se identificó por sus elevados contenidos de ácido glutámico y por los bajos porcentajes de treonina con respecto a la yema (Tabla 1, F. 5c).^{6,21,25} Otras contribuciones importantes fueron las de alanina, leucina, valina e isoleucina. A su vez, la glicina y la hidroxiprolina, se encontraron en cantidades elevadas, lo que puede ser explicado por la presencia de cola animal como aglutinante en el fondo de creta de la preparación.

Capa pictórica con yema de huevo (4.1):

El aglutinante yema de huevo estaba compuesto por dos fracciones importantes, donde estaban incluidas proteínas y ácidos grasos. La identificación proteica de la yema de huevo se verificó por las cantidades elevadas de ácido aspártico, serina y prolina respecto a la clara (Tabla 1, Fig. 5d).⁸ Otros aminoácidos detectados en proporciones elevadas fueron isoleucina, prolina, fenilalanina, lisina y tirosina con respecto a los restantes aglutinantes de origen proteico. La parte lipídica de la yema aportó ácidos grasos dentro de los cuales el ácido resultó predominante. Se detectaron trazas de colesterol, el cual es un marcador de este aglutinante. Sin embargo, las bajas cantidades de este compuesto, se atribuyeron a los procesos de degradación.²⁴

Muestras reales

Análisis histoquímico

Pintura mural San Francisco Nuevo. El estudio de la muestra R6 se realizó con el objetivo de comprobar en

de Fluorescencia de Rayos X (FRX).

Policromía Evangelista San Juan. Las muestras para diferentes puntos de la policromía R12 y R13 del evangelista San Juan (Siglo XVIII), reaccionaron con el colorante AB2 adquiriendo una tonalidad azul tanto en la capa de preparación 1 como en la capa pictórica 2, lo que reveló la naturaleza proteica del aglutinante. Se analizaron las muestras de naturaleza proteica por EITF y CG-EM.

Análisis por EITF

En todas las muestras de la policromía del evangelista San Juan, se analizaron las bandas características de resinas, ceras, y gomas, excluyendo estos aglutinantes. En la muestra R11 (estrato de preparación) se identificó un doblete intenso de SO_4^{2-} alrededor de 1114 cm^{-1} correspon-

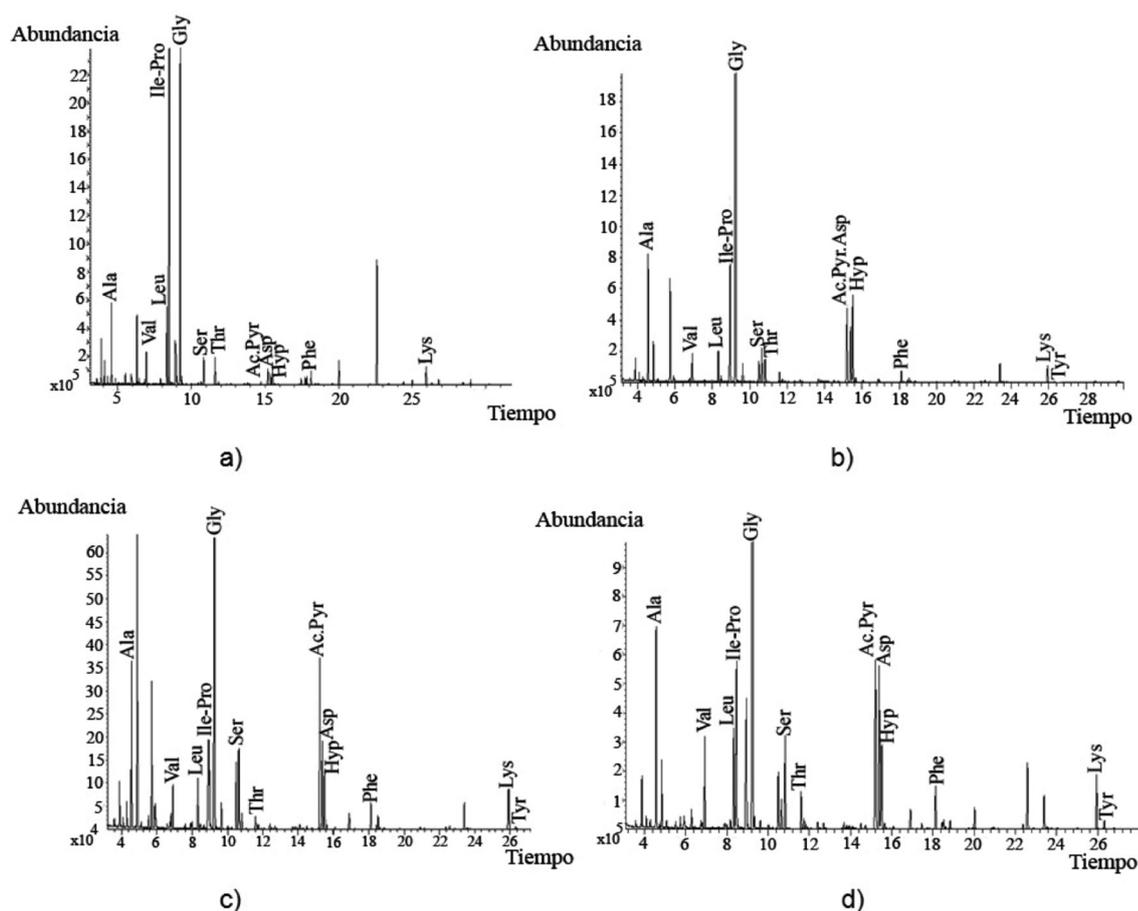


Fig. 5. Cromatogramas por CG-EM de los aminoácidos. a) Presentes en la caseína. b) Del medio mixto. c) Presentes en la clara de huevo. d) Presentes en la yema de huevo.

diente al yeso utilizado en esta preparación y una banda débil de CO_3^{2-} en 1411 cm^{-1} por la presencia minoritaria de carbonato aportada por la toma no deseada de parte de la capa pictórica basada en blanco de plomo identificadas en estudios anteriores de la distribución de elementos químicos en la sección transversal por micro-FRX. No **hubo/se observó** la presencia de las bandas características de aceites y se identificó una banda estrecha en 1620 cm^{-1} de SO_4^{2-} superpuesta sobre las bandas amida I y una débil banda amida II. En la comparación con los espectros de aglutinantes y particularmente con los de naturaleza proteica, las bandas indicadoras de proteína se desplazaron respecto a su posición en los espectros de caseína, clara y yema del huevo y coincidieron con el espectro de referencia de la cola animal (cola de conejo), lo cual deberá ser confirmado mediante técnicas cromatográficas. En la muestra R7 (estrato de carnación) se observó el doblete correspondiente al SO_4^{2-} en 1080 y 1172 cm^{-1} , debido en gran medida a la contaminación en la toma de muestra con la capa de preparación. Además, se observó la banda correspondiente al CO_3^{2-} en 1408 cm^{-1} , debida al blanco de plomo. Asimismo se identificó una banda ancha alrededor de 1624 cm^{-1} debido a la superposición de amida I y amida II desplazada respecto a la posición de estas bandas en los espectros de los aglutinantes caseína, clara y yema del huevo. No se observó la banda característica del aceite en los $1740\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$. En la muestra R8 (estrato de azul), se **conocía/ío** que la capa original de azul claro estaba compuesta por blanco de plomo y azul ultramar por análisis de FRX. En el espectro no se observaron bandas características de aceites y se identificó igualmente el doblete del SO_4^{2-} en 1075 y 1172

cm^{-1} . El espectro presentó además, una banda en 1408 cm^{-1} característica del CO_3^{2-} por la presencia de blanco de plomo y una banda ancha en 1591 cm^{-1} que indicó aglutinante de naturaleza proteica. En la muestra R11 (estrato blanco de la nube) ocurrió una contaminación por yeso de la preparación. Se identificaron bandas características de SO_4^{2-} en 1075 y 1172 cm^{-1} , además de la banda identificativa del CO_3^{2-} en 1408 cm^{-1} por el blanco de plomo y una banda en 1586 cm^{-1} que incluyó las dos amidas que identificaron la naturaleza proteica. En la muestra R9 (estrato siena claro) se identificó una contaminación con yeso de la preparación por la presencia del doblete de SO_4^{2-} alrededor de 1085 cm^{-1} y la banda de 1634 cm^{-1} superpuesta sobre otra ensanchada de amida. En la muestra R10 (estrato blanco del libro) se identificó la banda intensa del CO_3^{2-} por el blanco de plomo en 1408 cm^{-1} . Las bandas amidas estuvieron solapadas como en la muestra 4 y ocurrió contaminación con yeso por la presencia del doblete del SO_4^{2-} . (F6)

Análisis por CG-EM

Al analizar una muestra real (R11, blanco de la nube) perteneciente a la policromía del evangelista San Juan (siglo XVIII), se encontró la presencia de un aglutinante proteico y uno oleoso (Tabla 2). En la fracción proteica, se detectó una mayor proporción de glicina e hidroxiprolina respecto al resto de los aminoácidos, lo que resultó indicativo de la presencia de cola animal utilizada como aglutinante. Además, esto fue confirmado por los elevados valores de las relaciones ala/phe, gly/ile, hyp/leu y pro/leu y de las menores proporciones entre leu/ala, val/ala y ala/gly y con respecto a los aglutinantes de yema y de clara.⁶ La detección de ácidos grasos pudiera ser

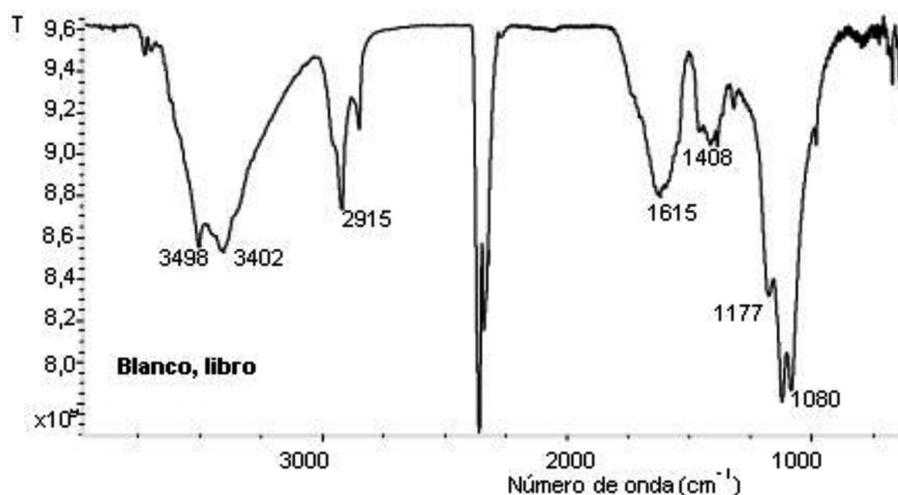


Fig. 6. Espectro por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier de la muestra (R15).

Tabla 2. Contenido y razón de aminoácidos en la muestra correspondiente al Evangelista San Juan.

Aminoácidos	%	Razón de aminoácidos	Muestra
Ala	7,3	Ala/Phe	7,72
Ácido. 2-aminobutírico	0,27	Gly/Ile	7,34
Val	2,18	Hyp/Leu	1,99
Leu	2,18	Pro/Leu	1,83
Ile	2,2	Glu/Asp	0,78
Prol	4,0	Leu/Ala	0,30
Gly	45,32	Val/Ala	0,29
Ser	1,71	Ser/Ile	0,28
Thr	0,76	Ala/Gly	0,16
Ácido piroglutámico	2,38		
Asp	3,04		
Hyp	4,34		
Phe	0,95		
Lys	0,56		

atribuida a la presencia de aceites secantes utilizados en el repinte oleoso realizado en la primera restauración de la obra. Un ejemplo de la confirmación sobre la identificación de estos AG lo constituyó el espectro de masas del ácido palmítico, el cual fue confirmado con la biblioteca Wiley275. La formación de diácidos resultó indicativo de la degradación de este tipo de aceite. Las fuertes condiciones ácidas requeridas en el paso de hidrólisis implican que los ácidos grasos son solo parcialmente liberados de los lípidos a causa de la ocurrencia de un equilibrio de reacción y de su baja solubilidad (26), además de la formación de ácidos grasos cortos y diácidos volátiles que se han oxidado. Estos ácidos se forman durante el proceso de secado de las capas de pintura, ya que en este momento los aceites presentan gran cantidad de ácidos grasos insaturados. La hidrólisis del enlace éster inicial puede contribuir también a la formación de ácidos grasos libres.

CONCLUSIONES

Se identificó la naturaleza del aglutinante en las muestras modelo de técnicas pictóricas tradicionales de estudio y la interferencia de pigmentos con presencia de nitrógeno por medio del análisis histoquímico con el uso de tinciones específicas.

La implementación de la técnica de Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier permitió iden-

tificar el aglutinante proteico en las muestras modelo (excluyendo resinas, gomas, aceites y ceras), a excepción del fondo de caseína, debido a la presencia mayoritaria de sulfatos incorporados en el proceso de preparación industrial de la caseína ácida.

La CG-EM permitió identificar el aglutinante específico en las muestras modelo, a partir del porcentaje de aminoácidos marcadores, en adición de ácidos grasos y el colesterol en el caso de la yema de huevo.

El análisis combinado de los métodos implementados permitió demostrar que en las obras pictóricas: murales en la Casa de Obrapia y la iglesia San Francisco Nuevo, la técnica empleada fue de naturaleza no proteica, mientras en la Policromía San Juan, del siglo XVIII, se pudo identificar presencia proteica (análisis histoquímico), así como determinar que la técnica artística empleada no es oleosa ni mixta sino una técnica al temple por emplear un aglutinante de naturaleza proteica (EITF), identificado como cola animal (CG-EM).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vandenebeele P, Wehling B, Moens L, Edwards H, De Reu M, Van Hooydonk G. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Anal Chim Acta.* 2000;407:261-274.

2. Doménech-Carbó MT, Casas-Catalán MJ, Doménech-Carbó A, Mateo-Castro R, Gimeno-Adelantado JV, Bosch-Reig A. Analytical study of canvas painting collection from the Basilica de la Virgen de los Desamparados using SEM/EDX, FT-IR, GC and electrochemical techniques. *Fresenius JF Anal Chem* 2001;369:571-575.
3. Manzano E, Navas N, Checa-Moreno R, Rodríguez-Simón L, Capitán-Vallvey L. Preliminary study of UV ageing process of proteinaceous paint binder by FT-IR and principal component analysis. *Talanta*. 2009;77(5):1724-1731.
4. Rosi F, Federic A, Brunetti BG, Sgamellotti A, Clementi S. *et al.* Multivariate chemical mapping of pigments and binders in easel painting cross-sections by micro IR reflection spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011;399(9):3133-3145.
5. Andreotti A, Bonaduce I, Colombini MP, Gautier G, Modugno F, Ribechini E. Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous, and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample. *Anal Chem*. 2006;78:4490-4500.
6. Grzywacz CM. Identification of proteinaceous binding media in paintings by aminoacids using 9-I clorofórmate derivatization and reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1994;676:177-183.
7. Gimeno-Adelantado JV, Mateo-Castro R, Doménech-Carbo MT, Bosch-Reig F, Doménech-Carbo A *et al.* Analytical study of proteinaceous binding media in works of art by gas chromatography using alkyl chloroformates as derivatising agents. *Talanta*. 2002;56(1):71-77.
8. Colombini MP, Fuoco R, Glacomelli A, Mustatello B. Characterization of proteinaceous binders in wall painting samples by microwave-assisted acid hydrolysis and GC-MS determination of aminoacids. *Studies in Conservation*. 1998;43:33-41.
9. Colombini MP, Andreotti A, Bonaduce I, Modugno F, Ribechini E. Analytical Strategies for Characterizing Organic Paint Media Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Account of Chemical Research*. 2010;43(6):6715-727.
10. Lluveras A, Bonaduce I, Colombini MP. A GC-MS analytical procedure for the characterisation of organic materials in paint samples: determination of lipids, waxes, resins, proteinaceous and polysaccharide materials in the same micro sample and in the presence of interfering inorganic pigments. En *Libro de Ponencias: MaSC 2009*. Abril. 2009.
11. Cappitelli F, Learner T, Chiantore O. An initial assessment of thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography/mass spectrometry for the identification of oils from dried paint films. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2002;63(2):339-348.
12. Douda J, Basiuk VA. Pyrolysis of amino acids: recovery of starting materials and yields of condensation products. *J Anal Appl Pyrolysis*. 2000;56 (1):113-121.
13. Fremout W, Dhaenens M, Saverwyns S, Sanyova J, Vandnabeele P, Deforce D, Moens L. Tryptic peptide analysis of protein binders in works of art by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2010;658(2):156-162.
14. Fremout W, Sanyova, Saverwyns S, Vandnabeele P, Moens L. Identification of protein binders in works of art by high-performance liquid chromatography-diode array detector analysis of their tryptic digests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009;393(8):1991-1999.
15. Workshop on Binding Media Identification in Art Objects. Information booklet and book of abstracts. Amsterdam: Labs Tech; 2003.
16. International Workshop of organic materials (binding media, varnishes, pigments) in paint cross sections, 6th framework programme. Bologna: Euro-ARTECH; 2007.
17. Mayer R. *Materiales y Técnicas de Arte*. 2da edición. Madrid: Blumen H. Editor; 1993.
18. Doerner M. *The Materials of the Artists and Their Use in Painting: With Notes on the Techniques of the Old Master*. San Diego: Harcourt; 1984.
19. UNE 84-026
20. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. [Consultado 11 de marzo de 2010]. Disponible en: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng
21. FT-IR Spectra of binder and colorants [Consultado 11 de marzo de 2010]. Disponible en: http://www.ut.ee/katsekoda/IR_Spectra
22. Andreotti A, Bonaduce I, Colombini MP, Gautier G, Modugno F, Ribechini E. Combined GC/MS Analytical Procedure for the Characterization of Glycerolipid, Waxy, Resinous, and Proteinaceous Materials in a Unique Paint Microsample. *Anal Chem*. 2006;78:4490-4500.
23. Rose CL, Von Endt D. *Protein Chemistry for Conservators*. Washington DC.: American Institute for Conservation Historic and artistic Works, W.editor; 1984.
24. Van den Brink OF. Molecular changes in egg tempera paint dosimeters as tools to monitor the museum environment. 2001.
25. Pacáková, Prikryl P, Havlickova L, Raldilova J, Stulik K, Hofta P. Gas chromatography mass spectrometry of oils and binders in paintings. *J Sep Sci*. 2008;31:1067-1073.