

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

ESTUDIO ANALÍTICO DE MATERIALES EMPLEADOS EN  
BARNICES, AGLUTINANTES Y CONSOLIDANTES EN  
OBRAS DE ARTE MEDIANTE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS Y ESPECTROMÉTRICOS

JUAN PERIS VICENTE

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 28 de Novembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Bosch Reig
- D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Teresa Galcerán Huguet
- D. Luis María Polo Díez
- D. Roberto Sebastiano
- D<sup>a</sup>. Pilar Roig Picazo

Va ser dirigida per:

D. José Vicente Gimeno Adelantado

D<sup>a</sup>. María Teresa Doménech Carbó

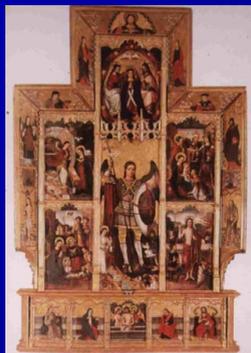
©Copyright: Servei de Publicacions  
Juan Peris Vicente

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7003-2

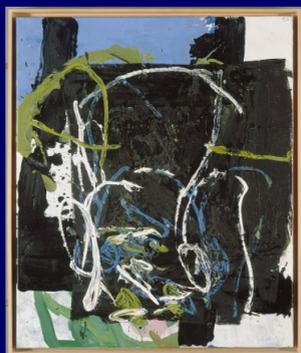
Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



**Estudio analítico de materiales empleados en barnices, aglutinantes y consolidantes en obras de arte mediante métodos cromatográficos y espectrométricos**



**Tesis Doctoral presentada por:  
Juan Peris Vicente**

**Directores:  
Dr. José Vicente Gimeno Adelantado  
Dra. María Teresa Doménech Carbó**

# FACULTAD DE QUÍMICAS



## DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

### Estudio analítico de materiales empleados en barnices, aglutinantes y consolidantes en obras de arte mediante métodos cromatográficos y espectrométricos

Tesis Doctoral presentada por:  
**Juan Peris Vicente**  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas  
por la Universidad de Valencia

Directores:  
**Dr. José Vicente Gimeno Adelantado**  
**Dra. María Teresa Doménech Carbó**

Valencia, Septiembre 2007

# FACULTY OF CHEMISTRY



## DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

### Analytical study of materials used in varnishes, binding media and consolidants in artworks by chromatographic and spectrometric methods

Doctoral Thesis presented by:

***Juan Peris Vicente***

to reach the Ph.D. degree in Chemistry  
by the University of Valencia

Supervisors:

***Dr. José Vicente Gimeno Adelantado***

***Dra. María Teresa Doménech Carbó***

Valencia, September 2007

# DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



## VNIVERSITAT D VALÈNCIA

El Dr. José Vicente Gimeno Adelantado, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia y la Dra. María Teresa Doménech Carbó, Catedrática del Departamento de Conservación y Restauración de Bienes Culturales y Directora del Instituto de Restauración del Patrimonio de la Universidad Politécnica de Valencia, como directores de la Tesis Doctoral “**Estudio analítico de materiales empleados en barnices, aglutinantes y consolidantes en obras de arte mediante métodos cromatográficos y espectrométricos**”, realizada por Juan Peris Vicente, autorizan la lectura de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia, en septiembre de 2007

Fdo. Dr. José Vicente Gimeno Adelantado

Fdo. Dra. María Teresa Doménech Carbó

La realización de esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo de un gran número de personas:

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a mi director de Tesis, el Profesor Dr. José Vicente Gimeno Adelantado, por haberme introducido y haberme hecho avanzar en el mundo de la investigación, así como por toda su ayuda y consejos recibidos durante el desarrollo de la Tesis. Sin su dedicación, paciencia y apoyo en los momentos difíciles, tanto el trabajo realizado como la propia Tesis no habrían sido posibles. De él he aprendido mucho, no sólo en el campo de la investigación científica, sino en el ámbito de la vida cotidiana, debido a su gran calidad humana.

Asimismo quisiera dar las gracias a mi co-directora de Tesis, la Profesora Dra. María Teresa Doménech Carbó, por su confianza total hacia mi trabajo, los consejos que me ha proporcionado, y los conocimientos sobre los materiales presentes en muestras de origen artístico y su estudio analítico.

Quiero extender mi agradecimiento al Profesor Dr. Ernesto Simó Alfonso por compartir conmigo su saber en Cromatografía, Espectrometría de Masas y especialmente en Quimiometría, así como por participar activamente en parte del trabajo descrito en la presente Tesis e incrementar su valor científico. Asimismo agradezco a la Profesora Dra. Adela Mauri Aucejo por la atención especial que me ha prestado a nivel personal y en mi evolución en la actividad investigadora.

Gracias a los Profesores Dr. Sinfiriano Sánchez Ramos, Dr. Rufino Mateo Castro, Dra. Misericordia Jiménez Escamilla y Dr. Antonio Doménech Carbó por sus valiosos consejos, los cuales también me han permitido aumentar mis conocimientos, así como su continuo interés en el desarrollo de mi labor científica.

No puedo dejar de agradecer al Profesor Dr. Francisco Bosch Reig, por su especial interés en mi formación científica. Asimismo agradezco a los Profesores Dra. Rosa Villanueva Camañas, Dr. José Manuel Herrero Martínez y Dra. Carmen Molins Legua, por su interés por mí y mi trabajo, así como al Profesor Dr. Carlos Mongay Fernández por estar disponible cuando ha sido necesario como Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia.

Quisiera transmitir mi agradecimiento al personal de administración, en especial a Javier García Vento y a Lourdes Menor Sánchez, por su ayuda y disponibilidad a la hora de resolver problemas técnicos o burocráticos.

También querría agradecer a mis compañeros más cercanos:

especialmente a Francisco Manuel Valle Algarra, por su compañía, consejos y apoyo en los momentos difíciles, al Dr. Ángel Medina Vayá, de quien adquirí mis nociones básicas de Microbiología y a Andreu Campos Candel, por su compañía durante estos años. Juntos hemos pasado buenos momentos durante todos estos años, sin olvidar los Congresos a los que hemos asistido como grupo. Asimismo extendo mi agradecimiento a Miguel Ángel Ferrer Eres, por los trabajos que hemos compartido y por transmitirme sus conocimientos sobre arqueología.

Quisiera dar las gracias a mis compañeras del grupo de estudio de obras de arte, Dra. Dolores Yusá Marco, Dra. Laura Osete Cortina, Dra. Mari Carmen Saurí Peris y Juana de la Cruz Cañizares, por sus consejos, ideas y sugerencias, que me han ayudado a superar las dificultades que se presentan en el laboratorio.

No quisiera olvidarme de mis compañeros del Departamento de Química Analítica con los que, a pesar de no haber compartido trabajo, sí que hemos pasado momentos inolvidables juntos, como Chistopher, Tania, Anna, Cristina, Sandra, María Jesús, Victoria, José Ramón y Daniel.

Quisiera agradecer a los que me permitieron desarrollar mi proyecto de investigación en el “Centre de Recherche et Restauration del Musées de France, Palais du Louvre” y en el “Musée de la Musique”, especialmente a sus respectivos Directores Jean Michel Menu y Stephane Vaiedelich. También agradezco a Christine Benoît y Jean Philippe Echard, por haber supervisado mi trabajo, por sus consejos, ayuda y por haberme transmitido sus enseñanzas acerca de los barnices de instrumentos musicales históricos, su valor estético, la composición química y los métodos de análisis. Igualmente agradezco a los demás miembros del laboratorio, especialmente a Vincent Mazel por su cercanía y ayuda. Pour tous, mes très sincères remerciements.

Asimismo, agradezco a los que hicieron posible mi estancia de investigación en el Doerner Institut, Bayerische Staatsgemäldesammlungen, Munich, Alemania: a su Director, el Dr. Andreas Burmester, quien me introdujo en el Centro, a la directora del Departamento de Ciencias Naturales, Dra. Heike Stege, quien dirigió el proyecto acerca del estudio analítico de materiales sintéticos en obras pictóricas modernas en el que colaboré, y me brindó toda la ayuda posible, a mis compañeras de laboratorio Karin Lutzenberger y Ursula Baumer, que estuvieron a mi lado en todo momento, y a los demás miembros del Doerner Institut como Annette Ihle, Christian Nippert, Lars Raffelt, Cornelia Tilenschi y Gunther Bisschof. A todos ellos les agradezco no sólo su compañía y transmisión de su saber en las diferentes ramas del estudio de las obras de arte pictóricas, sino también el impulso definitivo para aprender su hermoso idioma. Herzliche Danken für allen.

Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia haberme concedido la

beca de Formación del Profesorado Universitario, que me ha permitido desarrollar mi Tesis Doctoral, así como la realización de dos estancias de investigación en Centros Extranjeros de gran relevancia en el ámbito del estudio científico de objetos pertenecientes al Patrimonio Cultural, las cuales me permitieron alcanzar el requisito necesario para la obtención del Doctorado con la mención de “Doctor Europeus”.

Asimismo agradezco la financiación del Ministerio de Educación y Cultura y la Unión Europea (a través del programa de I+D+i y los fondos FEDER, respectivamente) para los proyectos de investigación en los que se basa el trabajo desarrollado para la Tesis Doctoral: ‘Estudio analítico y estado de envejecimiento de barnices, aglutinantes, y consolidantes utilizados en obras de arte españolas (siglos XVI-XIX) mediante FTIR, Microscopía IR, HPLC, Electroforesis, Electro cromatografía y Voltamperometría’ con referencia: BQU2001-2776-CO3-02, “Desarrollo de métodos de análisis para caracterizar resinas sintéticas utilizadas como materiales filmógenos en obras de arte españolas mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas y electroanalíticas” con referencia: CTQ2004-06754-CO3-02/BQU y “Estudio analítico de resinas sintéticas utilizadas en arte contemporáneo mediante técnicas espectrométricas, cromatográficas y electroquímicas” con referencia CTQ2005-09339-CO3-02/BQU.

Fuera del laboratorio, también he de agradecer a numerosas personas que han sido mi apoyo durante todos estos años:

A mis amigos, en especial a Pablo, Miguel Ángel, Alberto y Paco, con los que he pasado buenos y malos momentos, espero que nuestra amistad dure muchos años.

A mis familiares, en especial a mis abuelos, María Castellar Alcaina, Daniel Vicente Debón, Dolores Martínez Crespo y Vicente Peris Chalmeta, tanto los que se han ido como los que están cerca, ellos y su memoria me han acompañado durante mis años de doctorado.

También agradezco profundamente a mi padre, Vicente Peris Martínez, por su cariño y sus valiosos consejos, su recuerdo y ejemplo ha sido indispensable para darme fuerzas todos estos años, y a mi madre María Vicente Alcaina, sin cuyo sacrificio y apoyo esta Tesis Doctoral no habría sido posible. Nunca podré devolverles lo que han hecho por mí.

*Als meus pares,*

# ***ÍNDICE***

---

**PARTE A****ESTUDIO ANALÍTICO DE MATERIALES EMPLEADOS EN  
BARNICES, AGLUTINANTES Y CONSOLIDANTES EN OBRAS  
DE ARTE MEDIANTE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y  
ESPECTROMÉTRICOS****I. INTRODUCCIÓN .....5****II. OBJETIVOS .....9****III. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL****1. Materiales orgánicos empleados como aglutinantes,  
consolidantes y cubrientes en obras de arte pictóricas ..... 13****1.1 Descripción general de los materiales empleados  
en obras de arte ..... 13**

## 1.1.1 Características generales..... 13

## 1.1.2 Factores causantes del deterioro ..... 15

**1.2 Proteínas..... 16**

## 1.2.1 Generalidades..... 16

## 1.2.2 Aplicación de proteínas en obras pictóricas ..... 18

## 1.2.3 Características químicas..... 19

## 1.2.4 Alteración química a lo largo del tiempo ..... 20

**1.3 Ceras naturales..... 24**

## 1.3.1 Descripción..... 24

## 1.3.1.1 Descripción de las ceras de origen animal..... 24

## 1.3.1.2 Características de las ceras de origen vegetal..... 25

## 1.3.1.3 Mecanismos de biosíntesis de ceras naturales..... 26

## 1.3.1.4 Descripción de las ceras de origen mineral..... 27

## 1.3.1.5 Uso de ceras naturales a lo largo de la historia ..... 28

## 1.3.2 Aplicación de ceras en obras pictóricas ..... 28

## 1.3.3 Características químicas..... 30

## 1.3.4 Alteraciones producidas a lo largo del tiempo..... 30

<b>1.4 Aceites secantes</b> .....	31
1.4.1 Generalidades .....	31
1.4.2 Aplicación en obras pictóricas.....	34
1.4.3 Características químicas .....	36
1.4.4 Mecanismos de envejecimiento .....	37
<b>1.5 Barnices de instrumentos musicales.</b>	
<b>Resinas terpénicas</b> .....	43
1.5.1 Descripción general de las piezas de los violines.....	43
1.5.2 Evolución histórica y materiales usados en la elaboración de violines .....	43
1.5.3 Generalidades acerca de la influencia de los barnices en instrumentos musicales .....	45
1.5.4 Características químicas de las resinas terpénicas.....	48
1.5.5 Características químicas de otros materiales empleados en barnices de violines.....	51
1.5.5.1 Disolventes .....	51
1.5.5.2 Aditivos .....	52
1.5.5.3 Colorantes.....	55
1.5.6 Alteraciones experimentadas por resinas terpénicas.....	57
1.5.6.1 Mecanismos de oxidación de abietanos y pimaranos ..	57
1.5.6.2 Procesos de envejecimiento de los labdanos .....	60
1.5.6.3 Mecanismos de oxidación de triterpenoides .....	60
<b>1.6 Resinas sintéticas</b> .....	62
1.6.1 Descripción y características químicas de las principales resinas sintéticas .....	63
1.6.1.1 Polivinilos.....	63
1.6.1.1.1 Poliolefinas.....	65
1.6.1.1.2 Resina de hidrocarburos saturada .....	66
1.6.1.1.3 Resina de cumarona (indeno-benzofurano) ...	66
1.6.1.1.4 Acetato de polivinilo .....	66
1.6.1.1.5 Alcohol polivinílico.....	67
1.6.1.1.6 Poliacrílicos .....	67
1.6.1.2 Polímeros formados por condensación .....	68
1.6.1.2.1 Resinas alquídicas .....	68
1.6.1.2.2 Poliésteres .....	68
1.6.1.2.3 Resinas epoxídicas .....	69
1.6.1.2.4 Resinas cetónicas .....	69
1.6.1.2.5 Resinas de fenol-formaldehído .....	71
1.6.1.2.6 Poliacroleínas .....	72
1.6.1.3 Resinas semiorgánicas.....	73
1.6.1.3.1 Nitrato de celulosa .....	73

1.6.1.3.2	Etilpolisiloxano .....	74
1.6.2	Aplicación en obras artísticas .....	74
1.6.2.1	Polivinilos .....	75
1.6.2.1.1	Poliolefinas y resina de hidrocarburos saturada .....	75
1.6.2.1.2	Resina de cumarona (indeno-benzofurano) ..	75
1.6.2.1.3	Acetato de polivinilo .....	76
1.6.2.1.4	Alcohol polivinílico.....	76
1.6.2.1.5	Poliacrílicos .....	76
1.6.2.2	Polímeros de condensación.....	76
1.6.2.2.1	Resinas alquídicas.....	77
1.6.2.2.2	Resinas epoxídicas.....	77
1.6.2.2.3	Resinas cetónicas.....	77
1.6.2.2.4	Polímeros de fenol/formaldehido .....	78
1.6.2.3	Polímeros semiorgánicos .....	79
1.6.2.3.1	Nitrato de celulosa .....	79
1.6.2.3.2	Polímeros de etilsiloxano.....	79
1.6.3	Mecanismos de envejecimiento de resinas sintéticas.....	80
<b>2.</b>	<b>Técnicas y metodologías analíticas de caracterización.....</b>	<b>81</b>
<b>2.1</b>	<b>Espectroscopia de infrarrojo y Raman .....</b>	<b>81</b>
<b>2.2</b>	<b>Cromatografía de gases .....</b>	<b>82</b>
2.2.1	Vaporización en inyector .....	83
2.2.2	Pirólisis previa .....	83
<b>2.3</b>	<b>Electroforesis capilar .....</b>	<b>84</b>
<b>2.4</b>	<b>Cromatografía líquida de alta resolución.....</b>	<b>85</b>
2.4.1	Cromatografía líquida con detector de ultravioleta visible .....	85
2.4.2	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia .....	86
2.4.3	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas... ..	88
2.4.4	Cromatografía líquida acoplada a otros detectores.....	89
<b>2.5</b>	<b>Cromatografía por exclusión de tamaño.....</b>	<b>90</b>

**IV. PARTE EXPERIMENTAL**

<b>1. Desarrollo de un método analítico para la caracterización de proteínas empleadas como aglutinantes en obras de arte pictóricas mediante cromatografía de líquidos con detector de Fluorescencia .....</b>	<b>93</b>
<b>1.1 Reactivos y disolventes.....</b>	<b>93</b>
<b>1.2 Patrones y sustancias de referencia.....</b>	<b>93</b>
<b>1.3 Descripción de muestras procedentes de obras de arte .....</b>	<b>93</b>
<b>1.4 Instrumentación.....</b>	<b>95</b>
<b>1.5 Tratamiento previo de muestras y patrones.....</b>	<b>95</b>
1.5.1 Hidrólisis de las proteínas.....	96
1.5.2 Procedimiento de derivatización.....	96
<b>2. Desarrollo de una metodología analítica para la caracterización de ceras naturales en obras pictóricas a partir de su contenido en ácidos grasos e hidrocarburos mediante cromatografía de gases .....</b>	<b>97</b>
<b>2.1 Reactivos y disolventes.....</b>	<b>97</b>
<b>2.2 Patrones y sustancias de referencia.....</b>	<b>97</b>
<b>2.3 Descripción de la muestra extraída de una obra de arte .....</b>	<b>98</b>
<b>2.4 Instrumentación.....</b>	<b>98</b>
<b>2.5 Tratamiento previo de muestras y patrones.....</b>	<b>99</b>
2.5.1 Tratamiento de las muestras de ceras naturales .....	99
2.5.2 Procedimiento de derivatización de los ácidos grasos .....	99
2.5.3 Análisis de hidrocarburos y ácidos grasos patrón.....	100

---

<b>3. Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización de aceites secantes en obras de arte mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector de absorción UV-Visible y Fluorescencia.....</b>	<b>101</b>
<b>3.1 Reactivos y disolventes.....</b>	<b>101</b>
<b>3.2 Patrones y sustancias de referencia.....</b>	<b>102</b>
<b>3.3 Descripción de muestras procedentes de obras de arte .....</b>	<b>102</b>
<b>3.4 Instrumentación.....</b>	<b>103</b>
<b>3.5 Tratamiento previo de muestras y patrones.....</b>	<b>103</b>
3.5.1 Hidrólisis de los aceites secantes.....	104
3.5.2 Formación de los derivados absorbentes de los ácidos grasos .....	104
3.5.3 Formación de los derivados fluorescentes de los ácidos grasos .....	104
<b>4. Desarrollo de una metodología de caracterización de aglutinantes proteicos y lipídicos mediante espectrometría de masas directa.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1 Reactivos y Disolventes.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2 Patrones y sustancias de referencia.....</b>	<b>105</b>
<b>4.3 Descripción de las muestras procedentes de obras de arte .....</b>	<b>106</b>
<b>4.4 Instrumentación.....</b>	<b>106</b>
<b>4.5 Tratamiento estadístico de los datos experimentales.....</b>	<b>107</b>
<b>4.6 Tratamiento previo de muestras y patrones.....</b>	<b>109</b>
4.6.1 Aglutinantes proteicos.....	109
4.6.2 Aglutinantes oleosos .....	109

<b>5. Caracterización de los constituyentes de barnices de violines y laúdes italianos de la época renacentista mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....</b>	<b>111</b>
<b>5.1 Reactivos y disolventes.....</b>	<b>111</b>
<b>5.2 Materiales de referencia .....</b>	<b>111</b>
<b>5.3 Descripción de los instrumentos de cuerda analizados.....</b>	<b>112</b>
<b>5.4 Instrumentación.....</b>	<b>114</b>
<b>5.5 Procedimiento experimental.....</b>	<b>114</b>
<b>5.6 Interpretación de los espectros de masas .....</b>	<b>115</b>
<b>6. Caracterización de resinas sintéticas utilizadas en obras de arte modernas mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con pirólisis previa .....</b>	<b>116</b>
<b>6.1 Patrones.....</b>	<b>116</b>
<b>6.2 Descripción de las muestras procedentes de obras de arte .....</b>	<b>116</b>
<b>6.3 Instrumentación.....</b>	<b>116</b>
<b>6.4 Procedimiento experimental.....</b>	<b>118</b>

---

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>1. Caracterización de proteínas empleadas como aglutinantes en obras de arte pictóricas mediante cromatografía líquida con detector de Fluorescencia.....</b>	<b>121</b>
<b>1.1 Optimización del procedimiento experimental.....</b>	<b>122</b>
1.1.1 Obtención de los aminoácidos a partir de la muestra.....	122
1.1.2 Optimización de la etapa de derivatización.....	123
1.1.3 Optimización de las condiciones cromatográficas.....	124
<b>1.2 Identificación de los aminoácidos y determinación de los parámetros analíticos del método .....</b>	<b>125</b>
1.2.1 Identificación de los aminoácidos .....	125
1.2.2 Determinación de los parámetros analíticos del método .....	126
<b>1.3 Estudio analítico de patrones de aglutinantes proteicos .....</b>	<b>127</b>
1.3.1 Análisis de las proteínas patrón.....	127
1.3.2 Caracterización de los aglutinantes proteicos .....	128
<b>1.4 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte.....</b>	<b>130</b>
1.4.1 Aplicación de la metodología a muestras reales.....	131
1.4.2 Caracterización de aglutinantes proteicos en muestras reales.....	132
<b>2. Caracterización de ceras naturales en obras pictóricas a partir de su contenido en ácidos grasos e hidrocarburos mediante cromatografía gaseosa.....</b>	<b>135</b>
<b>2.1 Separación cromatográfica de hidrocarburos y ácidos grasos ....</b>	<b>136</b>
2.1.1 Identificación de los alcanos lineales.....	136
2.1.2 Identificación de los ácidos grasos .....	136
<b>2.2 Estudio analítico de ceras naturales patrón.....</b>	<b>137</b>
2.2.1 Análisis de ceras naturales.....	137
2.2.2 Caracterización de ceras naturales.....	138
2.2.2.1 Ceras patrón no envejecidas .....	138
2.2.2.2 Ceras patrón envejecidas .....	139
2.2.2.3 Tratamiento quimiométrico de los datos .....	141
2.2.3 Diferenciación de las ceras naturales basada únicamente en la cantidad de hidrocarburos .....	142

---

<b>2.3 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte.....</b>	<b>143</b>
2.4.1 Aplicación de la metodología a muestras reales .....	143
2.4.2 Identificación de la cera natural presente en la muestra real.	144
<b>3. Caracterización de aceites secantes mediante cromatografía     líquida acoplada a un detector de absorción UV-Visible     y Fluorescencia.....</b>	<b>146</b>
<b>3.1 Optimización del procedimiento experimental.....</b>	<b>147</b>
3.1.1 Obtención de los ácidos grasos a partir de la muestra .....	147
3.1.2 Optimización de la etapa de derivatización.....	149
3.1.2.1 Reacción un agente cromógeno: 2-nitrofenilhidrazina.....	149
3.1.2.2 Reacción con un agente fluorógeno: 4-bromometil-7-metoxicumarina .....	153
3.1.3 Optimización de las condiciones cromatográficas .....	153
3.1.3.1 Separación cromatográfica de las hidrazidas .....	153
3.1.3.2 Resolución de los aductos cumarina-ácido graso...	155
<b>3.2 Identificación de los ácidos grasos y determinación de los     parámetros analíticos del método .....</b>	<b>156</b>
3.2.1 Identificación de los ácidos grasos .....	157
3.2.2 Parámetros analíticos de las metodologías propuestas.....	158
<b>3.3 Estudio analítico de los aceites secantes patrón.....</b>	<b>159</b>
3.3.1 Aplicación de los métodos analíticos propuestos a patrones de aceites secantes.....	159
3.3.2 Caracterización de los aceites secantes.....	161
<b>3.4 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte.....</b>	<b>164</b>
3.4.1 Aplicación de los métodos propuestos a una muestra de pintura al óleo.....	164
3.4.2 Caracterización de aglutinantes lipídicos en muestras procedentes de obras pictóricas al óleo.....	166
<b>4. Desarrollo de una metodología de caracterización de     aglutinantes proteicos y oleosos mediante espectrometría de     masas por infusión directa.....</b>	<b>168</b>
<b>4.1 Optimización del tratamiento de muestra.....</b>	<b>169</b>
4.1.1 Aglutinantes proteicos .....	169
4.1.2 Aglutinantes oleosos.....	170

---

<b>4.2 Identificación de los analitos</b> .....	170
4.2.1 Aminoácidos .....	170
4.2.2 Ácidos grasos .....	171
<b>4.3 Optimización de los parámetros instrumentales</b> .....	172
4.3.1 Detección de los aminoácidos .....	172
4.3.2 Detección de los ácidos grasos .....	175
<b>4.4 Estudio analítico de las muestras patrón</b> .....	176
4.4.1 Análisis de proteínas .....	176
4.4.2 Análisis de aceites secantes .....	177
<b>4.5 Caracterización de patrones de aglutinantes</b> .....	178
4.5.1 Diferenciación entre aglutinantes proteicos .....	178
4.5.2 Diferenciación entre aglutinantes oleosos .....	183
<b>4.6 Aplicación de la metodología propuesta a muestras procedentes de obras pictóricas</b> .....	188
4.6.1 Témperas y templems .....	188
4.6.2 Pinturas al óleo .....	188
<b>5. Caracterización de los constituyentes de barnices de violines y laúdes italianos de la época renacentista mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</b> .....	189
<b>5.1 Optimización del método de análisis de los materiales de referencia</b> .....	190
<b>5.2 Caracterización de los compuestos en esencias y resinas naturales patrón</b> .....	192
<b>5.3 Caracterización de los materiales en barnices de instrumentos musicales de cuerda de la época renacentista</b> .....	194
5.3.1 Aceites secantes .....	195
5.3.2 Resinas terpénicas .....	196
5.3.2.1 Muestra procedente del barniz de un laúd de Maler .	196
5.3.2.2 Muestra procedente del barniz de un violín de Stradivarius .....	198
5.3.2.3 Muestra procedente de la capa filmógena de la tiorba de Venere .....	198

<b>6. Caracterización de resinas sintéticas utilizadas en obras de arte modernas mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con pirólisis previa .....</b>	<b>205</b>
<b>6.1 Estudio de resinas sintéticas patrón.....</b>	<b>205</b>
6.1.1 Polímeros de vinilo .....	206
6.1.2 Polímeros de condensación.....	208
<b>6.2 Estudio de muestras procedentes de una obra pictórica moderna .....</b>	<b>209</b>
6.2.1 Área pigmentada de azul.....	211
6.2.1 Área pigmentada de negro .....	211
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>225</b>

---

**PARTE/PART B****FOR DOCTOR EUROPEUS MENTION****ANALYTICAL STUDY OF MATERIALS USED IN  
VARNISHES, BINDING AND CONSOLIDANTS IN  
ARTWORKS BY CHROMATOGRAPHIC AND  
SPECTROMETRIC METHODS****VII. SUMMARY**

<b>1. Introduction</b> .....	235
<b>2. Aims</b> .....	237
<b>3. Results and Discussion</b> .....	239
3.1 Characterization of proteins in pictorial artworks through their aminoacids relative amount by liquid chromatography with fluorescence detection .....	239
3.2. Characterization of waxes by means of their relative amount of linear alkanes and fatty acids in artworks by gas chromatograph.....	241
3.3 Characterization of drying oils by liquid chromatography coupled to UV-Visible and fluorescence detector .....	243
3.4 Characterization of protein and oil binding media by direct infusion mass spectrometry.....	245
3.5 Characterization of the compounds in varnishes of Italian string instruments by gas chromatography coupled to mass spectrometry.....	247
3.6 Characterization of synthetic resins in modern artworks by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry.....	248

**VIII. ANALYTICAL STUDY OF SYNTHETIC POLYMERS IN  
ARTWORKS**

<b>1. Experimental</b> .....	253
1.1 Standards.....	253
1.2 Description of the samples from artworks .....	253
1.3 Instrumentation .....	255
1.4 Experimental procedure.....	255

<b>2. Results and discussion</b> .....	256
2.1 Study of standard synthetic resins .....	256
2.1.1 Vinylpolymers .....	257
2.1.2 Condensation polymers.....	259
2.2 Studies of samples from a pictorial artwork.....	260
2.2.1 Blue pigmented sample .....	262
2.2.1 Black pigmented sample .....	262
<b>IX. CONCLUSIONS</b> .....	265
<b>X. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES</b> .....	273

***PARTE A.***  
***ESTUDIO ANALÍTICO DE MATERIALES***  
***EMPLEADOS EN BARNICES, AGLUTINANTES Y***  
***CONSOLIDANTES EN OBRAS DE ARTE***  
***MEDIANTE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS Y***  
***ESPECTROMÉTICOS***

# ***I. INTRODUCCIÓN***

La creación de obras de arte ha sido el vehículo principal del hombre para la expresión de sus sentimientos, emociones y estados de ánimo, tanto a nivel individual como en el entorno de una sociedad e incluso de una civilización. Así pues, el estudio del patrimonio artístico presenta un gran interés cultural e histórico, ya que permite aumentar el conocimiento sobre la evolución de las sociedades, a través del análisis de multitud de objetos. No obstante, estos objetos sufren degradaciones a lo largo del tiempo a causa de las agresiones de agentes externos y también a condiciones de conservación inadecuadas. Debido a ello, resulta imprescindible su correcta restauración para aumentar su duración, y permitir su estudio y exposición pública. La propuesta de tratamientos de restauración exige disponer de una información lo más completa posible acerca de los materiales que fueron utilizados en su elaboración.

Uno de los campos de aplicación de la Química Analítica, cada vez más extendido internacionalmente, es el estudio de obras de arte pertenecientes al Patrimonio Artístico. Las ciencias analíticas se emplean con el objetivo de caracterizar los materiales y las características físicas de las obras de arte con fines varios: determinar la técnica artística de ejecución del autor, su autenticación, atribución, localización geográfica e histórica, y datación, al poder hallar materiales de los que se conoce que son característicos de ciertos artistas, escuelas, épocas o zonas geográficas. Al mismo tiempo, se puede establecer la presencia de sustancias anacrónicas. El análisis químico de la obra de arte permite, de igual manera, realizar el estudio de las alteraciones y degradaciones, y la justificación de sus posibles causas y establecer probables mecanismos, ya hayan sido producidos mediante procesos naturales o por la propia acción humana. También resulta apropiado el análisis químico para distinguir alteraciones de posibles antiguas intervenciones destinadas, entre otros objetivos, a ocultar el deterioro real de la obra de arte. Todo esto será de gran ayuda en el momento de establecer las propuestas más idóneas para su posible intervención conservativa y en su caso de restauración.

El análisis de obras de arte presenta ciertas particularidades debido, principalmente, a la complejidad de los materiales involucrados, los cuales resultan de la mezcla de los inicialmente utilizados por el artista junto a los producidos por alteraciones de aquéllos. Todo este conjunto constituye la matriz característica de las muestras analíticas. Una obra de arte es un objeto propio de los fondos de los Bienes Culturales y suele formar parte de colecciones expuestas en museos o lugares públicos, por lo que cualquier modificación o degradación de los materiales pueden alterar sustancialmente su valor artístico. Por ello, la toma de muestra debe ser muy cuidadosa,

intentando tomar la mínima cantidad de muestra posible y de manera que no afecte sustancialmente a la obra de arte. Otra particularidad radica en la naturaleza de las muestras debido a su elevada heterogeneidad. En efecto, el artista emplea de forma desigual los materiales y dado que las obras de arte forman conjuntos sólidos no se produce ninguna homogeneización. Por otra parte, las capas más exteriores están más expuestas al medio ambiente, por lo que su evolución podrá ser diferente a la de las capas internas. Por ello, la porción de muestra se debe de tomar de forma que represente lo más fielmente posible al conjunto objeto de estudio, y el tratamiento de datos debe tener en cuenta cómo se efectuó el muestreo. En consecuencia, dado que las muestras son de mínimo tamaño y están constituidas generalmente por una gran cantidad de compuestos, su análisis requiere el uso de técnicas analíticas de gran sensibilidad y selectividad. Por ello, la técnica analítica empleada dependerá de la naturaleza de la muestra y de la información que se desea obtener.

## ***II. OBJETIVOS***

Los objetivos generales propuestos para la presente Tesis Doctoral están dirigidos hacia la puesta a punto de metodologías analíticas para la caracterización de una amplia colección de diversos materiales utilizados en obras de arte, concretamente proteínas, ceras naturales, aceites secantes, resinas terpénicas y polímeros sintéticos. Con el propósito de evaluar la validez de las metodologías propuestas, éstas se aplicaron al análisis de muestras procedentes de obras de arte pertenecientes al Patrimonio Artístico.

Teniendo en cuenta las consideraciones indicadas anteriormente, referentes a los objetivos generales de la presente Tesis, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Propuesta de caracterización de proteínas y aceites secantes utilizadas en obras de arte por cromatografía líquida (HPLC).
  - Optimización de la extracción y derivatización de los aminoácidos o ácidos grasos para aumentar la sensibilidad.
  - Establecimiento de las condiciones instrumentales adecuadas para la separación cromatográfica de los analitos.
  - Identificación de los aminoácidos o ácidos grasos patrón y determinación de los parámetros analíticos del método.
  - Caracterización de las proteínas y aceites secantes a partir de la proporción relativa de los analitos.
  - Aplicación del método a muestras procedentes de obras pictóricas.
  
- Estudio de las ceras naturales presentes en objetos de interés artístico y arqueológico por cromatografía de gases (GC/FID), mediante análisis de los alcanos lineales y etilderivados de los ácidos grasos.
  - Identificación de los hidrocarburos y ácidos grasos presentes en la composición de las ceras naturales.
  - Caracterización de las ceras a partir de la composición relativa de ácidos carboxílicos y de hidrocarburos.
  - Aplicación del método propuesto a muestras artísticas.
  
- Optimización de metodologías analíticas para la identificación de aglutinantes proteicos y oleosos sin etapas previas de derivatización o separación por espectrometría de masas directa.
  - Proponer un tratamiento rápido de hidrólisis de las muestras y extracción de los aminoácidos y ácidos grasos.
  - Optimización de las condiciones instrumentales del espectrómetro de masas para la identificación de los aminoácidos y ácidos grasos.
  - Diferenciación de los aglutinantes proteicos y oleosos a partir de la cantidad relativa de aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente, a través

de un tratamiento quimiométrico de los datos obtenidos mediante Análisis Discriminante Lineal.

- Aplicación de la metodología a muestras procedentes de obras de arte.
  
- Estudio analítico de la fracción orgánica de barnices de instrumentos musicales de cuerda por GC/MS.
  - Optimización del método de derivatización y de las condiciones instrumentales del GC/MS, para la identificación de las sustancias presentes en los materiales patrón.
  - Caracterización de las moléculas incluidas en los materiales patrón en las muestras reales.
  - Aplicación del método propuesto en barnices de instrumentos de cuerda antiguos, incluyendo un ejemplar de Stradivarius.
  
- Estudio analítico de resinas poliméricas presentes en obras pictóricas modernas mediante pirólisis-GC/MS.
  - Identificación de los fragmentos obtenidos a través del análisis de los patrones de polímeros sintéticos.
  - Identificación de los compuestos detectados en muestras procedentes de una pintura moderna.
  - Aplicación del método a muestras procedentes de obras pictóricas.

### ***III. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL***

## **1. Materiales orgánicos empleados como aglutinantes, consolidantes, cubrientes y barnices en obras de arte**

Los materiales aglutinantes, consolidantes, cubrientes y barnices ejercen una marcada influencia sobre la calidad artística de las obras de arte.

Los aglutinantes se utilizan en primer lugar como medio para disolver los pigmentos, lo que permite su aplicación sobre la superficie objeto de decoración. El propio aglutinante permite asimismo que la capa pictórica se mantenga adherida a la superficie del soporte, y a la vez mantiene cohesionadas las partículas del pigmento. Asimismo pueden modificar la coloración del pigmento, mediante atenuación o intensificación. Estos materiales también tienen propiedades consolidantes, ya que aumentan la rigidez y la consistencia de la capa pictórica, así como cualidades cubrientes debido a que forman una película protectora sobre los pigmentos [1-4].

Algunos instrumentos musicales están considerados como obras de arte, como los violines y laúdes elaborados por los conocidos *luthiers* (fabricante de instrumentos de cuerda) cremonenses como Antonio Stradivarius. Estos objetos están fabricados de madera, mientras que su superficie externa está recubierta por una película de barnices constituidos por materiales filmógenos. Su función principal consiste en aislar el objeto del exterior, para evitar que los agentes agresores del medioambiente causen el deterioro de los materiales de la obra de arte. Asimismo se utilizan para modificar la apariencia estética del instrumento musical, mediante ensalzamiento del brillo y saturación de los colores. Algunos expertos afirman incluso que la capa filmógena participa en las propiedades acústicas de los violines [5].

Debido a lo referido con anterioridad, el conocimiento de las características de los materiales y de las posibles causas de su deterioro es de gran importancia para artistas y restauradores.

### **1.1 Descripción general de los materiales empleados en obras de arte**

#### **1.1.1 Características generales**

Los aglutinantes ejercen una influencia significativa sobre la apariencia visual de la obra de arte hasta el punto que su elección por parte del artista determina una u otra técnica pictórica, y más adelante se utilizará por parte del restaurador/conservador como indicadores de las diferentes épocas artísticas.

Hasta la edad moderna, los aglutinantes se obtuvieron a partir de productos naturales, debido a su accesibilidad y abundancia. Las primeras sustancias empleadas como aglutinantes fueron materiales de tipo

hidrofilico, extraídos a partir de proteínas de diverso origen. El uso de aglutinantes proteicos da lugar a las técnicas de témpera y temple, utilizadas desde la Edad Antigua. Las proteínas exigen ser disueltas previamente en agua, donde posteriormente se añadirán los pigmentos. Durante el secado, el agua se retira, sin cambios químicos en el soporte [1].

Más adelante aparece otra técnica, denominada encáustica, que emplea aglutinantes con propiedades hidrofóbicas como las ceras naturales. En este caso el aglutinante se vuelve fluido mediante calentamiento o tratamiento químico de la cera, tras lo cual se añadían los pigmentos [2].

A partir del siglo XVI se desarrolla la pintura al óleo, una nueva técnica artística basada en el uso de aceites secantes de origen vegetal, cuyos mayores exponentes fueron los hermanos Van Eyck. No obstante, el uso de aceites secantes en obras pictóricas, generalmente combinadas con huevo (temple mixto o graso), se conocía desde el siglo XII [3]. La principal diferencia de la pintura al óleo respecto a la témpera, el temple y la encáustica son las propiedades secantes de los materiales empleados. Los aceites secantes son líquidos a temperatura ambiente, y pueden utilizarse directamente para ser mezclados con los pigmentos. Una vez se aplican sobre el soporte, empieza el proceso químico de secado, que hace que el aceite forme una capa rígida. El aceite secante ejerce asimismo de medio consolidante y cubriente, manteniendo la cohesión y formando una película protectora sobre los pigmentos [4].

Los primeros materiales empleados para la elaboración de barnices fueron resinas que se obtenían a partir de especies naturales, especialmente de vegetales. Las resinas están compuestas principalmente por mono- y sesquiterpenos (líquidos), así como di- y triterpenos (sólidos disueltos en los anteriores), y, en escasa proporción, los correspondientes derivados oxidados. Estas sustancias se disuelven en un líquido adecuado (normalmente etanol, esencias o aceites secantes), y se aplican sobre la superficie de la obra de arte. De ese modo, se forma una película que protege las capas inferiores del deterioro, aunque ella misma puede ser atacada por los agentes medioambientales, produciendo alteraciones en sus parámetros físicos y químicos que modifican el valor est tico de la obra de arte. Durante el proceso de degradación se produce un aumento de la cantidad de productos de oxidación. Al contrario que en las obras pictóricas, el barniz depositado sobre la superficie de los violines forma parte del propio objeto y no se suele retirar y sustituir en los procesos de intervención [5].

En la actualidad, el uso de las resinas s nticas está muy extendido en el campo del arte. Estos materiales poliméricos poseen gran versatilidad y estabilidad química, por lo que se emplean como aglutinantes, consolidantes, cubrientes y barnices. Las resinas poliméricas fueron sintetizadas por primera vez durante la Revolución Industrial, siendo incorporadas a las obras de arte, por lo que se encuentran únicamente en muestras procedentes de

obras pictóricas elaboradas o restauradas a partir del siglo XIX [6].

### 1.1.2 Factores causantes del deterioro

Los materiales que componen las obras de arte están sometidos a alteraciones a lo largo del tiempo, lo que causa la variación de sus características y propiedades. Estas alteraciones químicas provocan cambios significativos en la composición, naturaleza, propiedades y estructura general de las propias obras de arte, afectando a su valor artístico. Las causas del deterioro tienen su origen tanto en la naturaleza de las sustancias que forman parte de la obra artística, como en la influencia de agentes externos y condiciones medioambientales [7].

Los componentes de los barnices, aglutinantes, pigmentos, así como otros aditivos como plastificantes, blanqueadores, abrillantadores, agentes secantes, etc, sufren procesos de deterioro y envejecimiento desde su aplicación sobre la obra de arte. En ocasiones también pueden interactuar entre sí y acelerar la degradación de los materiales presentes [8].

Los procesos de degradación pueden ser provocados o catalizados por agentes procedentes del exterior de la obra pictórica. La humedad ambiental es una de las principales causas de deterioro de las obras de arte. La mayor parte de los materiales empleados son de naturaleza higroscópica y se verán modificados en función del grado de agua presente en la atmósfera, además incluyen en su estructura grupos reactivos susceptibles de experimentar hidrólisis. Por otro lado, la propia estructura de la obra de arte tiene tendencia a reequilibrar la cantidad de agua a su alrededor, expulsando el agua que contiene cuando el grado de humedad es reducido, e introduciendo agua al interior en el caso contrario. Estos procesos causan dilataciones y contracciones de la estructura de la obra pictórica, afectando a largo plazo a la cohesión y adhesividad de las capas pictóricas, aumentando la tensión estructural y posibilitando la formación de deformaciones, grietas y desprendimientos de la capa pictórica [8].

La temperatura también es un factor que puede afectar al envejecimiento de los materiales, debido principalmente a que el calor provoca un aumento de velocidad de las reacciones de degradación. Los cambios bruscos de temperatura causan dilatación y contracción de los materiales, pudiendo alterar la distribución de las capas pictóricas, de forma análoga a la realizada por los cambios de humedad [8]. Los materiales empleados en la elaboración de objetos artísticos pueden verse afectados por la radiación, principalmente procedente de la luz solar. En estos casos, la energía recibida permite alcanzar la energía de activación de numerosos procesos químicos, lo que acelera las reacciones químicas y las rupturas de enlaces. La radiación permite la formación de radicales, producidos a partir de la ruptura homolítica de enlaces (principalmente carbono-hidrógeno y

carbono-oxígeno, conjugados a dobles enlaces). Estas entidades químicas son enormemente reactivas, e inician rápidamente mecanismos de deterioro de los materiales, provocando rupturas, reorganizaciones y la formación de oligómeros y polímeros, que pueden hacer variar de forma drástica las propiedades de los materiales [9-11].

En la atmósfera existen gran cantidad de sustancias, principalmente contaminantes ambientales, que pueden resultar dañinas para la obra de arte. Los compuestos ácidos, junto a la humedad ambiental, favorecen la ruptura de enlaces hidrolizables, como éster y peptídicos, aumentando la acidez de los materiales [12].

Por otro lado, el oxígeno como birradical puede participar en la iniciación y propagación de reacciones radicalarias, habitualmente mediante el ataque a enlaces múltiples. Los agentes oxidantes presentes en la atmósfera, principalmente el propio oxígeno y el ozono, interaccionan con los materiales de las capas pictóricas, provocando su oxidación [7].

Numerosos agentes biológicos, como bacterias, hongos y algas, son transportados por partículas en suspensión a través de la atmósfera y pueden ser depositados sobre la obra de arte. Los microorganismos crean colonias sobre su superficie, proceso influenciado en gran medida por las condiciones medioambientales. En efecto, la presencia de luz favorece el desarrollo de los agentes biológicos autótrofos que realizan la fotosíntesis, como las algas, mientras que entorpece el crecimiento de los hongos. En general, una humedad ambiental elevada favorecerá el desarrollo de la mayoría de microorganismos. Las modificaciones de la composición química de la capa externa se producen generalmente debido a que estos organismos pueden utilizar los materiales sobre los que se asientan como fuente de alimentos (especialmente si se trata de azúcares y proteínas), o bien para verter los productos resultado de su metabolismo. Todo ello puede causar la modificación del valor estético de la obra de arte [11,13].

La capa superficial es la más expuesta a este tipo de procesos, debido a que está directamente en contacto con el exterior. Sin embargo, en ocasiones el agua en forma de humedad puede condensarse sobre la superficie de la obra pictórica y filtrarse a través de su estructura por capilaridad. Así pues, puede actuar como vehículo de transporte de contaminantes ambientales y microorganismos, reproduciendo las condiciones de degradación en las capas interiores [11].

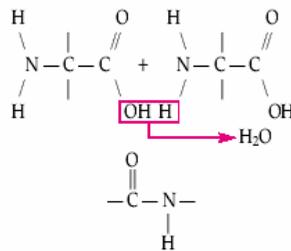
## **1.2 Proteínas**

### **1.2.1 Generalidades**

Las proteínas son compuestos orgánicos ampliamente presentes en la naturaleza. Tienen una gran importancia para los seres vivos, ya que

están involucradas en multitud de mecanismos bioquímicos que controlan funciones indispensables en los organismos. Es de resaltar su influencia tanto en procesos relacionados con su funcionamiento, como enzimas, hemoglobina, anticuerpos, hormonas, etc., como en el mantenimiento de su estructura anatómica, al estar presentes en el colágeno, los músculos, tendones, piel, uñas, plumas, etc.

Las proteínas están formadas por macromoléculas cuyas unidades básicas son los aminoácidos, los cuales se unen a través de enlaces peptídicos. La estructura general de los aminoácidos consiste en un carbono asimétrico, denominado carbono  $\alpha$ , unido a un grupo carboxilo, una amina, un hidrógeno y un grupo más o menos complejo R, que es característico de cada uno de los aminoácidos. El enlace peptídico se considera un enlace amida formado por la condensación entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo amina del siguiente. Este tipo de enlace es relativamente fuerte, por lo que su ruptura exige condiciones ácidas o básicas extremas, o el uso de enzimas específicos [14].



Se denominan polipéptidos a las moléculas compuestas por un número limitado de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Una proteína se define como un polipéptido de elevado peso molecular [14].

Por lo común, en la naturaleza sólo se encuentran veinte clases diferentes de aminoácidos en las proteínas de plantas y animales, los cuales presentan la misma configuración quiral, conociéndose únicamente L-aminoácidos. Dado que los aminoácidos se diferencian únicamente por el grupo característico R, su estructura se considera el parámetro que causa las diferencias de propiedades fisico-químicas. Así pues, los aminoácidos se subdividen en [15]:

- Hidrofóbicos, en los que el grupo R es una cadena hidrocarbonada, como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, prolina y triptófano.
- Hidrofílicos ácidos: la cadena lateral contiene un grupo carboxilato, en esta categoría están el ácido glutámico y el ácido aspártico.
- Hidrofílicos básicos: la cadena R tiene un grupo amino, como histidina,

lisina y arginina.

- Hidrofílicos neutros: la cadena característica contiene un grupo polar, entre los que se encuentran la serina, treonina, tirosina, cisteína, hidroxiprolina, glutamina y asparaguina.

Además de estos veinte aminoácidos, en la naturaleza se han identificado algunos otros formando parte de las proteínas. Se trata de derivados de los aminoácidos principales, como la 4-hidroxiprolina, que abunda en el colágeno, y la cistina, constituida por dos moléculas de cisteína unidas por un enlace covalente azufre-azufre, que tiene gran importancia en la estructura terciaria adoptada por las proteínas [16].

Los aminoácidos presentan un comportamiento anfótero, debido a que incluyen en su estructura grupos con diferentes comportamientos frente a los protones (carboxilato, amina, tiol, fenol, imidazol, etc). Así pues, el grado de protonación de cada aminoácido dependerá de su naturaleza y del pH del medio. En las disoluciones fuertemente ácidas, los aminoácidos se encontrarán totalmente protonados, mientras que en medio básico presentarán carga neta negativa. A cierto pH intermedio se encuentra el punto isoeléctrico, donde la concentración de cationes y de aniones se iguala, por lo que la carga neta es de cero. En este punto la solubilidad del aminoácido es mínima. El punto isoeléctrico depende de la naturaleza de cada aminoácido y se calcula de forma general como la media de los  $pK_a$  de los grupos incluidos en su estructura [15,16].

Los aminoácidos reúnen la reactividad de los grupos carboxilato (esterificación, amidación, reducción, etc...) y las de los grupos amino (amidación, alquilación, acilación, condensación con aldehidos y cetonas, etc). Además, los aminoácidos con funcionalidades en la cadena lateral presentan también las propiedades de sus grupos característicos: oxidación del tiol y amina (cisteína y lisina), polimerización del fenol (tirosina), reacciones propias de los alcoholes (serina y treonina), hidrólisis (glutamina y asparaguina), etc [15,16].

Es importante resaltar que las propiedades fisico-químicas, así como la estructura terciaria de cada proteína, y por ende su funcionalidad en el organismo, dependen tanto de la composición relativa de aminoácidos como de su orden en la cadena peptídica [16].

### 1.2.2 Aplicación de proteínas en obras pictóricas

Las proteínas han sido ampliamente utilizadas desde la más remota antigüedad en la decoración, especialmente como aglutinantes y consolidantes en las obras de arte policromadas. Entre las razones más importantes que explican su uso están su fácil disponibilidad debido a su origen y aplicabilidad doméstica y por otra parte sus propiedades como cubriente y consolidante.

La función de la proteína consiste básicamente en dar soporte y cohesionar los pigmentos, por lo que influye directamente en las propiedades artísticas de la obra pictórica. La selección del tipo de aglutinante proteico empleado depende de factores diversos, tales como el tipo de pigmento utilizado, la localización y la época de ejecución de la obra.

Como ya se ha anticipado, el uso de aglutinantes proteicos da lugar a una técnica artística propia denominada témpera (cuando se utiliza proteína de huevo) o temple (gelatinas animales), uno de los procedimientos más antiguos que se conoce para la decoración de objetos artísticos. Se ha atestiguado su uso en obras de arte policromadas procedentes del Antiguo Egipto, Babilonia y Grecia. Durante el Medioevo se empleó en vidrios y esculturas policromadas, así como en pinturas murales y para realización de pinturas sobre tablas. La aplicación de aglutinantes proteicos fue perfeccionada por los iconoclastas en el Imperio Bizantino (desde 400 a 1453), y posteriormente se extendió hasta Italia al inicio del Renacimiento. Durante el siglo XVI el óleo hace su aparición, sustituyendo a la témpera como técnica pictórica principal. Sin embargo, el uso de la témpera aumenta a principios del siglo XX, debido a su aplicación por parte de ciertos pintores modernos.

En las técnicas de témpera y temple, la pintura se prepara mezclando en agua el pigmento finamente pulverizado y el aglutinante proteico. Esta mezcla se deposita rápidamente, por medio de varias pinceladas, sobre la superficie que se desee decorar. El secado se produce con rapidez, formándose una capa transparente o semi-opaca, dura y quebradiza, que permanece durante largo tiempo sin mostrar cambio de color. Los pigmentos quedan encerrados en la capa pictórica así formada, viendo realizada su coloración y aumentando su brillo, claridad y pureza.

La pintura mediante témpera y temple presenta diversas ventajas, como la baja toxicidad de sus ingredientes y la posibilidad del empleo de un amplio abanico de pigmentos posibles. Sin embargo, su proceso de secado es rápido, por lo que es difícil corregir la obra pictóricas.

### 1.2.3 Características químicas

Los aglutinantes más habituales en las obras pictóricas realizadas mediante la técnica de témpera están constituidos por material proteico extraído a partir de leche y clara de huevo, mientras que para el temple provienen de colas de colágenos procedentes de animales.

Las colas animales o gelatinas son proteínas fibrilares o escleroproteínas. Su componente principal es el colágeno, una hidroxiprote na fibrosa insoluble en agua, que forma dispersiones coloidales acuosas y se transforma en gelatina durante el proceso de fabricación de las colas. Se extrae de la piel, los huesos, los tendones y los cartílagos de

diversos animales. Contiene elevadas proporciones de glicina, prolina e hidroxiprolina. Su estructura forma tres cadenas enrolladas en forma helicoidal, mantenidas por puentes de hidrógeno, que desaparecen al transformarse en gelatina, compuesta únicamente por una cadena lineal. También contienen otras proteínas y glicerina. Asimismo, su aspecto, su composición química y sus propiedades físicas dependen del origen y del tipo de tratamientos a los que han sido sometidas durante las fases de preparación y purificación. Las menos puras suelen llamarse colas fuertes, mientras que las más puras toman el nombre de gelatinas, y están compuestas casi exclusivamente de colágeno. En el caso de la decoración de obras pictóricas, las más habituales son las gelatinas procedentes de colágeno porcino y bovino.

La albúmina es la principal proteína que se encuentra en la clara de huevo formando una disolución acuosa coloidal. Pertenece a una clase de proteínas que tienen la propiedad de coagularse con el calor. Se obtiene el mismo efecto cuando está diluida y extendida en una capa fina, y exponerse a la luz. La clara de huevo es el material proteico más extendido en la técnica artística de ténpera.

La caseína es una fosfoproteína contenida en la leche de los mamíferos en forma de una sal cálcica en dispersión coloidal. Es posible extraerla desnatando la leche, calentándola a 35 °C y provocando la floculación de la proteína en medio ácido a pH 4,8. Posteriormente, la sustancia obtenida se lava con el mismo ácido y se deja secar. Actualmente, la floculación de la leche desnatada se obtiene por medio de distintas sales, como el sulfato de amonio y otros. La caseína que se elabora con este procedimiento no es soluble en agua, y para que pueda ser empleada debe transformarse en otra sustancia soluble llamada caseinato. La transformación se logra haciendo reaccionar la caseína con álcalis, reacción que resulta posible porque los ácidos carboxílicos libres de la caseína son preponderantes con respecto a los grupos aminos básicos. Dos de las propiedades fundamentales de la caseína son su rapidez de secado y la formación de una característica película mate. Desde siglo XIX, se ha utilizado para la preparación de los lienzos y en las intervenciones de reentelado de las pinturas

#### 1.2.4 Alteración química a lo largo del tiempo

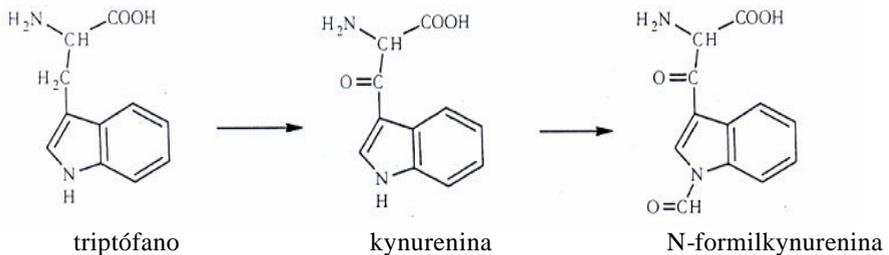
El proceso de secado en las capas pictóricas formadas aglutinantes proteicos se produce a través de la evaporación del disolvente. Al retirarse las moléculas de agua, las cadenas proteicas se extienden intentando rellenar los huecos producidos, causando el debilitamiento de las interacciones establecidas entre los aminoácidos y alterando la estructura terciaria de las proteínas. La reorganización posterior implica que los grupos orientados hacia el interior de la estructura pasen al exterior, aumentando la reactividad

de la proteína [17].

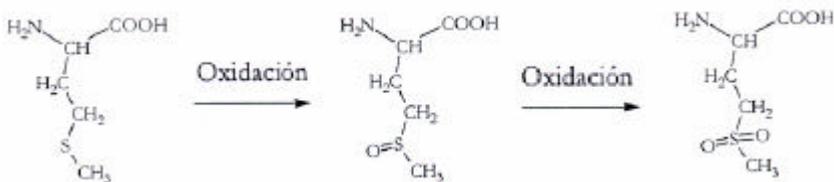
Las proteínas son materiales relativamente estables frente al envejecimiento y a la oxidación, por lo que en condiciones ambientales normales su composición química experimenta pocos cambios. Sin embargo, la humedad, unida a la presencia en la atmósfera de compuestos ácidos, puede causar una hidrólisis lenta de los enlaces peptídicos, reduciendo la masa molecular del biopolímero. Por otro lado, la propia humedad favorece el crecimiento de microorganismos y bacterias. Estos agentes biológicos segregan enzimas protolíticos que catalizan la descomposición de la proteína, y digieren los aminoácidos liberados. Las proteínas también se verán afectadas por elevadas temperaturas, provocando la modificación de su estructura, e incluso su desnaturalización.

La luz solar afecta a los aglutinantes proteicos a través de procesos catalizados por los pigmentos y colorantes, que cumplen la función de fotoiniciadores. Estas sustancias inician la formación de radicales libres, a través de la escisión de moléculas de agua, e hidroxiperóxidos al incidir sobre ellos radiación con la energía adecuada, que a su vez provocan la iniciación y propagación de reacciones radicalarias de oxidación [17]. Los pigmentos y colorantes se encuentran dispersos por toda la capa pictórica, por lo que se forman numerosos puntos de iniciación por la superficie de la obra pictórica. Los aminoácidos más afectados por los procesos de fotooxidación son los siguientes:

a) **Triptófano:** la cadena lateral del triptófano se oxida, mediante la formación de un grupo oxo, dando lugar a la kynurenina. Esta sustancia se modifica por adición de un grupo formil sobre el nitrógeno del pirano, produciendo N-formilkynurenina.



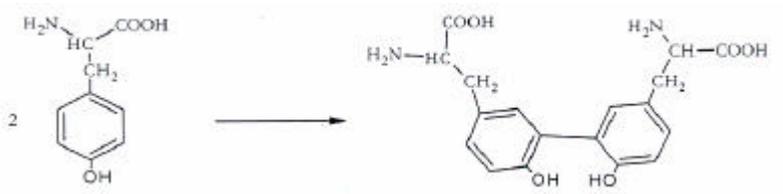
b) **Metionina:** la modificación se produce sobre el sulfuro de la cadena lateral, el cual pasa a sulfóxido y más tarde a sulfona.



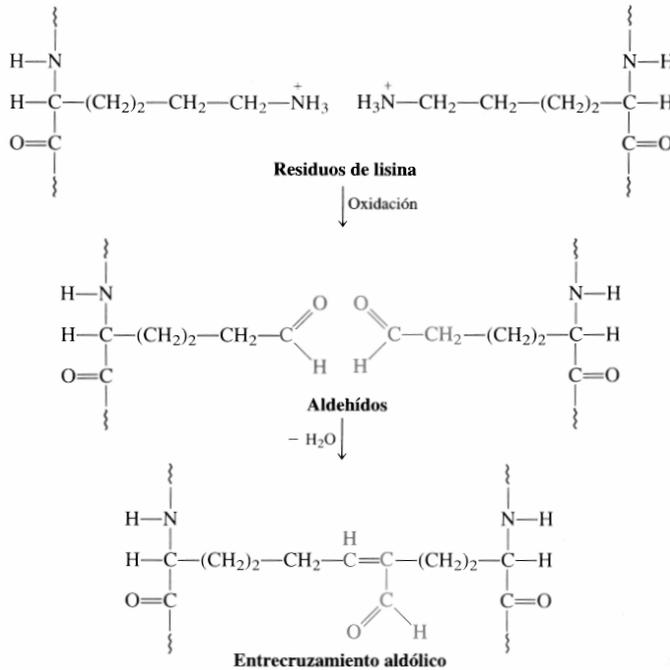
c) Cisteína: la fotooxidación favorece la formación de puentes disulfuro a través de la reacción entre los grupos tiol de la cadena lateral, dando lugar al dímero cistina. El establecimiento de este entrecruzamiento ayuda a mantener la estructura terciaria de la proteína [15].



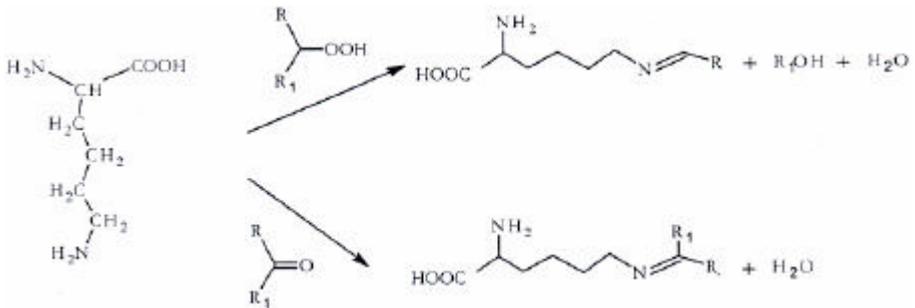
d) Tirosina: en este caso durante el envejecimiento se producen enlaces a través de reacciones de polimerización de los grupos fenol de la cadena lateral.



e) Lisina: los grupos amino presentes en las cadenas laterales pueden experimentar una serie de oxidaciones que conducen a la formación de un grupo aldehído. En este caso dos residuos de lisina cercanos reaccionarán entre ellos mediante una condensación aldólica dando lugar a un dímero. La formación de este entrecruzamiento aporta rigidez a la proteína [15].



Estos procesos de degradación están catalizados en presencia de aceites secantes, incluso en ausencia de radiación incidente. Así pues, el propio proceso de oxidación de los aceites secantes produce radicales alquilo ( $R\cdot$ ), alcóxido ( $RO\cdot$ ) y peróxido ( $ROO\cdot$ ), que iniciarán los mecanismos de oxidación radicalarios de los aminoácidos. En especial, la condensación entre los hidroperóxidos y carbonilos, con el grupo amino de la cadena lateral de la lisina da lugar a la formación de iminas, que son responsables del oscurecimiento paulatino de la superficie de algunas obras de arte que contienen tanto material proteico como lipídico [18]. Por otro lado, se puede producir la degradación de los compuestos de capa pictórica mediante la condensación de los aminoácidos con grupos carbonilo de oligosacáridos, que produce polímeros de color parduzco con grupos carboxílicos y fenólicos libres [19].



Algunos tratamientos de limpieza pueden participar en el deterioro de la obra de arte. En ocasiones se aplican sobre la superficie productos ácidos o básicos, llevando el pH del medio a valores extremos, lo que puede favorecer la ruptura de los enlaces peptídicos, así como la alteración de las interacciones iónicas entre los diferentes aminoácidos, y causando la modificación de la estructura terciaria. Asimismo es importante tener en cuenta el disolvente empleado en el proceso de restauración. En el caso del uso de alcoholes de bajo peso molecular, éstos pueden introducirse en los resquicios intersticiales de la proteína, alterando las interacciones por puentes de hidrógeno e iónicas entre las cadenas de aminoácidos, lo que modifica su disposición espacial y debilita la estructura terciaria de la proteína. En algunos casos, son los propios reactivos utilizados en la restauración los que resultan dañinos para la obra artística [17].

De forma general, el envejecimiento provoca en las proteínas cambios en la proporción relativa de los aminoácidos, así como una modificación de la estructura y una disminución de la solubilidad [17].

Por otro lado, algunos aminoácidos con menor estabilidad termodinámica experimentan modificaciones del entorno del centro quiral y

descomposición a lo largo del tiempo. Los ejemplos más estudiados son la modificación de la arginina, que da lugar a ornitina y citrulina, la descarboxilación del ácido aspártico forma  $\alpha$ -alanina así como las epimerizaciones de la isoleucina para dar lugar a aloisoleucina y del ácido L-aspártico que produce D-aspártico [20].

Estos procesos permiten establecer una aproximación acerca de la antigüedad de muestras que contengan proteínas fosilizadas, a partir de la relación entre el aminoácido precursor y el producto. Así pues, la epimerización del ácido L-aspártico se utiliza para datar muestras de mil a cien mil años, mientras que la modificación de la leucina permite la datación de muestras mucho más antiguas, hasta el periodo del Mioceno (26 millones de años) [7].

### 1.3 Ceras naturales

#### 1.3.1 Descripción

Las ceras son compuestos naturales obtenidos a partir de sustancias excretadas a través de las capas superficiales de los organismos vivos. Estos materiales están compuestos principalmente por mezclas de sustancias orgánicas de elevado peso molecular. Contienen triésteres, diésteres y monoésteres de ácidos grasos de cadena media y alcoholes de alto peso molecular (mono-, di- o trialcoholes), hidrocarburos pesados, alcoholes libres, ácidos grasos libres, aldehidos, cetonas,  $\beta$ -dicetonas, y en menor medida flavonoides, esteroides, triterpenoides y ácidos terpénicos [7,21]. Existen numerosas clases de ceras, que se clasifican en función de su procedencia, ya sea animal, vegetal o mineral [7,22]. De forma general, se considera como “cera” a un material cuya composición química se asemeja a la de la cera de abeja.

##### 1.3.1.1 Descripción de las ceras de origen animal

En los animales la producción de ceras está asociada a las glándulas sebáceas de la piel. Su función principal es impedir el movimiento del agua por la cutícula y evitar la deshidratación. Su composición química depende de la especie y de la edad del animal.

La cera de abeja es excretada a través del abdomen del insecto y se obtiene como subproducto en la fabricación de miel. Contiene principalmente ésteres, formados por alcoholes de elevado peso molecular y ácidos grasos, e hidrocarburos [23]. Se trata de un producto comercial cuyo uso se encuentra muy extendido hasta el día de hoy.

La cera de lana (lanolina) es un producto graso producido por las

ovejas, y se obtiene a partir del refinado y limpieza de la lana. Esta cera está compuesta principalmente de ésteres cerosos (principalmente de 1 y 2- alcoholes) en un 50 % y de ésteres de esteroides en un 33%.

Numerosos animales marinos producen ceras, las cuales se acumulan en diversos tejidos del organismo, como en el hígado y los músculos. Poseen diversas funciones, como fuente de energía, aislamiento del medio exterior, control del nivel de flotación y para la determinación de la posición por sonar. Estas ceras están compuestas por hidrocarburos, principalmente escualenos y otros hidrocarburos terpénicos, y ésteres formados por monoalcoholes y ácidos grasos, de los cuales el mayoritario es el ácido oleico.

Algunas especies de pájaros segregan material ceroso a través de las glándulas uropigiales, cuya función principal consiste en recubrir las plumas y evitar que se éstas se mojen con agua. Están compuestas por ésteres de alcoholes de 16 a 18 átomos de carbono y ácidos grasos largos y ramificados.

Diversos tipos de microorganismos como las micobacterias producen ceras, a pesar de ser algo inusual en los procariontes. Estos productos contienen principalmente ésteres micoseroides, los cuales son agentes patógenos con elevada toxicidad. Los ésteres contienen fitocerol, un alcohol polirramificado con 34 o 36 átomos de carbono y grupos hidroxilo en las posiciones 9 y 11 o 11 y 13, unidos a ácidos grasos de cuya cadena carbonada contiene de 18 a 26 átomos, con sustituyentes metilo en las posiciones 2; 4; 6 y 8 [24].

#### 1.3.1.2 Características de las ceras de origen vegetal

Los vegetales producen ceras con el objetivo de recubrir sus hojas. Esta protección está formada por micropartículas semicristalinas, que se sitúan en la interfase entre la planta y la atmósfera. Esta capa protege a la planta del medio ambiente y proporciona una adecuada defensa contra los insectos. Asimismo, tiene por misión dificultar la evaporación del agua y de sus solutos, con lo que se controla la pérdida de volátiles. La composición química de las ceras presenta gran variabilidad y depende de la especie vegetal y del lugar de deposición (flor, hoja, fruto). Los contenidos de ceras procedentes de diversas especies vegetales se incluyen en la Tabla 1 [24].

La cera de carnauba se obtiene a partir de las hojas de la palmera carnauba, *Copernicia cerifera*, originaria de Brasil. Este material ceroso recubre las hojas en forma de capa, formando una película brillante. Esta cera está compuesta principalmente por ésteres de ácidos grasos, así como de ácidos grasos libres, alcoholes, hidrocarburos y resinas.

**Tabla 1.** Proporción relativa de los constituyentes de las ceras producidas por ciertas plantas.

Clase de sustancia	hoja de uva	hoja de rape	manzana	flor de rosa	hoja de guisante	caña de azúcar
hidrocarburos	2	33	20	58	40-50	2-8
ésteres	6	16	18	11	5-10	6
alcoholes primarios	60	12	6	4	20	5-25
alcoholes secundarios	-	8	20	9	7	-
ácidos libres	8	8	20	5	6	3-8
aldehidos	6	3	2	-	5	50
cetonas	-	20	3	-	-	-

Por su parte, la planta de jojoba (*Simmondsia chinensis*) que crece en las regiones semiáridas de Estados Unidos y México, produce una cera significativamente inerte frente a la oxidación que se almacena en la semilla. Está constituida por ésteres de monoalcoholes de 22; 24 y 26 átomos de carbono, con una proporción relativa de 22%; 21% y 4%, respectivamente, acoplados principalmente a ácido oleico (6%), 11-eicosenoico (35%) y erúico (7%) [24].

### 1.3.1.3 Mecanismos de biosíntesis de ceras naturales

De forma general, la biosíntesis de los materiales constituyentes de las ceras se produce en las células epiteliales e implica varias etapas en las cuales participan numerosos enzimas e intermedios. En primer lugar, los ácidos palmítico y esteárico son sintetizados por enzimas solubles que forman el complejo ácido graso-sintasa. Posteriormente se produce el alargamiento de la cadena carbonada de dos átomos de carbono, catalizado por un complejo multienzimático anclado en las membranas, llamado ácido graso-elongasa.

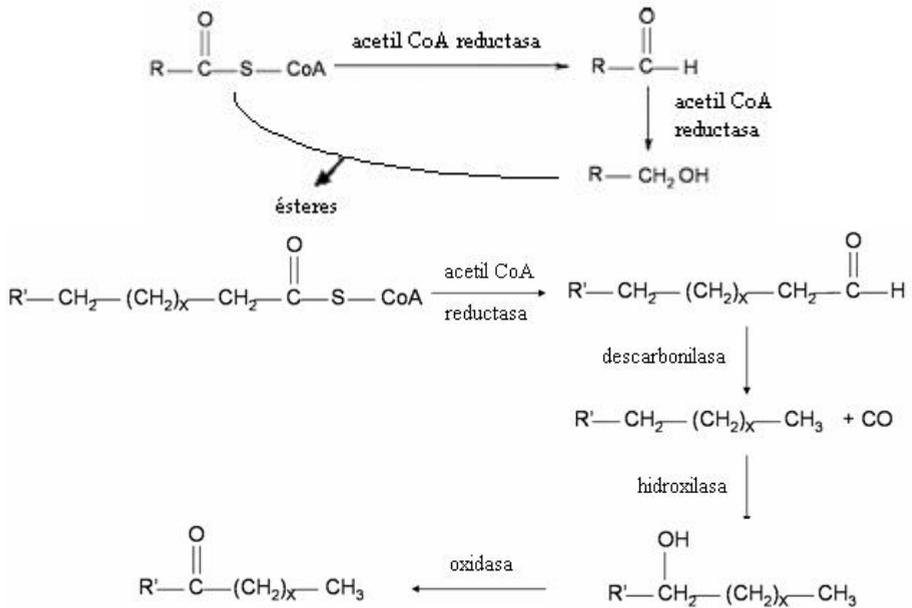
El sustrato se encuentra en forma de ácido graso esterificado con el enzima acetilcolina (CoA), el cual se condensa con malonil-CoA, seguida de una reducción  $\alpha$ -cetónica. A continuación se produce una deshidratación y una reducción enólica. Así pues, los constituyentes de las ceras se obtienen a partir de los ésteres ácido graso-CoA por medio de dos rutas catalíticas.

En la primera vía, los sustratos se reducen con acetil CoA reductasa al aldehido correspondiente, que a su vez se reduce a alcohol primario con el mismo enzima. El producto formado reacciona vía acetil CoA alcohol transacetilasa con un ácido graso para formar un éster (Figura 1).

La segunda ruta sintética consiste igualmente en la reducción del sustrato ácido graso-CoA a aldehido, el cual se reduce a su vez a través de una reacción catalizada por el enzima decarbonilasa, dando lugar a un alcano. Éste se modifica posteriormente mediante la adición de un grupo hidroxilo en cualquiera de sus posiciones, a través de un proceso catalizado

por hidroxilasas. El alcohol obtenido puede esterificarse mediante el proceso indicado en la primera vía sintética, o dar lugar a una cetona mediante una etapa catalizada por un enzima oxidasa (Figura 1). Finalmente, otra serie de reacciones análogas permiten obtener dicetonas y dialcoholes.

Así pues, estas rutas biosintéticas permiten asegurar la producción de los constituyentes de las ceras por parte de los seres vivos, a partir de los ácidos grasos contenidos en sus reservas de material lipídico [25].



**Figura 1.** Esquema de las principales rutas sintéticas que conducen a la formación de los constituyentes de las ceras.

#### 1.3.1.4 Descripción de las ceras de origen mineral

Las ceras de origen mineral se producen mediante procesos geológicos, habitualmente en ausencia de oxígeno y luz.

La cera montan, una cera blanca que se emplea en pulidos y en pinturas, se obtiene en los depósitos de carbón, turba y lignita a partir de la descomposición de vegetales.

La ozocerita se forma a partir del carbón animal y de la lignita, y se extrae en yacimientos mineros. Está constituida por una mezcla de hidrocarburos saturados y es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. A partir de ella se obtienen otras ceras como la vaselina, parafina y okonita. Por su parte, la ceresina se obtiene a partir del tratamiento con ácido sulfúrico de la ozocerita. Presenta propiedades de goma y es

relativamente inerte debido a su bajo contenido en ácido. Esta cera mineral es blanca, inodora y amorfa, y se utiliza como adulterante de la cera de abeja [7].

#### 1.3.1.5 Uso de ceras naturales a lo largo de la historia

Debido a su accesibilidad y abundancia en la naturaleza, las ceras naturales han tenido multitud de aplicaciones a lo largo de la historia. Se han empleado como combustible y han sido el principal método de iluminación en numerosas culturas.

La cera de abeja se utilizaba en el antiguo Egipto como cosmético y en el proceso de momificación [23,26,27]. Asimismo se han hallado diversos tipos de ceras en yacimientos de enterramientos neolíticos [23,28] y en rituales religiosos [21].

Durante la antigüedad fue un material ampliamente utilizado en escultura y joyería, siguiendo una técnica denominada método de la cera perdida, utilizada principalmente para la manufactura de esculturas de bronce [26,29]. Consiste en la elaboración de un modelo de cera de la escultura, el cual se recubre con una capa de yeso, barro u otro material refractario. Posteriormente se vierte en su interior el metal líquido, que va fundiendo la cera y ocupando su lugar, la cual se evacua a través de orificios practicados en la parte inferior. Por último, una vez se ha enfriado se rompe el recubrimiento, descubriendo la escultura que conserva la forma de la figura original construida en cera [29].

Las propiedades aislantes e hidrofóbicas de las ceras también han sido aprovechadas en la edificación. En la época egipcia se empleaba para proteger los ladrillos [7] y en la construcción de barcos [21], mientras que en la época romana se empleó como aislante de agua, protector y vehículo de los pigmentos para las superficies de piedras, especialmente las de mármol [23,28]. Se han utilizado asimismo en alfarería como sellante [23,30,31].

Actualmente existen numerosos productos industriales para uso comercial, que se clasifican como ceras. Se emplean principalmente en el campo de la alimentación, en adhesivos, agentes sellantes, tintes, cosméticos, productos farmacéuticos, lubricantes, pulimentos y protectores contra la corrosión [26].

#### 1.3.2 Aplicación de ceras en obras pictóricas

Desde la antigüedad, las ceras naturales se han aplicado en el campo de la decoración, preservación y como aglutinante en obras de arte [26,32]. Su empleo en obras pictóricas da lugar a una técnica artística propia denominada encáustica, donde la cera cumple la función de aglutinante [23,33]. Esta técnica pictórica se conoce desde hace más de dos mil años, y

se ha establecido su uso en la elaboración de retratos en el Egipto romano [2,29]. Aunque se abandonó su empleo a principios de la Edad Media, algunos pintores modernos han empezado a utilizarla en arte contemporáneo.

La encáustica es una técnica pictórica que consiste en la aplicación de cera fundida y mezclada con pigmentos sobre la superficie que se va a decorar. Aunque se conocen diversas fórmulas y técnicas de aplicación de las ceras, no se conocen la totalidad de los componentes que se utilizaban en las pinturas antiguas. De forma general, la mezcla fundida se debe depositar con rapidez sobre la superficie que se desea cubrir. Para ello se usan dos procedimientos distintos de aplicación [2]:

a) Método de la cera caliente. Consiste en el uso del calor, probablemente proporcionado por la combustión de carbón vegetal, para provocar la licuefacción de la cera y permitir su mezcla con los pigmentos. La cera se mezcla a elevada temperatura junto a los diferentes colorantes, empleando un cuchillo llamado “cautarium”, y la mezcla se deposita sobre la superficie artística con un pincel llamado “pencilium”. Así pues, se realiza una primera distribución del color de la obra pictórica. Para dibujar sobre cera enfriada se utiliza un “cestrum”, una aguja puntiaguda, que se emplea también para afinar la mezcla, la textura y la anchura de la capa pictórica. Este método se usa principalmente para decorar superficies de madera, aunque también se ha aplicado sobre lienzos. Para pequeñas superficies, se prefiere introducir el pincel en la cera fundida y posteriormente se mezcla en una paleta con el pigmento. Éste es el procedimiento más habitual de encáustica. En ocasiones se utilizan varios tipos de ceras, o se añaden aditivos como resina de dammar, aceite de linaza o material proteico, con el objetivo de alterar las propiedades de la capa pictórica [4].

b) Método de la cera fría (método púnico). La existencia de esta técnica pictórica ha llegado a partir de recetas descritas en la antigüedad por Plinio y Disocórides, durante el siglo I. La cera se hierva con agua de mar, después se filtra varias veces a través de un paño. Luego se deja expuesta varios días al sol para un mejor blanqueado. Posteriormente se saponifica la cera mediante la adición de bicarbonato sódico. Seguidamente se vuelve a filtrar a través de un paño, se enjuaga con agua tibia y se seca al aire. Para mejorar las propiedades de la cera se mezcla con aceite, para reducir su viscosidad, y/o con yema de huevo para aumentar la adhesividad y la dureza de la capa pictórica. Esta mezcla se combina con el pigmento en un medio adecuado, y se aplica sobre el soporte de la obra artística. El uso de esta técnica pictórica ha sido atestiguado en la elaboración de diversos retratos en Egipto romano.

Las ceras se utilizan asimismo como aditivos en barnices. Su función consiste principalmente en incrementar la maleabilidad, plasticidad y adhesividad [7]. Asimismo se encuentra como aditivo en óleos, aumentando la hidrofobicidad y la resistencia al calor.

### 1.3.3 Características químicas

Los aglutinantes principalmente empleados en las obras pictóricas decoradas mediante la técnica de encáustica están constituidos por ceras naturales de diversas procedencias, como la cera de abeja (proveniente de animales), cera de carnauba (origen vegetal) y cerasina (mineral).

La cera de abeja es la más utilizada en el campo de la decoración de obras pictóricas por medio de la técnica encáustica. Está compuesta por una mezcla de hidrocarburos (14%), monoésteres (35%), diésteres (14%), triésteres (3%), hidroximonoésteres (4%), hidroxipoliésteres (8%), ésteres ácidos (1%), poliésteres ácidos (2%), ácidos grasos libres (12%), alcoholes libres (1%) y otros compuestos (6%). Los ácidos grasos más importantes son el ácido palmítico, palmitoleico, hidroxipalmítico y oleico, ya sea en forma de éster o de ácidos libres. La cera de abeja tiene una densidad entre 0,958 y 0,970 g.mL<sup>-1</sup> a 15°C y un punto de fusión de 63°C, por lo que su licuefacción para la mezcla con los pigmentos se puede realizar sin necesidad de calefacción muy fuerte, ya que además entra en combustión a 120°C [34].

La cera de carnauba está compuesta principalmente por ésteres de ácidos grasos (80-85%), alcoholes pesados (10-15%), ácidos libres (3-6%) e hidrocarburos (1-3%). Dentro de los ésteres se encuentran dioles de cadena larga (20%), ácidos grasos hidroxilados (6%) y ácido cinámico (10%). Es una de las ceras con mayor punto de fusión, alrededor de 78-85°C, y es asimismo una de las que tienen mayor dureza. Su densidad es de 0,97 g.mL<sup>-1</sup> y es soluble en xileno e insoluble en etanol y agua [24].

Debido a las condiciones de su formación, la mayoría de las ceras minerales contienen materiales relativamente poco oxidados. Así pues, la cerasina está compuesta por una mezcla de hidrocarburos. Es insoluble en agua y su punto de fusión variará entre 61 y 78°C [24].

De forma general, las propiedades que las hacen aplicables en el campo de la decoración de obras pictóricas son su maleabilidad, hidrofobicidad e insolubilidad en agua, que la protegen de la humedad ambiental, su plasticidad, y su bajo punto de ebullición, que permite su licuefacción para la mezcla con los pigmentos en condiciones no muy agresivas [26].

### 1.3.4 Alteraciones producidas a lo largo del tiempo

Las ceras están constituidas por sustancias que experimentan modificaciones a lo largo del tiempo. Por ello, generalmente se aprecian diferencias entre la composición química de una determinada cera encontrada en un objeto arqueológico o de una obra pictórica, con su correspondiente patrón actual, lo que dificulta su identificación [35].

Dada la diferencia de composición entre las diversas clases de cera y la gran cantidad de diversos compuestos que contienen, la influencia del envejecimiento será diferente para cada caso. De forma general, se produce la oxidación progresiva de los compuestos menos estables, la evaporación de los que posean mayor volatilidad y el consumo de materiales nutrientes por parte de microorganismos (especialmente ácidos grasos).

Así pues, se observa una sensible disminución de la cantidad de ácidos hidroxicarboxílicos, ácidos grasos insaturados y esteroides [21,22] y la formación de compuestos fenólicos a partir de flavonoides [26]. Por otra parte, se aprecia una pérdida de los n-alcanos por sublimación, especialmente de los de menor número de átomos de carbono, debido a su mayor volatilidad, así como de los ácidos grasos libres de cadena corta [26,35]. Asimismo se produce una alteración de la distribución de ésteres, debido a la hidrólisis causada por la humedad junto a agentes medioambientales ácidos, aumentando a su vez la cantidad de ácidos libres y alcoholes [26,35]. En el estudio de algunas muestras arqueológicas procedentes de ceras encontradas en vasijas romanas, se ha evidenciado la ausencia de ácido palmítico, debido probablemente a la acción de microorganismos [35].

## **1.4 Aceites secantes**

### **1.4.1 Generalidades**

Los lípidos son biomoléculas orgánicas ampliamente presentes en la naturaleza. Poseen una gran importancia para los seres vivos, ya que están involucrados en diversos mecanismos bioquímicos que controlan funciones indispensables en los organismos biológicos. Se utilizan principalmente como acumuladores de alimento y son la principal reserva energética de los seres vivos, ya que la energía liberada por unidad de masa, a través de las reacciones metabólicas de oxidación, es superior a la suministrada por proteínas y glúcidos. Asimismo participan en el mantenimiento de la estructura de células, órganos y tejido cutáneo, en forma de membranas lipídicas, las cuales forman una capa que les proporcionan consistencia y protección frente al exterior. En ocasiones también actúan como biocatalizadores, facilitando y favoreciendo reacciones químicas en los organismos. Así pues, los lípidos se encuentran principalmente en las semillas y en el recubrimiento externo de diversos vegetales, y en los órganos, el tejido adiposo y el cutáneo de los animales. El material lipídico se puede extraer de vegetales, tales como linaza, oliva, girasol, coco, adormidera, nuez, linaza, cáñamo, perila, etc, y de animales como atún, castor, cerdo, buey, cordero, leche de vaca, etc.

Los lípidos están compuestos principalmente por una mezcla de compuestos, mayoritariamente triglicéridos, formados a partir de una molécula de glicerol esterificada por tres moléculas de ácidos grasos, además de otros compuestos como diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres y en menor proporción esteroides y vitaminas liposolubles (A, D, E y F) [14]. Se trata de compuestos fuertemente hidrofóbicos, debido a la ausencia significativa de grupos polares libres en su estructura.

Los ácidos grasos son los componentes característicos de los lípidos. Consisten en un grupo carboxílico unido a una cadena lineal hidrocarbonada. Los ácidos carboxílicos naturales contienen un número par de átomos de carbono, ya que su biosíntesis se basa en la adición sucesiva de monómeros de acetilo. Difieren unos de otros en la longitud de la cadena y en la posición y número de sus enlaces dobles; algunos ácidos grasos poseen también ramificaciones constituidas por grupos metilo. El grado de insaturación y la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido graso influyen en su punto de fusión, solubilidad en agua y reactividad.

Los ácidos grasos más importantes que constituyen los triglicéridos se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Ácidos grasos naturales más comunes.

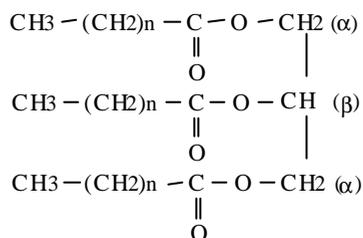
ácido graso	n° C:insat.	Pto. fusión (°C)	Estructura
<b>saturados</b>			
laúrico	12:0	44.2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
mirístico	14:0	53.9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
palmitico	16:0	63.1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
esteárico	18:0	69.6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
araquídico	20:0	76.5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
<b>insaturados</b>			
palmitoleico	16:1	-0.5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
oleico	18:1	13.4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
linoleico	18:2	-5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
linolénico	18:3	-11	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
á-elaostérico	18:3	49	ctt- $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
araquidónico	20:4	-49.5	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
erucico	22:1	-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

En general, la presencia de dobles enlaces disminuye la temperatura de fusión de un ácido graso, sin embargo, un aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada produce un incremento del mismo, debido a un aumento de la energía de interacción por fuerzas de Van der Waals [7].

Los ácidos grasos insaturados poseen isomería *cis-trans*. Los naturales son, en general, isómeros *cis*, pero en los procesos industriales a temperaturas elevadas se isomerizan parcialmente a la forma *trans*. La presencia de enlaces dobles *cis* altera la estructura tridimensional de los ácidos grasos y les da forma angular. Por esta razón, los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos insaturados con isomería *trans* presentan empaquetamientos más compactos en los cristales y sus puntos de fusión son más elevados. Los enlaces dobles *cis* de los ácidos grasos insaturados hacen que sus cadenas carbonadas adquieran conformaciones que no se adaptan con facilidad en una estructura cristalina ordenada de un sólido.

Los ácidos grasos son fuertemente apolares, por lo que son insolubles en agua. Aun así, la solubilidad en disolventes polares aumenta al disminuir la longitud de la cadena. Asimismo, son medianamente ácidos, pero debido a su insolubilidad en agua su acidez no se manifiesta. Los dobles enlaces carbono-carbono son grupos fuertemente reactivos, por lo que la estabilidad de los ácidos grasos disminuirá fuertemente al aumentar la insaturación.

Para formar el triglicérido, los ácidos grasos y los glicerol se unen a través de enlaces covalentes relativamente fuertes de tipo éster. Se trata de una reacción de condensación entre el grupo carboxílico del ácido graso y uno de los alcoholes del glicerol. En el siguiente esquema se muestra la estructura de los triglicéridos:

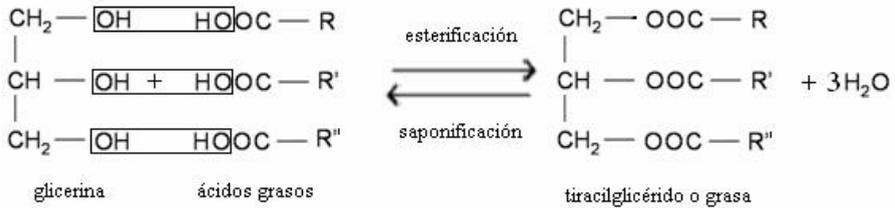


Los átomos de carbono extremos de la glicerina se designan con la letra  $\alpha$  y el central con la letra  $\beta$ . La mayoría de los triglicéridos naturales son mixtos; es decir, dos o tres de sus ácidos grasos son diferentes. Los ácidos grasos insaturados se encuentran generalmente en la posición  $\beta$ . Cuando los dos constituyentes en  $\alpha$  son diferentes pueden existir isómeros ópticos. En la naturaleza sólo se encuentran L-glicéridos.

Tanto las reacciones de formación como de ruptura del enlace éster están catalizadas por los protones, por lo que en medio ácido se llega a una mezcla intermedia. Así pues, la esterificación está favorecida por la eliminación progresiva del agua formada. En medio básico se produce la saponificación irreversible del triglicérido, obteniéndose la sal del ácido

graso y el glicerol libre. Las sales sódicas y potásicas de los ácidos grasos así obtenidas son los jabones.

En los organismos vivos, los triglicéridos se sintetizan y se destruyen mediante reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas específicas (lipasas). La hidrólisis parcial de triglicéridos da lugar a compuestos más hidrofílicos, como los diglicéridos y monoglicéridos. Estos compuestos son tensioactivos no iónicos, con su parte polar en los OH libres y se usan como emulgentes en las industrias alimentarias.



Los lípidos se denominan grasas cuando son sólidas a temperatura ambiente, y aceites cuando son líquidos. Así pues, en una grasa la proporción de ácidos saturados será superior a los aceites.

Dependiendo del tipo de ácido graso mayoritario, las grasas y aceites se clasifican en:

- monoinsaturadas: contienen principalmente ácidos grasos con una insaturación, como en el aceite de oliva y de frutos secos.
- poliinsaturadas: presencia mayoritaria de ácidos grasos con varios dobles enlaces, como el aceite de semillas vegetal y grasas de pescado.
- saturadas: contienen mayoritariamente ácidos grasos sin insaturaciones, como en el aceite de palma y en grasas animales

#### 1.4.2 Aplicación en obras pictóricas

La categoría de lípidos más empleada en obras de arte son los aceites secantes, los cuales contienen una elevada proporción de ácidos insaturados de 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos que se encuentran principalmente en los triglicéridos de este tipo de aceites son: linolénico, linoleico, oleico, esteárico, palmítico y mirístico.

Los aceites secantes han sido tradicionalmente empleados en obras de arte pictóricas como cubrientes, consolidantes y aglutinantes. La función del aceite secante consiste básicamente en dar soporte y cohesionar los pigmentos, por lo que influye directamente en las propiedades artísticas de la obra pictórica. Estas sustancias deben sus características a la presencia de ácidos grasos de elevada insaturación. En efecto, debido a la capacidad reactiva de los dobles enlaces, los aceites secantes son susceptibles de sufrir reacciones de oxidación por polimerización (proceso de secado), que los

transforman en polímeros de consistencia sólida. Esta transformación es importante en el ámbito de los materiales pictóricos ya que tras este proceso se convierten en películas transparentes que presentan óptimas propiedades mecánicas y ópticas, que los hacen muy adecuados como medio o vehículo para los pigmentos.

El uso de aceites secantes en obras pictóricas da lugar a una técnica artística propia denominada pintura al óleo. A pesar de que la mayor parte de las citas históricas emplazan la técnica al óleo durante la primera mitad del siglo XV, siendo sus mayores exponentes los hermanos Van Eyck, cabe resaltar que existen evidencias de que ya era empleada en el siglo XII en el sur de Europa [3]. De hecho, los maestros flamencos se limitaron a emplearla sistemáticamente, contribuyendo así a su difusión y consolidación, proceso que se realiza durante los siglos XVI y XVII. Gozó de gran aceptación en Europa a partir de finales de la Edad Media, debido a su mayor simplicidad de manejo, y por las posibilidades más amplias que ofrecía. Ha sido la más importante técnica pictórica desde el siglo XV hasta nuestros días.

La pintura al óleo se define como el arte de aplicar pigmentos disueltos en aceites secantes sobre la superficie de un soporte adecuado para crear una obra artística. La preparación se realiza mezclando pigmentos pulverizados, que deben ser insolubles, resistentes a la decoloración y poco reactivos, con algún aceite secante. Además se añaden tanto resinas terpénicas, para facilitar el secado de los aceites evitando contracciones de la película sólida formada y dar claridad a los colores, como esencias, que ayudan en su solubilización y permiten retardar el envejecimiento.

La preparación de pinturas al óleo sobre tela más extendida en el siglo XX, consiste en el uso de un soporte para la superficie pictórica, que puede ser una tabla o panel compuesto, o también, más frecuentemente, una tela de lino, algodón o yute tensada en un bastidor o encolada a una tabla. A continuación se debe preparar este soporte para ser recubierto por la pintura, llamado imprimación. Del éxito de esta fase depende no sólo la luminosidad final de la obra, sino también su duración. Posteriormente se extiende una primera capa de cola, a la que se añade amoníaco y glicerina. Después se aplica sobre la capa anterior una mezcla de cola, óxido de zinc y carbonato de calcio, en forma de una capa muy fina. Dicha preparación disminuye la capacidad de absorción del soporte, y proporciona una superficie pictórica que no es muy áspera ni muy suave. Aunque dicha superficie presenta color blanco, en ocasiones se aplica una capa de color gris, castaño o rojizo. No obstante a lo largo de la historia y en la actualidad se han utilizado también otros pigmentos y aglutinantes diversos.

La aplicación de la pintura al óleo sobre la superficie se lleva a cabo por etapas. En primer lugar, se bosqueja el dibujo sobre la preparación a lápiz o a carboncillo. Después se rellenan las zonas que van a ser coloreadas

con una pintura fluida, y a continuación se van refinando y corrigiendo sucesivamente con la pintura al óleo, más espesa. Este proceso puede durar desde pocos días hasta varios meses. La pintura al óleo se seca relativamente despacio con poca alteración de color, lo que permite igualar, mezclar, o degradar los tonos y hacer correcciones con facilidad. Por último, una vez seca la pintura, se recubre de una capa de barniz, para evitar su deterioro.

La técnica de pintura al óleo permite al autor de la obra pictórica no estar limitado a pinceladas lineales, sino que puede aplicar veladuras, aguadas, manchas, vaporizaciones o empastes (pigmentos muy espesos). El óleo permite la obtención de efectos de gran riqueza con el color, tales como los contrastes tonales y el claroscuro

#### 1.4.3 Características químicas

Los aglutinantes lipídicos más habituales en las obras pictóricas decoradas mediante la técnica de pintura al óleo están constituidos por aceites secantes extraídos de las semillas de diversas especies vegetales, como la linaza, nuez, adormidera y girasol.

El aceite de linaza es el aglutinante lipídico más utilizado en obras de arte pictóricas y se extrae por prensado de las semillas de la planta del lino (*Linum usitatissimum*). Otros aceites secantes son el de adormidera (amapola), obtenido por prensado de las semillas de adormidera blanca; el aceite de nuez, que se consigue por el prensado de nueces maduras; y el aceite de girasol, elaborado a través del prensado de semillas de girasol.

Resulta muy difícil conocer todos los glicéridos que forman parte de un aceite y sus proporciones debido a que la separación de una mezcla tan compleja de sustancias muy semejantes es una operación analítica larga y complicada. Por eso, su composición se suele expresar dando las proporciones de los ácidos grasos globalmente, sin distinguir en qué glicéridos están distribuidos. En la Tabla 3 se muestra la composición en ácidos grasos de los aceites secantes. Todos los aceites contienen asimismo alrededor de 1% de sustancias no saponificables, como glicerol, triterpenos, metilesteroles, esteroleos,  $\beta$ -sitosterol y colesterol.

**Tabla 3.** Proporción de ácidos grasos y características de los aceites secante más habitualmente utilizados como aglutinantes lipídicos [7].

Aceite secante	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	$d$ (g/mL)	$T_{eb}$ (°C)
linaza	trazas	6-7	3-6	14-24	14-19	40-60	0,93	387
nuez	-----	3-7	0,5-3	9-30	57-76	2-16	0,93	386
adormidera	-----	10	2	11	72	5	0,92	
girasol	trazas	5-6	4-6	17-51	38-74	trazas	0,91	

Dado que son los ácidos grasos insaturados los que confieren al aceite sus propiedades secantes, éstas dependerán de la proporción en el aceite secante de ácidos grasos con dobles enlaces y de su grado de insaturación.

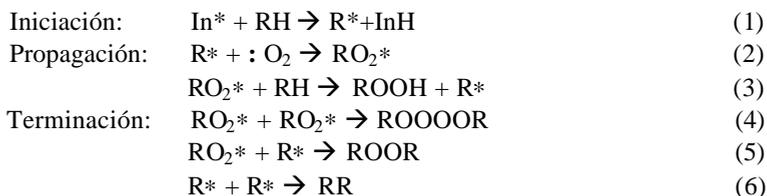
El aceite de linaza es el que presenta mayores propiedades secantes, ya que contiene gran proporción de ácidos insaturados, especialmente de ácido linoléico. El aceite de nuez también muestra propiedades secantes, debido a que contiene mayoritariamente ácido linoleico, así como cantidades menores de ácidos linoleico y oleico. Los aceites de girasol y adormidera se denominan aceites semisecantes por su menor contenido en ácidos grasos de gran insaturación, por lo que experimentan con mayor lentitud el proceso de secado.

#### 1.4.4 Mecanismos de envejecimiento

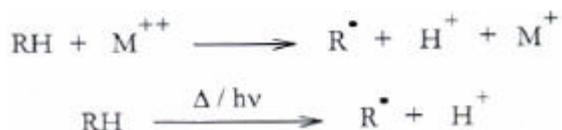
El envejecimiento de los aceites secantes se inicia durante la etapa de secado de la capa pictórica. Se producen una serie de reacciones de oxidación que afectan principalmente a los ácidos grasos del aceite secante a través de los dobles enlaces, y conducen como efecto global la formación de enlaces entrecruzados entre las moléculas de ácidos grasos para dar lugar a un material de elevado peso molecular [7,14]. En efecto, debido su reactividad, las sustancias con dobles enlaces tienen tendencia a oxidarse mediante reacciones radicalarias con las moléculas de oxígeno atmosférico. Este proceso tiene lugar en contacto con el aire y es catalizada por la luz UV, la exposición a elevadas temperaturas, la humedad, la presencia de enzimas como lipoxigenasas y peroxidasas que se encuentran en los extractos vegetales, los microorganismos, y algunos iones metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , etc) [7]. Una característica importante de este proceso es su acción autocatalítica por lo que una vez iniciado, la velocidad de reacción aumenta progresivamente.

Dado que el proceso de oxidación incluye numerosas reacciones radicalarias, y está influido por multitud de factores, los mecanismos de oxidación son en su mayor parte desconocidos. Por ello, sólo es posible establecer hipótesis acerca de las reacciones químicas que se suceden y de los procesos que tienen lugar durante el envejecimiento de los aceites.

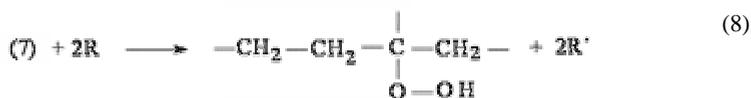
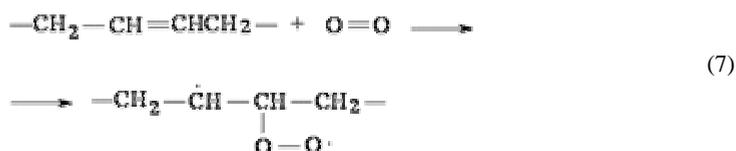
El proceso de reacciones radicalarias se puede clasificar en tres etapas: iniciación, propagación y terminación, como se muestra en el siguiente esquema:



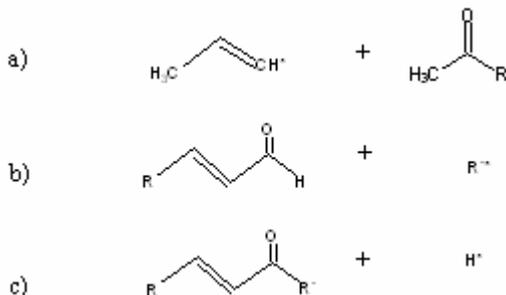
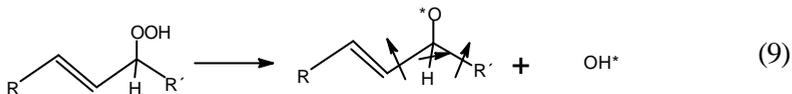
La etapa de iniciación es decisiva en el proceso, ya que la ruptura de un enlace C-H presenta una elevada energía de activación, aun en el caso en el que esté conjugado a una insaturación. La formación de radicales puede tener lugar mediante ruptura homolítica fotoquímica o térmica del enlace RH, mediante abstracción de un H por un radical libre iniciador (In), que suele ser una molécula cuya transformación en radical requiere baja energía, así como por reacción redox con un catión metálico reducible.



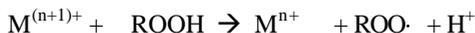
Esta etapa está más favorecida en los ácidos grasos poliinsaturados, ya que el radical formado está estabilizado por la conjugación de los dobles enlaces. La etapa de propagación siguiente implica la adición de un birradical de oxígeno sobre el radical formado en la anterior etapa para dar como producto primario un radical peróxido (7). Este producto formado sustrae dos hidrógenos a dos moléculas de ácidos grasos nuevas, formando el hidroperóxido (8) y dos nuevos radicales (2R'), que pasarán a actuar entonces como propagadores de la reacción en cadena [36,37]. Debido a que casi todos los triglicéridos presentes en los aceites secantes contienen más de un ácido graso insaturado, el oxígeno puede incorporarse en más de una posición.



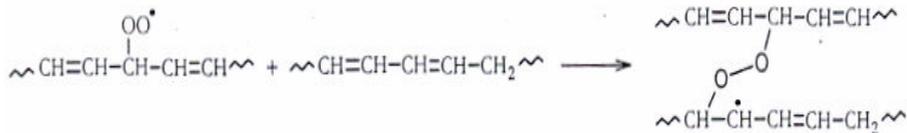
Por otro lado, el hidroperóxido (8) se descompone debido a su inestabilidad, produciendo aldehídos (a,b) y cetonas (c). En el siguiente esquema se muestran las tres posibles vías de fragmentación de los hidroperóxidos:



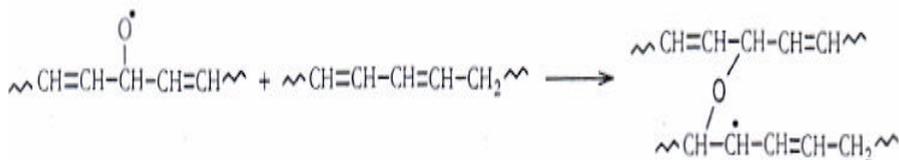
La estructura de los aldehidos producidos depende de la localización del grupo hidropéroxido, que normalmente se forma en el doble enlace o en posiciones  $\alpha$  a él. Estos aldehidos posteriormente se oxidan para dar lugar a ácidos carboxílicos. La descomposición de los radicales hidropéroxidos se puede producir también por vía homolítica, o mediante reacciones redox con los cationes metálicos, generando radicales péroxidos, alquilo y alcóxidos [38].



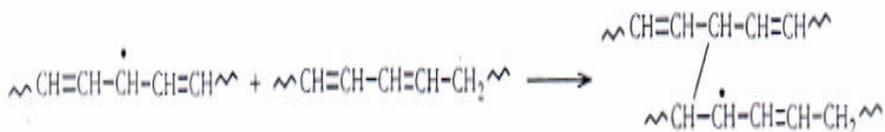
Los procesos de mayor importancia para la formación de la capa filmógena consisten en el ataque de un radical con cadena carbonada sobre el doble enlace de un ácido graso cercano. La reacción radicalaria fuerza la apertura de la insaturación y genera un nuevo radical, que propagará la reacción sobre los dobles enlaces de otros ácidos grasos, extendiendo la red polimérica. Independientemente de la naturaleza del atacante, el producto será un radical alquilo. Cuando la reacción está producida por peróxidos se obtiene un dímero unido por dos átomos de oxígeno.



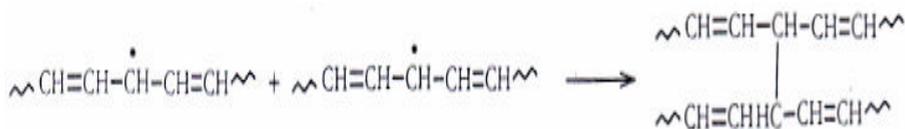
Los alcóxidos también atacarán las insaturaciones de ácidos grasos cercanos, formando un dímero enlazado por un enlace éter,



Los radicales alquilo generados reaccionan según el mismo mecanismo, produciendo dímeros más estables unidos por enlaces carbono-carbono. Esta reacción es mayoritaria, debido a la importante cantidad de radicales alquilo generados, y la que más participa en la estabilidad de la red polimérica.



La fase de terminación conlleva la recombinación de dos radicales. La reacción más frecuente en condiciones normales es la de dos radicales peróxido ROO\* para dar un intermediario tetróxido, ROOOOR que debido a su inestabilidad se descompone en una cetona, un alcohol secundario y oxígeno molecular. Por otro lado, también pueden reaccionar dos radicales alquilo, lo que da lugar a la formación de un dímero estable.

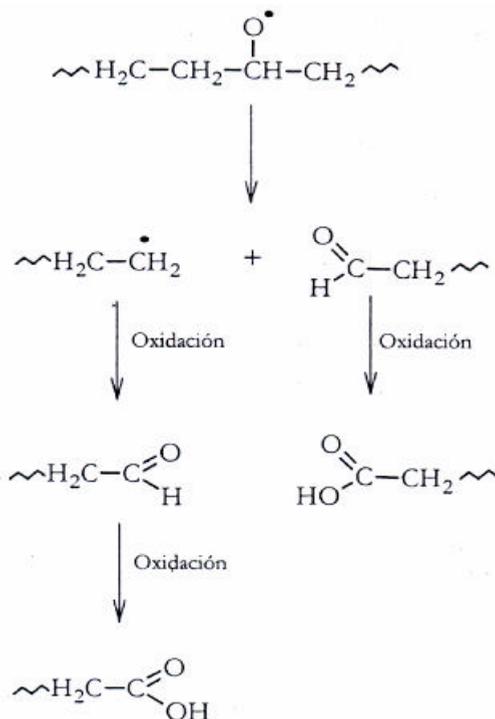


Junto a los procesos de oxidación de los aceites secantes, se produce la hidrólisis de los enlaces éster de los triglicéridos, lo que aumenta la acidez de la capa pictórica [39]. En algunos casos, los grupos carboxílicos pueden complejar los cationes metálicos, formando las correspondientes sales [40].

Otra serie de reacciones conducen a la formación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, resultado de la degradación de ácidos grasos de cadena larga. La ruptura se produce en las insaturaciones, debido a

que son los puntos más reactivos de la cadena carbonada. Los productos formados son generalmente di- y mono- ácidos de 8, 9 o 10 átomos de carbono. El producto de degradación más habitual es el ácido azelaico (diácido de 9 átomos de carbono), ya que se encuentran gran cantidad de ácidos grasos insaturados con dobles enlaces en la posición 9 [41].

Uno de los procesos de degradación que conduce a la formación de este tipo de compuestos es la escisión de los alcóxidos en  $\beta$ . Se produce la ruptura homolítica del enlace carbono-carbono que se encuentra junto al oxígeno, lo que conlleva a la formación de un radical alquílico y un aldehído. Éste último se oxidará y se convertirá en ácido carboxílico, mientras que el radical puede incorporarse a la serie de reacciones que causan el crecimiento de la red polimérica, o puede interactuar a su vez con oxígeno, dando lugar a un aldehído, que se oxidará en ácido carboxílico [12].



Las características del proceso de secado están influenciadas por los parámetros medioambientales. La presencia de una cantidad moderada de agua puede frenar las reacciones de degradación de los aceites secantes a través de la interacción con los hidroperóxidos, interfiriendo en su descomposición. Asimismo el agua puede complejar los cationes metálicos de los pigmentos, lo que ralentiza la formación de radicales libres, y actuar

como disolvente y difusor de sustancias antioxidantes hacia las capas que contienen lípidos. La influencia de la temperatura y de la radiación consiste en el aporte de la energía suficiente para alcanzar los estados de transición de las reacciones de oxidación, por lo que acelerarán el proceso de secado [42,43].

Los microorganismos depositados sobre la superficie de la capa pictórica pueden causar su deterioro, especialmente por su capacidad de utilizar los ácidos grasos como aporte de energía, reduciendo la masa molecular de los polímeros. Además, se produce el vertido de desechos del metabolismo, que pueden interaccionar con los compuestos de la capa filmógena. La humedad y la temperatura favorecen en gran medida el desarrollo de bacterias y hongos, mientras que la luz ayuda al crecimiento de microorganismos vegetales fotosintéticos [44].

Debido a los cambios químicos que experimenta el aglutinante lipídico, se producen variaciones en sus características químicas y físicas. El aceite secante es inicialmente un líquido, y a medida que avanza el secado aumenta progresivamente la viscosidad al crecer la masa molecular de los oligómeros, hasta obtener un material sólido y de gran consistencia. Por otra parte, la capa filmógena formada está constituida por materiales insolubles en agua y posee elevada hidrofobicidad, por lo que una vez formada constituirá una eficaz protección contra los efectos de la humedad en los pigmentos y capas inferiores [7].

La tendencia al amarillamiento, observada en los aceites secantes, se produce esencialmente en la oscuridad, y se invierte al ser expuesto a la luz [45]. Este proceso también ocurre después del envejecimiento acelerado por irradiación UV, seguida de tratamiento a elevada temperatura, tras los cuales se produce un amarillamiento que revierte tras la exposición de la muestras a la luz visible [46]. Los cromóforos causantes del amarillamiento no están aún identificados, aunque algunos autores proponen que los responsables son sustancias polares que presentan una fuerte absorción hacia los 400-430 nm [47], y poseen dobles enlaces aislados [48]. Otras investigaciones apuntan a la intervención de compuestos, producto de la descomposición de los hidroperóxidos, como dicetónicos, sales metálicas de sus formas enólicas [49], moléculas de tipo quinona formadas por condensación de dicetonas [50], sustancias con dobles enlaces conjugados [51], o bien obtenidos a partir de reacciones cooxidativas con agentes contaminantes [52]. La luz visible interaccionaría con estos compuestos, lo que causaría su descomposición [43,53,54]. Dada su mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, el aceite de linaza tenderá a envejecer y a amarillear más rápidamente que los aceites de nuez, adormidera y girasol.

## 1.5 Barnices de instrumentos musicales. Resinas terpénicas

Las resinas terpénicas han sido ampliamente utilizadas como ingredientes principales en la elaboración de barnices aplicados en forma de capa filmógena sobre multitud de objetos. Su función consiste en aislar el objeto del exterior y evitar la degradación de las capas interiores a partir del ataque de agentes medioambientales, por lo que resulta esencial en piezas constituidas por materiales químicamente más reactivos. Asimismo se utilizan para modificar las propiedades estéticas mediante la adición de sustancias colorantes. En el campo del arte se utilizan principalmente en obras pictóricas como protector y ensalzador del brillo. Dado el amplio uso de las resinas terpénicas, en esta sección el trabajo se centrará en el estudio de los barnices utilizados en instrumentos musicales de cuerda.

Los instrumentos musicales han sido utilizados por el hombre desde el principio de la historia. Se trata de herramientas que permiten a los músicos expresar sus sentimientos, anhelos y estados de ánimo, transformándolos en ondas sonoras que estimulan el sentido del oído del receptor. Algunas de las creaciones musicales se consideran incluso como obras de arte y han perdurado a lo largo de los siglos.

Existen multitud de familias de instrumentos musicales, entre las cuales es de destacar la eleva importancia y el amplio uso de los instrumentos de cuerda. Dentro de esta denominación se encuentran los laúdes y violines, los cuales no sólo se utilizan para la creación de obras de arte, sino que ellos mismos también se pueden considerar como tales. Esta apreciación es especialmente acertada al referirse a los violines elaborados por los *luthiers* cremoneses del Renacimiento (siglos XVI-XVII), entre los que destaca el maestro Antonio Stradivarius, cuyas creaciones nunca han sido superadas en términos de calidad sonora. Así pues, el estudio de los diseños de su elaboración y de los materiales que los componen resulta importante para comprender su funcionamiento y su evolución histórica, así como para proponer tratamientos de restauración que permitan su exposición y/o su empleo como instrumento musical.

### 1.5.1 Descripción general de las piezas de los violines

Los violines están compuestos por cuatro piezas fundamentales, las cuerdas, la caja de resonancia, el mango o mástil y el arco (Figura 2). Su longitud es variable y depende de la altura del artista. Un violín de talla máxima se denomina “entero” y mide alrededor de 60 cm.

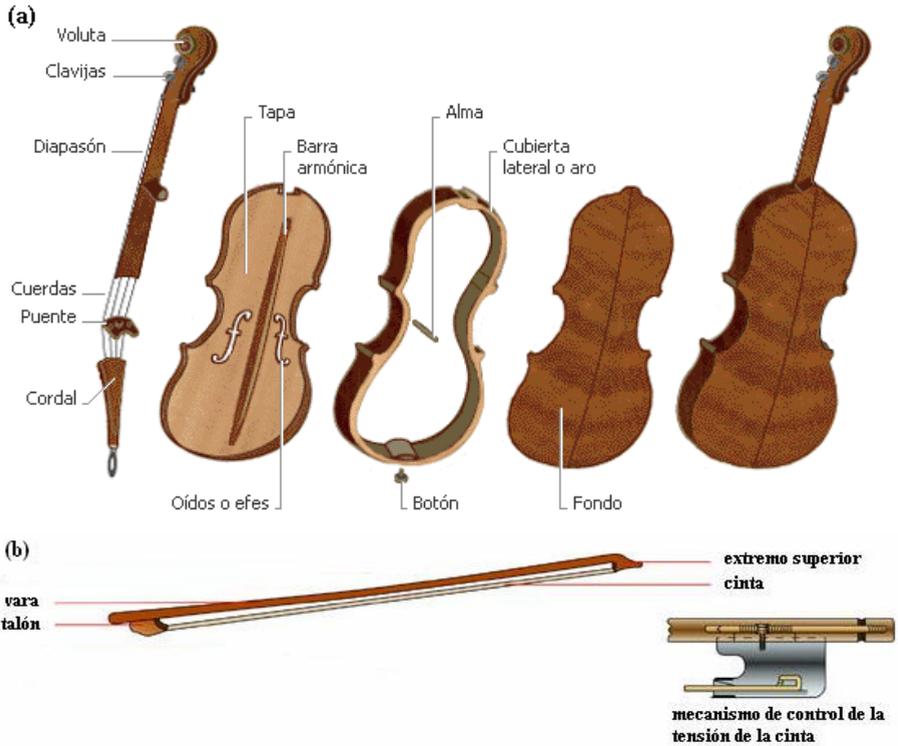
Las cuerdas son el elemento que produce el sonido a partir de su vibración. En un principio se fabricaban a partir del intestino grueso de oveja, y en algunos casos se recubrían con plata o cobre. Debido a su relativa fragilidad, en la actualidad se elaboran de acero o de un material sintético

rodeado con aluminio. En cualquier caso, la característica principal de las cuerdas de violín son su elasticidad, su flexibilidad y su color transparente.

La caja de resonancia tiene como función principal la amplificación de los sonidos producidos por la vibración de las cuerdas. Presenta generalmente un perfil de forma ovalada, con dos estrechuras cerca del centro. La cara superior se denomina tabla superior o tapa (tradicionalmente fabricada de madera de *Picea abies*), es de perfil abombado y tiene dos orificios aproximadamente en la zona central, llamados oídos o “eses”, por donde se libera el sonido. Entre los oídos se encuentra el puente o *ponticello* (usualmente de madera de arce), el cual sostiene las cuerdas por encima de la tabla superior, manteniéndolas en planos diferentes, y permite la transmisión de las vibraciones hacia la caja de resonancia. En la parte inferior de la tapa se sitúa el cordal, una pieza triangular de madera de ébano, cuyo papel es de mantener fijas las cuerdas. La cara posterior se denomina tabla de fondo o armónica (tradicionalmente de madera de arce o de *Picea abies*), cuya forma es ligeramente menos abombada que la tapa. Estos dos elementos están unidos por las cubiertas laterales o aros. En el interior de la caja de resonancia se encuentran el alma y la barra armónica, dos cilindros de madera cuya función es la transmisión de los sonidos y soportar las tensiones estructurales provocadas por la vibración de las cuerdas.

Otra parte fundamental del violín es el mango, una pieza de madera de arce, cuya función principal consiste en sostener las cuerdas. En su extremo se encuentra la voluta (tradicionalmente de madera de arce), a cuyos lados está el clavijero, donde se controla la tensión de las cuerdas a través del giro de las clavijas, (habitualmente de madera de palisandro) a las que están atadas. Una pieza de madera de ébano, denominada diapasón o *tastiera*, cubre la parte superior del mástil y sirve de guía para las cuerdas.

Por último, el arco no forma parte del violín, pero resulta imprescindible para su uso como instrumento musical, ya que se utiliza para provocar la vibración de las cuerdas por frotación. El arco está constituido por una vara de madera estrecha, de curva suave, normalmente de madera de Pernambuco. Incorpora tradicionalmente una cinta de hebra con crines de caballo, aunque en la actualidad también se utilizan de fibra vínllica, sujeta a los extremos superior e inferior (talón) de la vara. Este último tiene un sistema de tornillo que, al hacer desplazarse la pieza que va unida a un extremo de las crines, las tiende o las distiende, lo que permite fijar la tensión de la cinta. El control de la frotación entre este elemento y las cuerdas, permite al artista controlar su vibración, y por ende, dirigir el sonido finalmente producido por el violín. Para que las cuerdas vibren adecuadamente, la cinta debe estar impregnada de forma periódica con resina de colofonia.



**Figura 2.** Partes fundamentales de un violín (a) y de un arco (b).

La mayor parte de la superficie externa del violín está recubierta por una capa filmógena de barniz, el cual cumple importantes funciones. Así pues, se utiliza para aglutinar y dar soporte a los pigmentos, de lo que dependerá la apariencia estética del violín, así como para protegerlo de agresiones por parte de agentes externos. Al contrario de lo que sucede en obras pictóricas, en los instrumentos de cuerda la capa externa forma parte de la propia obra de arte y no se suele retirar ni sustituir para no modificar su valor artístico. Los barnices se preparan de forma general mezclando materiales filmógenos (como resinas naturales, gomas y lacas), con los colorantes en un disolvente adecuado (tradicionalmente etanol, esencias o aceite secantes) [5].

### 1.5.2 Evolución histórica y materiales usados en la elaboración de violines

Los violines actuales son el resultado de la evolución de otros instrumentos musicales más antiguos. El ancestro más antiguo de los instrumentos de cuerda es el “ravanastron”, un instrumento de cuerdas muy simple originario de Ceilán, que fue inventado hacia el tercer milenio a.C.

Los instrumentos actuales descienden del rebab, desarrollado en Asia central (actual Afganistán) hacia el siglo VIII e introducido en Europa durante el siglo XIII a través de España por los árabes.

Los primeros violines renacentistas aparecen a lo largo del siglo XVI en Baviera y en el norte de Italia, aunque fueron los maestros de Cremona los que lograron fabricar instrumentos de mejor calidad. Se acepta que el creador del violín en su forma actual fue Andrea Amati (1520-1578), continuando su obra su nieto Nicolo Amati (1596-1684). En él se inspiró posteriormente el *luthier* Antonio Stradivarius (1644-1737), considerado el fabricante de violines más hábil que haya existido. Sus instrumentos producían sonidos limpios, bien balanceados, firmes y dinámicos y poseían elevada rapidez de respuesta, pureza y colorido tonal, así como poder de penetración [55].

La calidad de los instrumentos fabricados en aquella época no ha podido ser reproducida en la actualidad, a pesar de la tecnología de la que se dispone. De hecho, los *luthiers* modernos intentan fabricar sus violines imitando los instrumentos de los maestros renacentistas. Este trabajo está dificultado por la falta de información acerca de las técnicas de fabricación, debido a que no se escribieron recetas acerca de la manufactura de violines, y por la tradicional forma de transmisión del conocimiento, que se establecía únicamente de maestro a aprendiz. Una de las teorías que explica la extraordinaria calidad sonora de los violines renacentistas sugiere que son debidas a la madera y al barniz usados en su fabricación. No obstante, su estudio está dificultado por la cantidad de productos presentes y sus posibles modificaciones posteriores. También influye el carácter artístico del violín, que provoca gran renuencia en el propietario a su cesión para efectuar los análisis, y en todo caso, a la pequeña cantidad de muestra disponible sin reducir su valor artístico [55].

Algunos expertos plantean diversas hipótesis, según las cuales la madera elegida para la fabricación del violín provendría de especies vegetales ya extinguidas, o de árboles cuyas condiciones ambientales de crecimiento eran radicalmente diferentes a las actuales [55]. Asimismo se han encontrado evidencias, mediante análisis por FTIR y RMN, de tratamiento alcalino de las maderas de los violines, mediante ahumado o en contacto con agua a pH básico hirviendo, lo que destruye parte de la hemicelulosa y la lignina de la madera, aumentando su blandura [56]. Otra alteración probable es la producida por hongos y bacterias, en este caso provenientes de los ríos y lagunas por los que circulaba la madera antes de llegar al taller del *luthier*. Los microorganismos presentes degradaban ligeramente la madera, aumentando su ductilidad y maleabilidad. Así pues, la aparición de poros permite la circulación del aire, reduciendo la presión interna, disminuyendo la sensibilidad a los cambios climáticos y facilitando la absorción del barniz. Estudios anteriores de las maderas utilizadas en

talleres de Cremona mediante Microscopía Electrónica revelaron la presencia de filamentos de hongos y restos de bacterias [57].

Los instrumentos pueden estar total o parcialmente barnizados, en algunos casos con varias capas [5], cuya influencia en la sonoridad aún no ha sido establecida. No obstante, se piensa que las propiedades vibratorias de la capa filmógena formada pueden influir en la calidad sonora del instrumento. Por ejemplo, un barniz demasiado plástico atemperaría el sonido, mientras que uno muy elástico podría incrementar las vibraciones de baja frecuencia. Aunque no se tiene información acerca de la composición de los barnices de violines, se sugiere que eran similares a los empleados en el mobiliario de la época, de los que se dispone de muestras y también de recetas para su elaboración.

En algunos casos se han descrito barnices de violines que contienen copal, sándalo, alcanfor, ámbar, colorantes como sangre de dragón y áloe pardo, así como los aditivos minerales procedentes del polvo de vidrio, sulfato cálcico, carbonato cálcico cristalino, porcelana pulverizada y cenizas volcánicas [58]. Estas partículas intervendrán en la coloración final del barniz, y, al agregarse, influirán en la dureza de la madera y por tanto de las propiedades vibratorias, protegiéndola también del ataque de los insectos.

Diversos estudios realizados sobre violines elaborados por Stradivarius indican la presencia de barnices al óleo, con ámbar y abundante cantidad de materia mineral. El análisis por Espectroscopia de Rayos X mediante dispersión de energía ha revelado la presencia de cuarzo, calcita, feldespato potásico, yeso y rubí, siendo significativo el bajo tamaño de partícula (inferior a 0,2  $\mu\text{m}$ ) [58]. Otros estudios realizados utilizando SEM/EDX, así como por Fluorescencia de Rayos X por reflexión total (TXRF) y dispersión de energías, han demostrado la existencia de minerales de sulfato de plomo, sulfato de mercurio y minerales de hierro y arsénico en violines renacentistas [59,60,61,62]. Por otro lado, el barniz de violines contiene probablemente una mezcla de resinas y aceite de sándalo, aunque se dispone de poca información al respecto, ya que la fracción orgánica de los barnices de violines ha sido relativamente poco estudiada [55].

En conclusión, los barnices elaborados con el objetivo de recubrir violines de la época renacentista están compuestos por una mezcla de sustancias de origen natural. Aunque no se conocen recetas de fabricación de barnices de violines, sí han llegado a nuestra época manuscritos acerca de la elaboración de barnices para otros objetos de madera [64,65]. Según estos datos bibliográficos, la fracción inorgánica consta de partículas de minerales mientras que la fracción orgánica está compuesta principalmente por resinas terpénicas, ceras, aceites secantes, gomas, oleogomoresinas, plastificantes y colorantes.

### 1.5.3 Generalidades acerca de la influencia de los barnices en instrumentos musicales

Se considera que los barnices influyen en tres aspectos del instrumento musical: su protección, su aspecto estético y la sonoridad [5].

La naturaleza del instrumento musical de un violín implica, contrariamente a las obras de arte pictóricas, ser continuamente manipulado, al ser frecuentemente desplazado, utilizado, sostenido y tocado por un músico. Asimismo se expone a la luz y al polvo, así como a variaciones microclimáticas constantes. En particular, los instrumentos de madera son muy sensibles al contacto con la piel, al sudor y al aliento del propio músico. La capa protectora debe presentar una barrera contra los choques mecánicos, para evitar la aparición de raspaduras y abolladuras. Así pues, el barniz debe poseer cierto grado de flexibilidad y no ser quebradizo.

Por otra parte, el barniz permite realizar la textura de la madera, su estructura y sus motivos decorativos. La capa filmógena puede también tener una pigmentación propia que influya en su apariencia. La gran variedad de pigmentos a disposición del *luthier* permiten obtener numerosos matices de coloración. También es posible la aplicación de diversas capas de barnices con diferentes coloraciones, cuya superposición permite obtener efectos ópticos como el dicroísmo, presente en gran cantidad de violines [5].

La influencia del barniz en la sonoridad del instrumento no ha sido establecida. No obstante, algunos *luthiers* afirman que el barnizado modifica el timbre del violín y que las propiedades sonoras del instrumento evolucionan durante varios años después de su fabricación, coincidiendo con el proceso de secado del propio barniz. La influencia de una capa cubriente sobre las propiedades mecánicas de una placa de madera será diferente si se deposita de forma longitudinal o radial, debido a que se trata de un medio anisótropo. También influyen los tratamientos de la superficie de la madera y el estado de los poros, de lo que derivará el grado de penetración del barniz. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la madera modifica sus propiedades mecánicas (densidad, masa, flexibilidad, rigidez y amortiguación) al ser recubierta de barniz, alterando su vibración, y probablemente afectando a la calidad de los sonidos emitidos [63]. Por último, la propia protección que aporta el barniz al instrumento permite la preservación del sonido al dificultar la evolución de los materiales del instrumento.

### 1.5.4 Características de las resinas terpénicas

Las resinas están constituidas por mezclas de hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxidados (terpenoides). Se trata de sustancias naturales formadas por la unión de moléculas de isopreno ( $C_5$ ). Se denominan

monoterpenos a los dímeros ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos a los trímeros ( $C_{15}$ ), diterpenos a los tetrámeros ( $C_{20}$ ) y triterpenos a los hexámeros ( $C_{30}$ ). Habitualmente, los diterpenoides y triterpenoides son materiales sólidos y no aparecen en las mismas resinas, aunque sí pueden ir acompañados de monoterpenos o sesquiterpenos. Una resina di- o triterpénica con gran cantidad de mono- y sesquiterpenoides puede estar en estado líquido, y se denomina oleoresina [7].

- Resinas diterpénicas

a) Colofonia. Es un residuo no-volátil de la destilación de la resina de diversas especies de pino (*Pinus*) [7]. Su composición química depende del género de especie pinácea, pero se trata generalmente de una mezcla de ácidos diterpénicos, sobre todo abietanos y pimaranos (abiético, levopimarico, neoabiético, pimarico, palústrico y deshidroabiético (DHA)) [7,73-78]. Es soluble en hidrocarburos y alcohol, y funde hacia 130°C. Al envejecer sus compuestos tenderán a dar derivados oxigenados (alcoholes y cetonas) del ácido deshidroabiético, como el ácido 7-oxo-deshidroabiético (7-oxo-DHA) y el 15-hidroxi-7-oxo-deshidroabiético (15-OH-7-oxo-DHA) [7,75,79]. Es un material ampliamente utilizado en la elaboración de barnices de violines modernos.

b) Trementina de Venecia. Es un líquido viscoso extraído del árbol *Larix Gmelinii*. Desde el punto de vista químico es una mezcla de labdanoides neutros y de ácidos diterpénicos y no posee moléculas polimerizables. Su caracterización se basa en la detección de larixol y el acetato de larixilo, ya que únicamente se encuentran en esta resina. Se usa muy frecuentemente en la elaboración de barnices. generalmente con ceras, aditivo empleado aumentar su plasticidad y adhesividad. Debido la elevada proporción de sustancias neutras que contiene, su acidez resulta muy baja [7,73,74,76,78].

c) Bálsamo de Canadá. Resina obtenida a partir del árbol *Abies balsamea*, originario de América del Norte. Este material contiene principalmente ácidos diterpénicos de tipo abietano y pimarano (abiético, DHA, isopimarico, palústrico, pimarico, sandaracopimarico, neoabiético, abietatetraenoico y los oxidados 7-oxo-DHA y 15-OH-7-oxo-DHA) y una elevada proporción de cis-abienol. Este labdanoide experimenta una rápida reacción de polimerización, siendo este proceso responsable de las propiedades como agente fijante de la resina [7, 74,76,80].

d) Trementina de Estrasburgo. La composición química y las características de esta resina son muy similares a las del Bálsamo de Canadá, aunque en este caso se extrae de la especie europea *Abies alba* [7,74].

e) Sandaraca. Se trata de una resina diterpénica obtenida a partir del árbol *Tetraclinis articulata* [7]. Está constituida principalmente por ácido

comúnico, el cual polimeriza rápidamente a ácido policomúnico [7,73,81-83]. También contiene ácido sandaracopimárico, 12-acetoxisandaracopimárico, fenoles (totarol) y labdanoides. Es soluble en alcohol, éter y acetato de amilo, y moderadamente soluble en cloroformo, esencia de trementina y benceno, y pasa a estado líquido a 145°C. En los barnices se encuentra habitualmente mezclado con aceite [7].

f) Copal (“melengk, loba, pontianak, boea”). Resina diterpénica obtenida a partir del *Agathis*, de la cual se conocen numerosas clases. El Copal más importante es el Kauri, que se obtiene a partir del *Agathis Australis*, una variedad originaria de Nueva Zelanda. Se ha usado como ingrediente para la fabricación de barnices de alta calidad. Químicamente se trata de un polímero constituido principalmente por comunol y ácido comúnico. La resina de Copal de Manila se extrae del árbol *Agathis dammara* [7]. Esta resina es rica en ácido comúnico y en ácido agático, y contiene cantidades menores de ácido sandaracopimárico, ácido agatólico y ácido torulísico [7,73,82]. El barniz obtenido con estas resinas se caracteriza por su dureza, que indica el grado de polimerización del ácido comúnico [7,84]. Estas resinas se utilizan normalmente mezcladas con aceites.

g) Copaiba. Resina líquida obtenida a partir de árboles de la familia *Leguminosae*, originaria de América del Sur. Desde el punto de vista químico, está compuesta por diterpenos labdanoides y abietanos disueltos en sesquiterpenos. Su color depende de la proporción relativa de estas sustancias, desde amarillo claro hasta marrón oscuro. Se utiliza en barnices para retrasar el secado de la capa pictórica y en tratamientos de limpieza y restauración [7,80].

#### - Resinas triterpénicas

h) Elemi. Con este nombre se denominan varias resinas triterpénicas obtenidas a partir de diversas familias de árboles pertenecientes a la especie *Burseraceae*. El elemi de Manila se obtiene a partir de *Canarium lurzonicum* o *Canarium commune* originaria de Filipinas, mientras que la variedad conocida como “copal mejicano” se extrae de la resina de *Amyris elemifera*, *Bursera cuneata*, *Elaphirium jacquinianum* (*Bursera tomentosa*) y *Elaphirium elemifer*, procedentes de Méjico y California. La variedad de las Indias Occidentales se obtiene del *Dacryodes hexandra*. Por otro lado, el elemi brasileño se obtiene a partir del *Icica icicariba* y el elemi oriental se extrae de *Boswellia Frereana*, originario de África [85]. En todos los casos se trata de una mezcla de triterpenoides neutros, principalmente los alcoholes pentacíclicos á- y â-amirina, y de diversos sesquiterpenoides [7,73,85]. Los compuestos triterpenoides cristalizan dando a la resina una apariencia blanca o amarillo pálido opaca. Es blanda y maleable, por lo que se utiliza en barnices desde el siglo XIX como material plastificante. Sin embargo, al

envejecer va adquiriendo dureza, debido a la evaporación de la fracción sesquiterpénica [7].

i) Mastic. Resina obtenida a partir del árbol *Anacardiaceae Pistacia*. Está compuesta por triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos parcialmente oxidados. Las moléculas presentes en mayor cantidad son: ácido masticadienoico, ácido isomasticadienoico, oleanano, ácido oleanónico y ácido morónico. Este último sólo se encuentra en el mastic, por lo que su identificación en un barniz se considera como indicio de que se ha utilizado esta resina en una muestra. Es soluble en esencia de trementina, en tolueno y en xileno, e insoluble en alcohol. Es conocido como ingrediente de los barnices desde la antigüedad, sobre todo en la cuenca mediterránea [7,18,53,73,86].

j) Dammar. Se trata de una resina triterpénica obtenida a partir del exudado de árboles de la familia del *Dipterocarpaceae*. Está compuesta principalmente de triterpenoides y de sesquiterpenos. Las moléculas presentes en mayor cantidad son: hidroxidammarenona, ácido oleánico, aldehído ursónico, dammaradienol, hidroxihopanona, ácido dammarólico y ácido dammarenólico. Al envejecer, el esqueleto del dammarano se oxida y se puede formar ocotillona. El dammar ha sido utilizado como barniz a partir del siglo XIX, por lo que aparece únicamente en objetos barnizados o rebarnizados a partir de dicha época [7,18,73].

#### 1.5.5 Características químicas de otros materiales empleados en barnices de violines

En los barnices de violines se encuentran una amplia variedad de compuestos orgánicos, además de las resinas terpénicas, como trazas del disolvente, aditivos para modificar las propiedades de la película formada (plasticidad, dureza, densidad, etc) y pigmentos que aportan la coloración adecuada.

##### 1.5.5.1 Disolventes

Los barnices se clasifican en función del disolvente utilizado en su elaboración. Existen tres grandes familias de barnices, que difieren en la naturaleza del disolvente, su comportamiento durante el secado y su papel en las propiedades finales de la capa filmógena [5]. Los líquidos tradicionalmente usados en la preparación de barnices de violines renacentistas son etanol, aceites secantes y esencias:

a) Etanol. Este disolvente se evapora rápidamente, sin dejar indicios de su uso. Así pues, se obtiene una capa muy fina, en cuyas propiedades influyen únicamente las resinas terpénicas utilizadas.

b) Aceites secantes. Se trata de líquidos compuestos por mezclas de

triglicéridos, con una elevada proporción de ácidos grasos insaturados. Estos materiales se obtienen a partir del prensado de semillas de especies vegetales, cuyas características químicas ya han sido previamente discutidas en los apartados 1.4.1 y 1.4.3. El secado corresponde a una modificación química por polimerización del disolvente, con resultados análogos a los expuestos en el apartado 1.4.4, por lo que intervendrá en las propiedades del barniz. En este caso se obtiene una capa más gruesa.

c) Aceites esenciales. Existe una amplia variedad de líquidos compuestos principalmente por mezclas de monoterpenoides y sesquiterpenoides, que se pueden clasificar dentro de esta categoría.

La esencia de trementina (aceite de trementina, aceite de pino), se obtiene a partir de la destilación de diversas resinas de *Pinus*, principalmente de *Larix decidua* [7]. Está compuesta por hidrocarburos monoterpénicos volátiles ( $C_{10}H_{16}$ ) y sesquiterpenos [66]. Las moléculas mayoritarias son  $\alpha$ -pineno (60-70%) y  $\beta$ -pineno (20-25%) [7,66-68], y también se encuentran moléculas de limoneno,  $\Delta_3$ -careno,  $\beta$ -helandreno,  $\alpha$ -mirceno,  $\beta$ -mirceno, alcanfor, borneol, isoborneol, fenchona, fenchol, mentol, timol, linalool y 1-8 cinelol [7]. Ya en el secado y sobre todo al envejecer, las moléculas más volátiles (la mayoría), se pueden evaporar. Aquellas que posean dobles enlaces pueden formar un polímero difícilmente volatilizable.

Otro disolvente utilizado es la esencia de lavanda (aceite de lavanda, “spike lavender, spike oil”), un líquido extraído del *Lavandula spica* [7]. Está compuesta de monoterpenos oxigenados y de sesquiterpenos, y sus moléculas principales son linalool, acetato de linalilo, alcanfor y éteres [7,69]. Al estar compuesta principalmente por moléculas volátiles, durante el secado y el envejecimiento del barniz tenderán a volatilizarse.

Por su parte, la esencia de romero se obtiene por extracción a partir de las hojas del *Rosmarinus officinalis* y contiene principalmente 1,8-cineol (15-55%), alcanfor (10-25%), pineno (15-25%), borneol (2%), sesquiterpenos, fenoles, canfeno, y cembreol [7, 70]. De forma general, los barnices disueltos en esencias tendrán un comportamiento intermedio a los dos anteriores.

#### 1.5.5.2 Aditivos

Los aditivos más habituales en los barnices son sustancias obtenidas principalmente de especies vegetales y se subdividen en bálsamos, ceras, oleogomorresinas, y resinas fosilizadas. Aunque de forma menos habitual, también se encuentran en ocasiones barnices compuestos por productos extraídos a partir de secreciones animales. Los materiales presentes en objetos de madera de la época renacentista son: bálsamos, ceras, oleogomorresinas, aceites esenciales, ámbar y secreciones animales:

- Bálsamos

a) Benjuí. Se trata de una resina sólida obtenida a partir de la savia del árbol *Styrax benzoin*. Está compuesta de una mezcla de alcoholes y de ácidos aromáticos y se emplea tradicionalmente en barnices disueltos en alcohol. Los benjuíes de Sumatra y de Siam se obtienen a partir de diversas especies del *Styrax*, y presentan una gran cantidad de benzoato de coniferilo. El benjuí de América del Sur se obtiene a partir del *Myroxylon balsamum* y contiene benzoato de coniferilo y benzoato de bencilo [7].

- Ceras

b) Propiolis. Esta sustancia cerosa y resinosa es extraída por las abejas a partir de las flores y la corteza de diversas especies de árboles, particularmente de coníferas, álamos y castaños. Su coloración depende del origen y la época de la cosecha por lo que se puede encontrar de diferentes coloraciones, como negro, marrón oscuro, rojo, verde y blanco. Está compuesta principalmente por productos resinosos (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%) y polen (5%). Este material es pegajoso a partir de temperatura ambiente, y por debajo de temperatura ambiente se vuelve más duro y quebradizo. Su aplicación en los barnices se debe a sus propiedades como consolidante, bactericida y fungicida.

c) Cera de abeja. Las propiedades de este material se discuten previamente en el apartado 1.3.2.

- Oleogomorresinas

Las oleogomorresinas contienen una fracción apolar constituida por un aceite esencial y por una resina, y otra fracción soluble en medios polares compuesta por oligosacáridos.

d) Resina de enebro. Se obtiene a partir de la planta leñosa *Juniperus communis*, originaria de amplias regiones del norte de Europa, América y Asia. Está compuesta por una mezcla de diterpenoides, principalmente de ácido policomúnico, y en ocasiones se ha confundido con la resina sandaraca, debido a su similar composición química [7].

e) Olíbano (franquincienso). Oleogomorresina aromática obtenida del árbol *Boswellia thurifera* o *Boswellia sacra*, de la familia Burseraceae, que crece en la península arábiga y en África occidental. Está compuesta principalmente por una mezcla compleja de terpenoides y oligosacáridos [7,71]. Este material ha sido utilizado desde la antigüedad en cosméticos y en medicinas, así como, en menor medida, en la elaboración de barnices [7].

f) Mirra. Se trata de una oleogomorresina extraída del árbol *Commiphora Abyssinica*, perteneciente a la familia de las *Burseraceae*, que

crece en Arabia y Somalia. Contiene principalmente triterpenoides, furanosesquiterpenos y oligosacáridos. Este material es conocido desde la antigüedad para la fabricación de perfumes e inciensos, pero es menos habitual en barnices de obras de arte [7,72,73].

- Aceite esencial

g) Alcanfor. Esta sustancia se obtiene a partir de la madera del árbol *Cinnamomum camphorae*. Está constituido esencialmente por alcoholes monoterpénicos, principalmente alcanfor y borneol [7].

- Resina fosilizada

h) Ámbar amarillo (ámbar báltico, succino). Este material es el resultado de un proceso de fosilización de la resina excretada por especies vegetales pertenecientes a la familia *Coniferae*. Se encuentra en estratos geológicos en la costa del mar Báltico, especialmente en Polonia y Lituania. Está compuesto principalmente por ácido succínico, el co-polímero de comunol y ácido comúnico, monoterpenoides como el borneol, alcanfor, fenchol, fenchona, y diterpenoides procedentes de la resina original, que representan alrededor del 0,4 % de la composición del ámbar. Esta resina fosilizada ha sido utilizada desde la antigüedad en joyería y en artículos de lujo. Asimismo se ha encontrado en barnices de pequeños objetos manufacturados en zonas cercanas a las costas del mar Báltico [7].

- Secreción animal

i) Goma laca (shellac). Resina de origen animal, obtenida a partir de un insecto, el *Kerria lacca* [7]. El material excretado se somete a un proceso de purificación hasta la obtención de la goma laca. Su composición química depende del entorno natural del insecto, generalmente contiene compuestos cerosos, ácidos grasos y sesquiterpenos hidroxilados, principalmente ácidos aleurítico, butolítico, 6-hidroximirístico, jalárico y laccijalárico. Las resinas de goma laca envejecidas presentan también moléculas con grupos aldehidos y grupos cetonas. Los ácidos contenidos en la resina de goma laca se convierten en ácido episheológico, epilakshólico, shelólico y lakshólico, epilaccishelólico, epilaccishólico y laccishelólico. La resina de goma laca funde hacia 115°C y es soluble en alcohol y en acetato de amilo, moderadamente soluble en éter, cloroformo y benceno, aunque poco soluble en esencia de trementina. Ha sido ampliamente empleada como barniz para todo tipo de objetos [7,73].

### 1.5.5.3 Colorantes

Los pigmentos se incluyen en los barnices con el objetivo de dar color al instrumento musical y manipular su apariencia estética. Consisten en sustancias que interaccionan fuertemente con la radiación, produciendo una coloración intrínseca muy intensa. Los pigmentos inorgánicos principalmente utilizados en barnices son el cinabrio ( $\text{HgS}$ , de coloración rojiza) y el oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ , amarillento). Estos materiales se conocen desde la antigüedad como pigmentos en pinturas murales [87], aunque han ido cayendo en desuso, debido a su ennegrecimiento a lo largo del tiempo y a su elevada toxicidad. Los pigmentos orgánicos son mezclas de macromoléculas que contienen grupos cromóforos, como fenil y dobles enlaces conjugados. Los colorantes más habituales en barnices de objetos de madera de la época renacentista son los siguientes: sangre de dragón, goma guta, extracto de cachú, laca de granza, extracto de achiote, curcuma, áloe, azafrán y palo de campeche.

#### - Secreciones vegetales

a) Sangre de dragón. Sustancia resinosa de color rojizo obtenida a partir de árboles pertenecientes a los géneros *Dracaena*, originario del norte de África y de las costas del mar Rojo, *Daemonorops*, procedente de Borneo y Sumatra, *Croton* y *Pterocarpus*. Las sustancias colorantes son la dracurubina y la drachorodina. La sangre de dragón se conoce desde la antigüedad y fue ampliamente utilizada por los romanos, griegos y árabes, en barnices, medicinas, incienso y tintes. Durante el siglo XVIII fue empleada por los *luthiers* como colorantes en barnices de violines [7, 88].

b) Goma guta (gutagamba): es una oleoresina secretada del árbol *Garcinia hanburyi*, originaria del sudeste asiático. Se obtiene efectuando cortes en espiral sobre la corteza del árbol, y acumulando la resina extraída en el interior de un cilindro de bambú hueco. El látex recogido se lleva a congelación, y tras quebrar la barra de madera, se obtiene el colorante. Este material presenta una coloración amarillenta y fue introducido en Europa a través de Inglaterra a principios del siglo XVII. La sustancia responsable del color es el ácido gambógico. Además está compuesta por un 73% de polisacáridos polares solubles en acetona, por lo que puede utilizarse directamente en aglutinantes disueltos en agua [7].

#### - Extractos vegetales

c) Extracto de cachú. Este material se obtiene a partir de la madera del árbol *Acacia catechu*, perteneciente a la familia de las Babaceas, originarias de Asia. El extracto es rico en flavonoides y taninos y el tinte presenta un

color marrón rojizo. Asimismo presenta propiedades hidrófobas y antibacterianas, por lo que protege la capa filmógena del medio ambiente [89].

d) Laca de granza (rubia de tintes). Este extracto vegetal se obtiene a partir de las raíces de la flor *Rubia tinctorum*. El colorante está constituido por una mezcla de derivados de la antraquinona, principalmente purpurina, pseudopurpurina y alizarina, y aporta una coloración rojiza. Se trata del pigmento natural más importante y ha sido ampliamente utilizado en tintes de tejidos, madera y seda [90].

e) Extracto de achiote (Achiotl, Urucú, Bija, Bijol, Roncon, Onoto). Se obtiene a partir de la cera que rodea las semillas de la planta arborecente *Bixa orellana*, originaria de las regiones intertropicales de América. El colorante es un carotenoide de color rojizo-amarillo con elevada fotosensibilidad, pero inerte frente a agentes químicos. Se utiliza principalmente como aditivo en alimentos y como tinte corporal [91].

f) Curcuma. Extracto procedente de la planta herbácea *Curcuma longa*, perteneciente a la familia de las zingiberáceas, originaria del sudeste asiático. El tinte presenta una coloración amarilla-anaranjada y se ha utilizado como colorante natural en tejidos [7].

g) Jugo de áloe. Este material se obtiene a partir de las hojas de ciertas especies del género *Aloe*, en especial del *Aloe vera*, originario de las islas del Caribe, *Aloe ferox* y *Aloe perryi*, procedentes del este y sur de África. El tinte presenta una coloración amarilla, y se ha utilizado en pinturas y decoración como pigmento. La sustancia responsable de la coloración es una antraquinona, la barbaloina, cuya concentración en el colorante es de 25 % [7].

h) Azafrán. Se trata de un extracto obtenido del estigma de la flor de *Crocus sativus*, que se utiliza para aportar una coloración amarillenta. Las moléculas causantes de la coloración son el glucósido pricocrocetin, safranal y el carotenoide crocin. Además contiene una considerable cantidad de flavonoides. El azafrán ha sido un material muy apreciado como tinte desde la antigüedad en el área mediterránea, así como por sus propiedades como perfume y condimento alimenticio, aunque poco usado debido a su elevado coste [7].

i) Palo de Campeche. Este colorante se obtiene a partir de la especie arbórea *Haematoxylum campechianum*, que crece en América central y en la península de Yucatán, en México. La sustancia colorante es la hematoxilina, que proporciona un intenso color rojo en su forma reducida, y pasa al azul al oxidarse. Debido a la diferencia de coloración según los diversos estados de oxidación, se ha utilizado para tintes con coloraciones del azul al rojo, pasando por diversos matices violeta y malva, así como grises y negros intensos. Este colorante empezó a usarse masivamente en Europa a partir del siglo XV [92].

### 1.5.6 Alteraciones experimentadas por resinas terpénicas

La alteración de los materiales que forman el barniz depositado sobre los violines consiste fundamentalmente en la evaporación de las sustancias más volátiles (etanol y monoterpenos), así como la oxidación, polimerización y degradación de la fracción más pesada (glicéridos, di- y triterpenoides) [5].

Los procesos de oxidación de las moléculas presentes en el barniz se producen a través de reacciones radicalarias. Inicialmente se originan por el ataque del oxígeno ambiental a los dobles enlaces, proceso catalizado por la humedad, la radiación y los cationes metálicos presentes en los barnices [7,53,83,84,93].

Estos procesos de envejecimiento que transcurren durante el secado del barniz pueden conducir a una variación de sus propiedades. Así pues, se produce la aparición de un número elevado de insaturaciones, las cuales pueden actuar como cromóforos, aportando al barniz una coloración amarillento-parduzca y aumentando la sensibilidad a la radiación y a los cambios de humedad. Estos procesos conducen generalmente a un debilitamiento de la estructura de la capa filmógena, produciendo cuarteamientos, grietas e incluso desprendimientos, que disminuyen su capacidad protectora y deterioran su apariencia visual [18,53,69,83,93]. Por otro lado, se aprecia en los barnices la tendencia a amarillear, como en el caso de los aceites secantes expuesta en el apartado 1.4.4.

Los procesos oxidativos de mayor importancia son las modificaciones experimentadas por los compuestos de las resinas terpénicas y los aceites secantes. El comportamiento de estos últimos ya ha sido discutido previamente. Por otra parte, la evolución de los diterpenoides depende de su naturaleza como abietanos, pimaranos o ladbanos, mientras que en los triterpenoides depende principalmente de su estructura.

#### 1.5.6.1 Mecanismos de oxidación de abietanos y pimaranos

Los mecanismos de oxidación de los abietanos, diterpenoides tricíclicos principalmente presentes en resina de *Pinus*, han sido ampliamente estudiados.

Los cuatro abietanos principales (ácido levopimárico, levopimárico, abiético, y neoabiético) presentan una elevada reactividad debido a la presencia de dobles enlaces en su estructura. Estos compuestos experimentan isomerizaciones e interconversiones, llegando en el equilibrio a una mezcla en la que el levopimárico tiende a desaparecer y el abiético es el constituyente principal [7]. La etapa siguiente consiste en la oxidación de este último para formar ácido deshidroabiético. Los mecanismos de oxidación no están claros, pero algunos autores proponen que transcurren

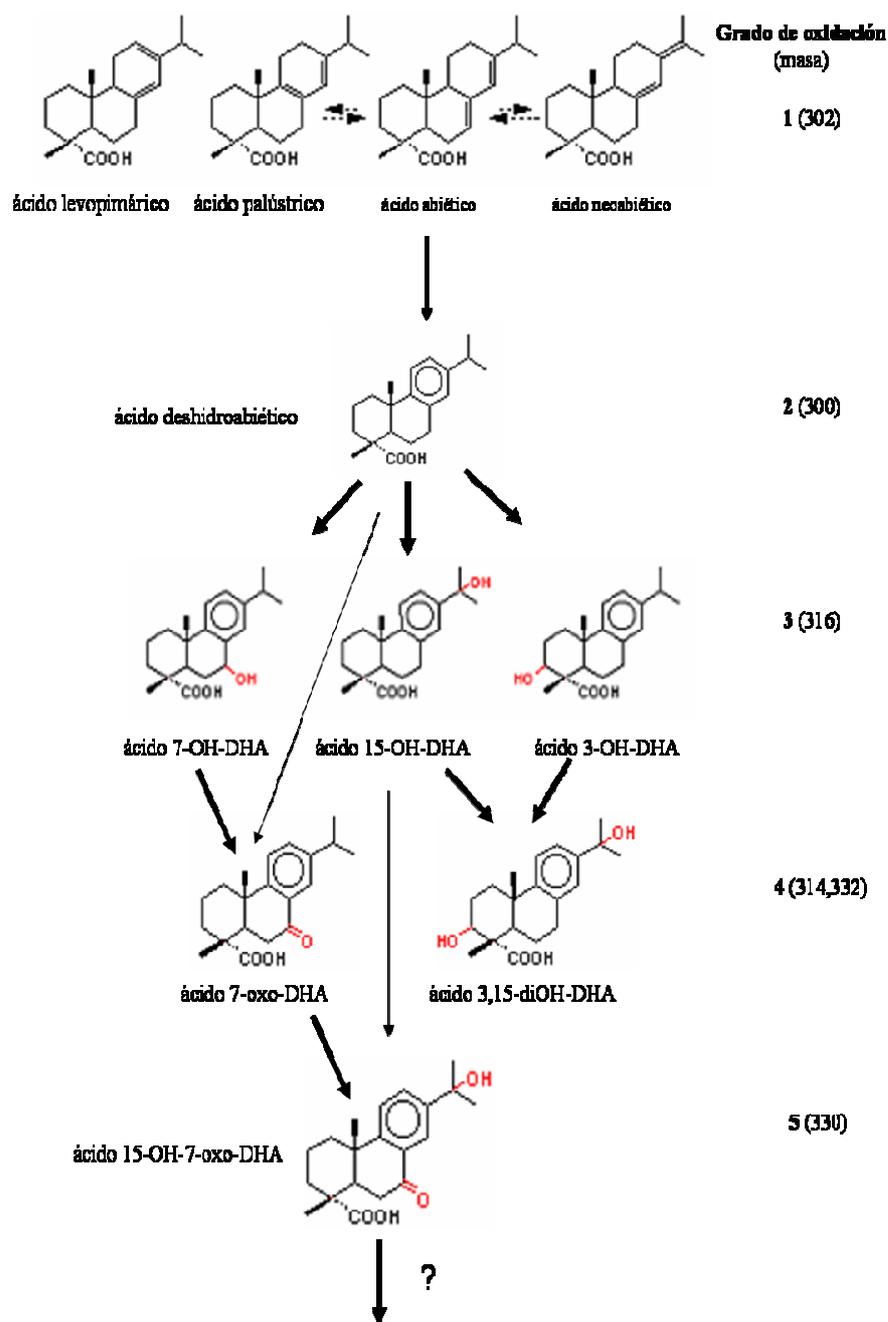
por vía radicalaria [75,83,84]. Mediante la incorporación de oxígeno al doble enlace se genera un peróxido, que se descompone formando un alcohol o cetona conjugados a una insaturación. Estos productos experimentan una deshidratación que da lugar al ácido deshidroabiético. Esta etapa del mecanismo está fuertemente favorecida, debido a la formación de un anillo aromático estable [75].

En las siguientes fases la oxidación continúa mediante un mecanismo radicalario. Los puntos más reactivos son los carbonos adyacentes al anillo bencénico, ya que el radical formado está estabilizado por deslocalización. Los compuestos más importantes producidos por la progresiva oxidación del ácido deshidroabiético son los ácidos 3-hidroxi-deshidroabiético (3-OH-DHA), 7-hidroxi-deshidroabiético (7-OH-DHA) y 15-hidroxi-deshidroabiético (15-OH-DHA). Posteriormente se forman 3,15-dihidroxi-deshidroabiético (3,15-diOH-DHA), 7-oxo-DHA y 15-OH-7-oxo-DHA [7,75,83,84,94]. Al avanzar la degradación de la capa filmógena se generan derivados aún más oxidados a través de mecanismos desconocidos, tal y como se describe en la Figura 3.

La presencia de abietanos en los estados más avanzados de oxidación es un indicativo de que la muestra es más antigua, y/o que ha sido expuesta a condiciones ambientales más agresivas [83,95].

Por su parte, los pimaranos son más estables frente a la oxidación, debido a la ausencia de dobles enlaces conjugados en su estructura. Sin embargo, se observa efectivamente la disminución de su cantidad a lo largo del proceso de envejecimiento, por lo que algunos autores constatan su participación en procesos de polimerización [7,84].

Otra serie de reacciones involucran a tanto a los abietanos como los pimaranos, los cuales experimentan aromatizaciones, desfuncionalizaciones y desmetilaciones, que conducen a la formación de productos tales como los norabietatrienos y tetrahidrorretenos, de los cuales el reteno es más estable [9].



**Figura 3.** Esquema de la isomerización y oxidación de los ácidos diterpenoides de tipo abietano.

### 1.5.6.2 Procesos de envejecimiento de los labdanos

Los labdanos son diterpenoides (ácidos y alcoholes) bicíclicos, presentes en gran cantidad en las resinas procedentes de especies vegetales de las familias Cupressaceae, Araucariaceae y Leguminosae [7].

Estas sustancias experimentan principalmente procesos de polimerización, que ocurren cuando entran en contacto con la luz y el aire. Probablemente la oxidación transcurre mediante un mecanismo radicalario, cuya iniciación tiene lugar en los dobles enlaces conjugados presentes al final de su cadena de labdanoides como el ácido comúnico, comunal y cis-abienol. El crecimiento del polímero prosigue a través de reacciones de isomerización, entrecruzamientos y ciclaciones intra- e intermoleculares, que dan como resultado una red polimérica basada en estructuras policíclicas. Los mecanismos de entrecruzamiento continúan a lo largo del tiempo, aunque están contrarrestados por reacciones de escisión en  $\beta$  y rupturas oxidativas de los dobles enlaces. Finalmente se obtiene una red polimérica basada en unidades de moléculas bicíclicas de menor peso molecular, unidos por largas cadenas alquílicas [84,95].

Por otra parte, los labdanoides que no poseen dobles enlaces conjugados resultan afectados en menor medida por el proceso de oxidación. Aun así pueden experimentar reacciones a través de las insaturaciones mediante entrecruzamientos que dan lugar a una estructura oligomérica. En otros casos se produce una pérdida de los grupos reactivos, como los ácidos agatálico y agatólico, que dan lugar al ácido 19-norlabda-8(20),13-dien-15-oico, debido a la pérdida de los grupos aldehído y carboxílico, respectivamente. Este producto sufre una reacción oxidativa de deshidrogenación, originando ácido 19-norlabda-4,8(20),13-trien-15-oico. Asimismo se producen hidrólisis que afectan a los ésteres presentes, como el ácido acetoxiagatálico, que se descompone en ácido agatólico y ácido acético [84].

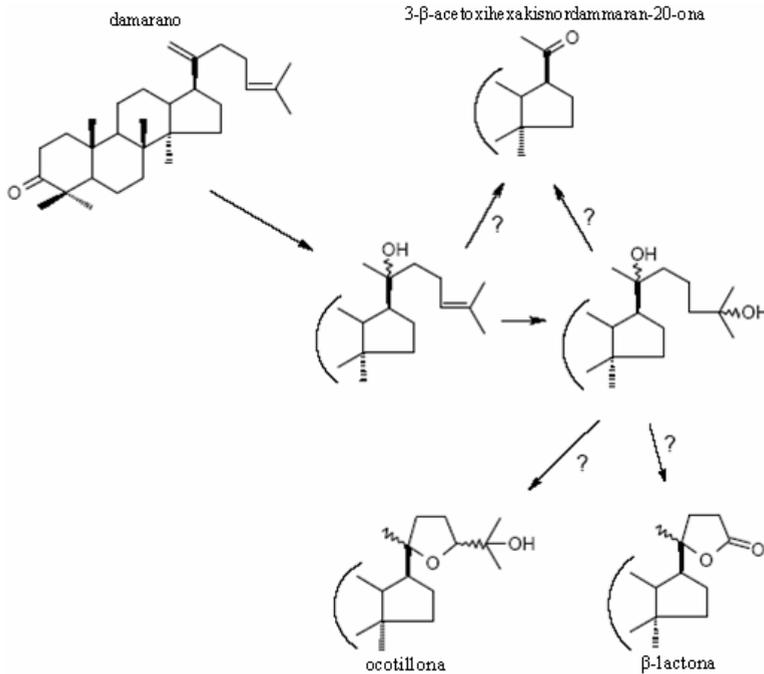
### 1.5.6.3 Mecanismos de oxidación de triterpenoides

Las resinas triterpénicas están constituidas por una mezcla compleja de sustancias, que se complica aún más tras el proceso de envejecimiento. Además, la diversidad de puntos reactivos en los esqueletos de los triterpenoides permite la formación de multitud de productos de oxidación. Las posiciones más reactivas son los carbonos terciarios y conjugados a dobles enlaces, que estabilizan los radicales generados. De forma general, se obtendrán derivados oxigenados de las sustancias originales, añadiendo grupos alcohol, carbonilo y carboxílico, así como la construcción de una red polimérica [53,81,96].

La iniciación de los procesos de fotooxidación se produce

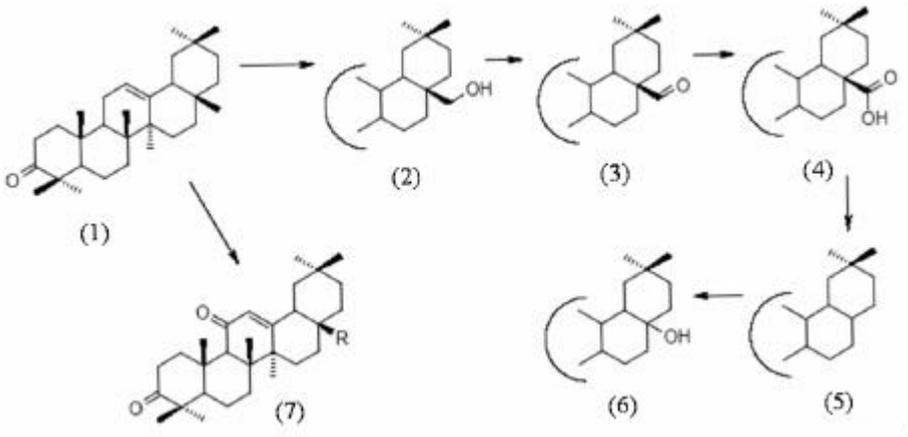
probablemente mediante la excitación de los grupos carbonilo situados en una ciclohexanona, seguido de una escisión en  $\alpha$  y de la ruptura del anillo. El radical obtenido propaga la reacción, atacando moléculas cercanas y produciendo entrecruzamientos que extienden la red polimérica [53,54,97] de forma análoga a lo expuesto en el apartado 1.4.4. El alargamiento del polímero se realiza asimismo mediante reacciones de condensación [54]. A medida que se produce el envejecimiento, el polímero aumentará su masa molecular [81].

Los triterpenoides con esqueleto de tipo damarano contienen insaturaciones, carbonilos y grupos alcohol, por lo que presentan una elevada reactividad. El proceso de envejecimiento de esta clase de sustancias se inicia mediante la oxidación de la cadena lateral, dando lugar a derivados más pesados de tipo ocotillona (anillo tetrahidrofurano) y  $\beta$ -lactona mediante mecanismos de reacción desconocidos [53,81,96].



Junto a la oxidación se produce una serie de reacciones de ruptura, cuyos intermedios son desconocidos, que conducen finalmente a la formación de moléculas de menor peso molecular, como el 3- $\beta$ -acetoxihexakisnordammaran-20-ona, y compuestos volátiles que no se quedan retenidos sobre el barniz [53,81]. Estas reacciones competirán con los entrecruzamientos y la adición de átomos de oxígeno, limitando el crecimiento del polímero y aumentando su fragilidad [53].

La primera etapa en la oxidación de las moléculas con estructuras de tipo olenano y ursano (1) consiste principalmente en la adición de un grupo hidroxilo en la posición 28. El alcohol generado (2) se oxida a su vez en aldehído (3) y en ácido carboxílico (4). Tras la posterior descarboxilación (5), se produce una hidroxilación en la posición C17 (6). Otra serie de reacciones pueden conducir a la adición de un grupo carbonilo en posición 11, conjugado a un doble enlace [53,81,98].



A causa de la adición de oxígeno en el esqueleto de los triterpenoides durante el proceso de envejecimiento, el barniz aumenta progresivamente su polaridad, por lo que puede ser necesario el uso de un disolvente más hidrofílico para retirarlo. Las propiedades mecánicas del barniz se ven alteradas por el incremento de polaridad, ya que las interacciones entre las diferentes sustancias serán más fuertes, debido a la formación de enlaces por puentes de hidrógeno. No obstante, la fortaleza de estas atracciones intermoleculares se puede ver atenuada por la entrada de humedad ambiental, llegando a resquebrajar el barniz [46]. Asimismo, al reducir la hidrofobicidad se favorece el paso de sustancias polares a través del barniz hacia las capas inferiores, exponiéndoles a la acción del agua [53].

## 1.6 Resinas sintéticas

Una de las innovaciones más importantes aportadas por la Revolución Industrial fueron los materiales poliméricos. Su uso se fue extendiendo con rapidez tras su descubrimiento en el siglo XIX, ya que resultaron muy útiles en multitud de aplicaciones, debido a la diversidad de polímeros disponibles, su versatilidad y la variedad de sus propiedades. En la actualidad se encuentran en muchos objetos de uso corriente, como tejidos, pinturas, en

barnices de muebles, obras de arte y superficies metalizadas, aislantes de la humedad, adhesivos, recipientes, embalajes, moldes, etc.

Existen tres grandes grupos de resinas sintéticas. Uno de ellos se caracteriza por que la formación de la cadena polimérica se basa en la unión de los monómeros a través de los dobles enlaces mediante reacciones radicalarias (polivinilos). En el segundo grupo, la resina polimérica se construye a través de la condensación entre grupos reactivos, en este caso se produce la pérdida de sustancias de bajo peso molecular, principalmente agua. En la tercera categoría, el polímero se extiende asimismo a través de reacciones de condensación, pero en este caso incluye grupos inorgánicos en su estructura.

En todos los casos, la reacción puede partir de una única clase de monómero, dando lugar a homopolímeros, o de una mezcla, obteniéndose copolímeros [7].

Los monómeros deben ser como mínimo bifuncionales para servir de reactivo en la síntesis de material polimérico, en cuyo caso se obtiene una cadena lineal. Por otra parte, la polimerización en cuya mezcla de partida se encuentre algún monómero polifuncional dará como producto un material con una estructura ramificada, cuyo grado de entrecruzamiento estará determinado por la proporción de monómero polifuncional inicialmente presente [7].

Las estructuras de las resinas poliméricas son relativamente poco conocidas, debido a su complejidad. Además, al haber sido desarrolladas en su mayoría por industrias, sus rutas sintéticas y modos de preparación forman parte de patentes y no se encuentran generalmente en publicaciones de libre acceso.

### 1.6.1 Descripción y características químicas de las principales resinas sintéticas

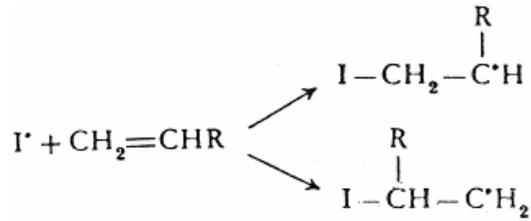
#### 1.6.1.1 Polivinilos

El descubrimiento de los polivinilos data de 1835, con la síntesis del cloruro de polivinilo. No obstante, la fabricación de estos materiales se estancó durante largo tiempo y no fue hasta 1917 cuando comenzó la producción masiva de este tipo de compuestos.

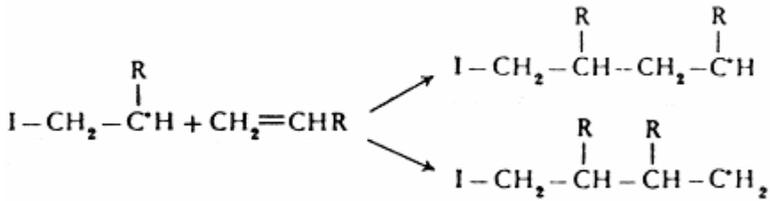
Los polímeros vinílicos están formados principalmente por unidades de hidrocarburos de cadena corta que contienen una o varias insaturaciones. La reacción de polimerización transcurre por vía radicalaria, a través de la formación de enlaces simples carbono-carbono entre los monómeros. Aunque se supone que las reacciones involucradas son semejantes a las experimentadas por los ácidos grasos poliinsaturados (apartado 1.4.4), se deduce que en este caso no existe la intervención del oxígeno, ya que no se

observa su incorporación en la estructura del polímero [7].

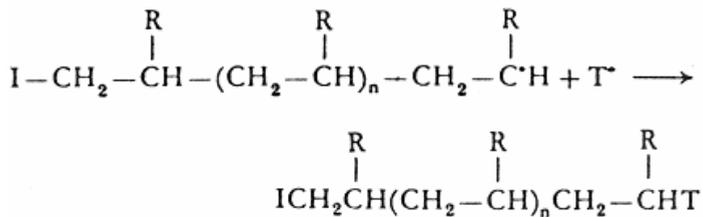
La activación de las insaturaciones se produce por la intervención de un iniciador I (principalmente persulfato de potasio), que se fija sobre el doble enlace, provocando su apertura y la formación de un nuevo radical [7].



En la mezcla de radicales originada, el derivado, cuyo electrón libre está sobre el carbono más sustituido, será mayoritario. Durante la etapa de propagación se produce el ataque del nuevo radical sobre otro monómero insaturado.



De nuevo, la adición se realizará de forma que el nuevo radical que se genere esté en la posición más sustituida. Este proceso se repetirá continuamente, causando el alargamiento progresivo de la cadena polimérica. Por último, durante la etapa de terminación, el radical polimérico atacará esta vez a otro radical (T) para obtener una molécula no reactiva, interrumpiendo el crecimiento de la resina sintética [7].



El terminador T puede ser otro radical polimérico, algún aditivo y en algunos casos oxígeno. Las condiciones de reacción (temperatura y presión), así como las cantidades de iniciador y terminador, ejercerán una notable influencia en la longitud de la cadena polimérica.

Los procesos de polimerización se llevan a cabo en medio líquido, para lo cual se prepara una emulsión de los monómeros y aditivos en una disolución acuosa. Este sistema es fluido, por lo que el aumento de viscosidad, producido por el alargamiento de la cadena, no es muy elevado, y la temperatura se mantiene bajo control. Todo ello permite alcanzar materiales con elevados grados de polimerización [7].

La naturaleza del grupo R puede resultar muy diversa, por lo que existen numerosos grupos de polivinilos.

#### 1.6.1.1.1 Poliolefinas

Las poliolefinas están constituidas por homo- y copolímeros de alquenos de bajo peso molecular, principalmente eteno, propeno, butadieno y estireno [7].

El polietileno es el polivinilo más simple, está constituido a partir de monómeros de eteno y se sintetizó por primera vez hacia 1940. Las diversas variedades comerciales del polietileno difieren en su grado de polimerización (desde 70 hasta 200.000) e incorporan éster ftálico como plastificante. El propio polímero es un hidrocarburo saturado sin centros reactivos, por lo que presenta gran inercia química y elevada hidrofobicidad. Debido a tales propiedades resulta ideal para la fabricación de recipientes aislantes de agua [7].

El polipropileno es una resina sintética obtenida a partir de monómeros de propeno y presenta características semejantes a las del polietileno. Por su parte, el poliestireno fue sintetizado por primera vez durante la primera mitad del siglo XIX, aunque su comercialización data de 1930, y su producción masiva empezó después de la segunda guerra mundial. Sus propiedades son parecidas a las de los anteriores polivinilos, aunque su hidrofobicidad es mayor, debido a la presencia del anillo bencénico. Habitualmente se encuentra en copolímeros junto a otras unidades vinílicas [7].

El copolímero de estireno-etileno/butadieno-estireno (SEBS), denominado comercialmente Kraton G [99], fue producido por primera vez en la década de los 1960. Presenta elevada estabilidad frente a la oxidación, elevadas temperaturas, radiación UV y agentes contaminantes, y es compatible con aceites minerales y otras poliolefinas. Esta resina sintética se utiliza principalmente como adhesivo y material elástico. El producto comercial Kraton G1650 está constituido por un 30% de estireno, mientras que el Kraton G1657 contiene un 13% [100].

#### 1.6.1.1.2 Resina de hidrocarburos saturada

La primera resina hidrogenada de hidrocarburos fue desarrollada por Arakawa Chemicals (Osaka, Japón), con la denominación de Arkon P90. Este material incluye en su estructura hidrocarburos alicíclicos y pentaciclos saturados [101]. Es soluble en líquidos hidrofóbicos e insoluble en alcoholes y cetonas, y presenta elevada resistencia ante las agresiones térmicas y medioambientales [102].

#### 1.6.1.1.3 Resina de cumarona (indeno-benzofurano)

La resina de cumarona es un copolímero del benzofurano (cumarona) y del indeno, de bajo peso molecular medio (alrededor de 1000 Da), muy utilizado en la industria del asfalto, del caucho y de los aislantes [103,104]. Este material es relativamente transparente, aunque tiene tendencia a amarillear, y químicamente es resistente al agua, a los ácidos, a las bases y a las sales. Asimismo presenta elevada dureza, aunque a 100°C se reblandece de forma considerable [104]. Este polímero es soluble en alcoholes, éter, esencias naturales e hidrocarburos clorados, y compatible con un amplio grupo de plastificantes [104].

#### 1.6.1.1.4 Acetato de polivinilo

El monómero del acetato de polivinilo es etanoato del enol del acetaldehído. La reacción de polimerización se produce rápidamente en presencia de iniciadores o bajo la influencia de la radiación UV. Su producción se inició hacia 1930, y en la actualidad se comercializa en forma sólida bajo las denominaciones de Mowilith, Acetato de Polivinilo (PVAc) y Palmer Cement. Estos materiales son brillantes y transparentes, y presentan elevada resistencia a la luz, al calor, al agua y a los ácidos. Asimismo de caracterizan por su capacidad adherente y por su dureza, aunque son termoplásticos y se vuelven blandos al elevar la temperatura. Debido a la presencia del grupo acetato en su estructura, posee elevada solubilidad en alcoholes, cetonas, ésteres, hidrocarburos aromáticos y cloroformo. Sin embargo es insoluble en agua, éteres y alcanos, y ligeramente hidrolizable mediante ataque básico [7,99,103,104,105].

Las propiedades de las resinas de acetato de polivinilo dependen de la longitud de la cadena. Así pues, tanto la viscosidad como la temperatura de transición vítrea y el punto de reblandecimiento aumentarán a mayores grados de polimerización [7,99,103].

#### 1.6.1.1.5 Alcohol polivinílico

El alcohol polivinílico se produce mediante la hidrólisis del acetato de polivinilo. Debido a la presencia de los grupos alcohol, esta clase de polímeros son polares, miscibles con agua y forman películas permeables al oxígeno. Asimismo experimentan reacciones de entrecruzamiento, a través de la formación de enlaces éter por reacción entre los alcoholes libres. En este caso la capa puede regenerarse mediante lavado con agua [7].

La resina de Mowital es un butiral de polivinilo, un derivado del alcohol polivinílico que se sintetiza por medio de la hidrólisis ácida del acetato de polivinilo en presencia de butanal [103]. El material resultante posee elevada estabilidad química, resistencia a la radiación, y una vez aplicado sobre una superficie proporciona una película consistente y termoplástica, cuya temperatura de reblandecimiento se sitúa en torno a los 250-230°C [99]. Por otro lado, presenta una adecuada adherencia sobre vidrio, madera y metales [106]. La solubilidad del Mowital es satisfactoria en alcoholes y éteres, mientras que es baja en agua, ésteres e hidrocarburos [104,106].

#### 1.6.1.1.6 Poliacrílicos

La denominación de polímeros acrílicos se aplica a un amplio grupo de resinas sintéticas compuestas por homopolímeros y copolímeros de ésteres de ácidos acrílico y metacrílico, principalmente metil, etil y butilderivados.

Estos materiales proporcionan plásticos y barnices transparentes de gran estabilidad química y solubles en disolventes orgánicos [45]. Los polímeros basados en ésteres con alcoholes ligeros proporcionarán materiales de una dureza y rigidez mayor y, a medida que aumente la longitud de la cadena carbonada, la resina sintética se volverá más blanda y cerosa. En general, se utilizan en la fabricación de objetos como sustituto del vidrio, debido a sus similares propiedades [7].

El poliacrílico de mayor importancia es el Paraloid, una categoría de acrílicos muy amplia, de la cual los más importantes son B44, B48N (metilmetacrilato), B66 (polibutilmetilmetacrilato), B67 (isobutilmetacrilato), B72 (etilmetacrilato-metilacrilato), B82 (etilacrilato-metilmetacrilato) y B99 (polimetilmetacrilato). Estos materiales presentan una excepcional estabilidad, la ausencia de entrecruzamientos, nula tendencia al amarilleamiento y forman una película estable [99,107]. Otros productos acrílicos ampliamente utilizados en restauración son las emulsiones de Primal AC35 y E330 (etilmetacrilatos), Plextol B500, D458, D498 (etilacrilato-etilmetacrilato), así como Elvacite 2044 y 2046 (n-butilmetilmetacrilato) [7,45].

### 1.6.1.2 Polímeros formados por condensación

Los polímeros de condensación engloban a una extensa categoría de materiales, producidos mediante el ataque nucleofílico o electrofílico entre los monómeros, generando un intermedio de reacción que se deshidrata para obtener el producto final. Las reacciones de condensación más habituales son los de esterificación, amidación, eterificación, aldólica, etc. Todas ellas están catalizadas en medio básico o ácido.

Las sustancias que experimentan este tipo de reacciones incluyen grupos reactivos polares en su estructura, como ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas, cicloéteres, cetonas, aldehidos, fenoles, etc [15]. En este caso, la polimerización sólo es posible si los monómeros incluyen dos o más grupos reactivos en su estructura [7]. Las características de esta clase de materiales varían en función de los monómeros y de las reacciones de polimerización.

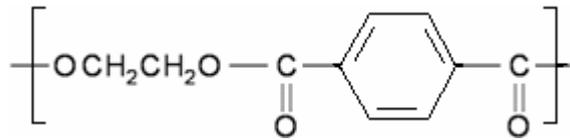
#### 1.6.1.2.1 Resinas alquídicas

Las resinas alquídicas se desarrollaron alrededor de 1930, a partir de la esterificación entre ácidos policarboxílicos y alcoholes polifuncionales. Los ácidos más utilizados para la síntesis de los productos comerciales son el ácido ftálico, isoftálico, tereftálico, así como los ácidos succínico, hidroxisuccínico, málico, tartárico, adípico, sebácico y cítrico, mientras que los polialcoholes más habituales son el etilenglicol, glicerol, pentaeritrol, hexantriol, trimetilpropanol y 1,6-hexandiol [103]. El polímero formado se modifica posteriormente mediante la adición de aceites secantes, seguido de calefacción para favorecer la transesterificación.

El producto finalmente obtenido contiene proporciones variables de aceite secante (35-70%), e incorpora asimismo algunas de sus características, en especial sus propiedades hidrofóbicas [7]. La resina sintética fresca es soluble en hidrocarburos y alcoholes, propiedad que pierde gradualmente durante el envejecimiento [106]. Las resinas alquídicas son compatibles con las resinas de la colofonia, polivinilos de estireno/butadieno, cloruro de polivinilo, acrílicos, resinas cetónicas y nitrato de celulosa [106], mientras que son incompatibles con pigmentos básicos [7].

#### 1.6.1.2.2 Poliésteres

Los poliésteres constituyen una serie de polímeros comerciales sintetizados a partir de ácido tereftálico y etilenglicol. Se caracterizan por su gran rigidez y en la actualidad se utilizan principalmente para la fabricación de cintas magnéticas [7]. En arte contemporáneo se usan combinados con fibra de vidrio para la fabricación de esculturas y moldes.



#### 1.6.1.2.3 Resinas epoxídicas

Las resinas epoxídicas se constituyen a partir de unidades monoméricas de éteres cíclicos, como la epocloridrina (1-cloro-2,3-epoxipropano) y el bisfenildifenilolpropano. La polimerización está condicionada por la iniciación, por lo que la selección del activador es clave en proceso de síntesis. Por su parte, la etapa de propagación se realiza con rapidez, debido a la inestabilidad de los éteres cíclicos. La resina obtenida forma una red polimérica entrecruzada muy estable y, debido a la presencia de los enlaces éter, ligeramente hidrofílica. Estos materiales experimentan una fuerte tendencia a amarillear, mediante procesos catalizados térmica y fotoquímicamente.

#### 1.6.1.2.4 Resinas cetónicas

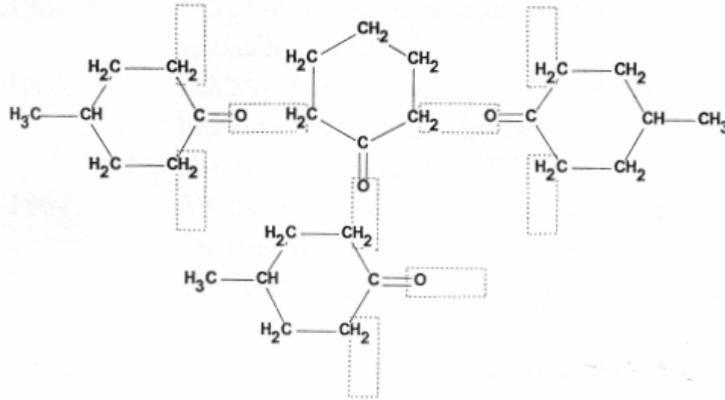
Los polímeros cetónicos están formados a partir de reacciones de condensación que involucran a grupos carbonilo. [7].

El principal grupo de resinas cetónicas está formado por polímeros basados en unidades de la ciclohexanona y sus derivados metilsustituídos.

La resina cetónica AW2, sintetizada por primera vez hacia 1930, es el producto de la condensación aldólica entre ciclohexanona y metilciclohexanona, en relación (1/3), catalizada en medio básico en ausencia de agua (Figura 4) [108].

La resina se forma por una serie de reacciones de condensación aldólica, seguida de deshidratación, que conducen a la formación de un producto final ramificado. El material resultante presenta ausencia de coloración y un fuerte brillo, así como elevada adherencia, capacidad de relleno y reversibilidad. Asimismo, posee una fuerte estabilidad ante la luz, el calor y los agentes químicos, por lo que tiene una baja tendencia a amarillear. Por otra parte, no resulta muy útil para aplicar en forma de capa filmógena, debido a su fragilidad. La resina AW2 es soluble en cetonas cíclicas, ésteres, esencias, alcanos e hidrocarburos clorados. [103,104,109].

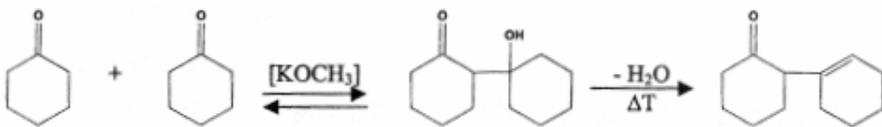
El polímero MS2, fabricado a partir de la década de los 1950, es un material sintético producido por condensación de la metilciclohexanona con hasta un máximo de 20% de ciclohexanona, o en ocasiones únicamente un homopolímero de metilciclohexanona [109].



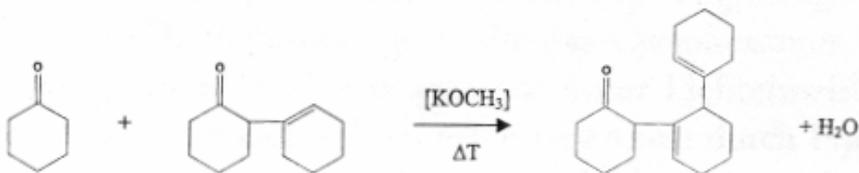
**Figura 4.** Esquema de de polimerización entre la ciclohexanona y la metilciclohexanona para dar lugar a la resina AW2.

Hacia 1960 se desarrollaron dos nuevos polímeros, fruto de la reducción e hidrogenación total del MS2 y AW2, denominados MS2-A y MS2-B, respectivamente, los cuales presentaban mejores características como barniz [109].

Por su parte, el Keton N (Laropal K80) es un homopolímero de ciclohexanona, y se produce desde 1960. El mecanismo de la síntesis de esta resina se inicia por la autocondensación aldólica del monómero, en medio  $\text{KOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  en ausencia de agua [99,103,109].



Posteriormente se produce de nuevo una condensación aldólica, entre una ciclohexanona y el oligómero anteriormente formado, seguida de una eliminación de Hoffman.



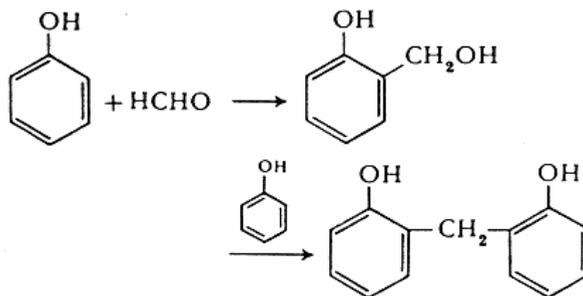
La reacción continúa de igual manera, dando lugar a oligómeros hasta grado de polimerización 12. Este material forma películas de elevada consistencia, es inerte ante álcalis, y soluble en la mayoría de medios empleados en lacas, en esencias, alcoholes, acetato de etilo e insoluble en agua. [103,109].

La resina de Laropal A81 es el producto de la condensación de la urea con aldehidos alifáticos [99]. El grado de polimerización es relativamente bajo, con unidades de masa molecular media de 600 Da [106]. Las características físicas más notables del producto obtenido son su resistencia a la dilatación térmica, fluidez, transparencia y su ausencia de coloración. Químicamente resulta inerte frente al calor y la luz, y no tiene tendencia al amarillamiento [99,103,110]. Por otra parte, la solubilidad del polímero en hidrocarburos alifáticos y alcoholes es limitada, y nula en agua [99,110]

#### 1.6.1.2.5 Resinas de fenol-formaldehido

Las resinas de fenol-formaldehido son materiales desarrollados a principios del siglo XX a partir de la condensación de formaldehído y fenol.

El primer paso de la ruta sintética consiste en la adición del formaldehído sobre el fenol (principalmente en las posición orto y para), seguido de una deshidratación. El oligómero formado puede reaccionar de igual manera con otra molécula de formaldehído, o con fenol, aumentando el grado de polimerización [7,103,104,111].



Cuando la reacción se produce en medio ácido, las unidades en el polímero resultante están enlazadas por grupos metileno. Sin embargo, en medio alcalino se establecen puentes metilol, etileno, y metileno [103]. En ambos casos, se efectúa un tratamiento por calentamiento para aumentar el grado de entrecruzamiento y la dureza [7]. El producto final es una resina sintética cuyas propiedades físicas y químicas se ven relativamente poco afectadas por el aumento de la temperatura, y soluble en aceites secantes, así como en esencia de petróleo. En este sentido se aprecian diferencias en

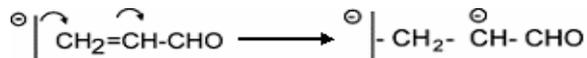
función de las condiciones de preparación, ya que los polímeros obtenidos por catálisis ácida resultan más sensibles al aumento de la temperatura, más blandos y solubles [104].

Al aplicarse sobre una superficie forma una capa aislante, consistente, dura, poco resquebrajable y resistente a agresiones químicas causadas por el agua, ácidos, álcalis y disolventes orgánicos [111].

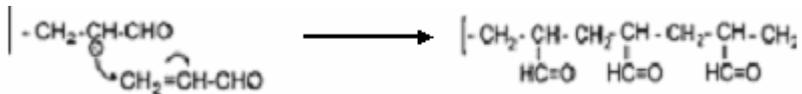
#### 1.6.1.2.6 Poliacroleínas

La estructura de esta resina sintética está basada en el acrilaldehído (propenal), cuya polimerización se produce mediante adición conjugada de los monómeros [104].

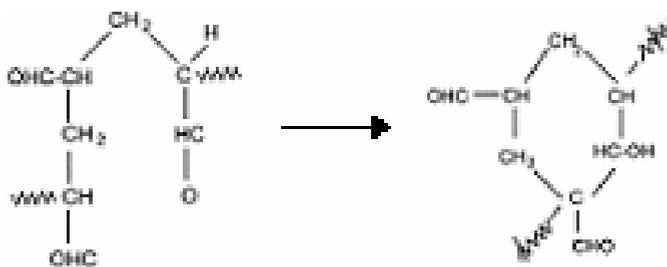
La iniciación se produce mediante ataque nucleofílico contra un doble enlace, que provoca su apertura y la formación de un nuevo anión:



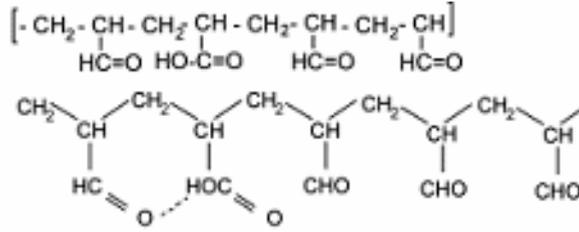
En la fase siguiente de propagación se produce el ataque al monómero, lo que causa el alargamiento de la cadena polimérica:



Sin embargo, en ocasiones la cadena experimenta procesos de ciclación catalizados por electrones:



Por otro lado, las extremidades pueden experimentar procesos de oxidación que conducen a la formación de ácidos carboxílicos, los cuales pueden establecer enlaces por puentes de hidrógeno y aumentar la rigidez de la cadena.



Las resinas de acroleína son poco solubles debido al gran número de entrecruzamientos que tiene su estructura [104,110].

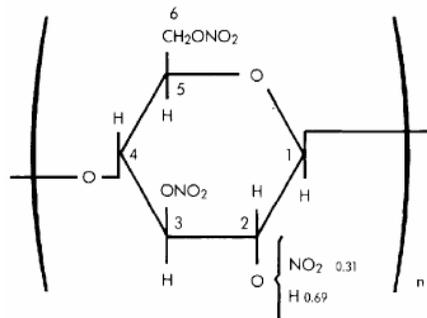
### 1.6.1.3 Resinas semiorgánicas

Las resinas semiorgánicas son polímeros de condensación cuyos monómeros consisten en compuestos organometálicos o son, posteriormente, modificados con sales inorgánicas.

#### 1.6.1.3.1 Nitrato de celulosa

El nitrato de celulosa es un poliéster inorgánico obtenido a partir de la condensación entre el ácido nítrico y los grupos de alcohol de las unidades cíclicas del polisacárido. La producción de la resina se inicia sobre el polímero natural, el cual experimenta una serie de reacciones de nitración con una mezcla de ácido sulfúrico, ácido nítrico y agua, purificación, digestión y deshidratación que conducen a la formación del producto final [112].

El polímero comercial contiene de media aproximadamente 2,3 unidades de nitrato por unidad de glucosa, lo que significa que el 50% del polímero contiene unidades de glucosa trisustituidas, 34% disustituidas y 16% monosustituidas, con un peso molecular de 20.000 y 250.000 Da [113]. Sin embargo, estos valores pueden oscilar fuertemente en función del fabricante.



Esta sustancia presenta elevada inercia química frente al agua y otros disolventes polares como cetonas y ésteres. Es soluble en disolventes medianamente polares como ésteres, alcoholes y éteres, e insoluble en esencias de petróleo e hidrocarburos aromáticos. Por otra parte resulta fácilmente atacable por ácidos y álcalis [112].

Debido a sus propiedades y a su bajo costo, se ha utilizado en multitud de aplicaciones. En un principio se limitó su uso a fines militares, debido a sus propiedades como explosivo. Por otra parte, su elevada inestabilidad la volvía inutilizable en otras aplicaciones. Más adelante se descubrió que esta propiedad era debida a la formación de ésteres con el ácido sulfúrico utilizado en la síntesis [114]. La estabilización del producto mediante la adición de alcanfor 4/1 (mezcla denominada celuloide) o a través de la purificación y eliminación de los sulfonatos [115], permitió ampliar su empleo a usos civiles. Los productos resultantes se incorporaron a la industria de la fabricación de plásticos, y desde entonces se utiliza en lacas, capas protectoras, explosivos, propulsores, tintas para impresora, así como en barnices y adhesivos [112].

#### 1.6.1.3.2 Etilpolisiloxano

La resina de etilpolisiloxano es un polímero de silicona de fórmula general  $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{SiO}]_n$ . Su síntesis parte de la reacción entre el silicio metálico y el cloruro de etilo, para obtener el intermedio  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{Cl}_2\text{Si}$ , el cual se hidroliza a  $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2(\text{OH})_2\text{Si}$ . Este último experimenta una autocondensación con pérdida de agua, que conduce a la formación de la cadena silicio-oxígeno que da soporte a la estructura del polímero. El producto resultante es un líquido muy viscoso, en forma de gel, aceite o elastómero reticulado. Debido a la estabilidad química de este enlace, el polímero es relativamente inerte frente a agentes químicos, la radiación UV y el calor. La flexibilidad de la cadena, debida a la facilidad de rotación del enlace silicio-oxígeno, otorga a la resina una baja viscosidad e independencia de las propiedades mecánicas respecto de la temperatura. Asimismo presenta una solubilidad elevada en disolventes orgánicos.

Esta clase de polímeros se utilizan ampliamente a nivel industrial debido principalmente a sus propiedades como agente sellante, antiespumante, lubricante, desmoldeador y antiadhesivo [116].

#### 1.6.2 Aplicación en obras artísticas

La historia de la aplicación de las resinas poliméricas con finalidades decorativas arranca en 1846, a partir de la síntesis del nitrato de celulosa por parte de Schönbein. Algunos años más tarde, Alexander Parkes mostró una serie de objetos manufacturados con este polímero en la Exposición

Universal de Londres. Desde entonces una amplia variedad de resinas poliméricas han sido utilizadas en el campo artístico, como materia prima en la elaboración de las obras de arte, adhesivos, aglutinantes, consolidantes, cubrientes, cohesionantes, barnices y para rellenar huecos producidos por el deterioro en objetos artísticos antiguos [6]. La amplia gama de posibilidades de uso de estos materiales se explica por su versatilidad y la gran cantidad de clases de polímeros. Sin embargo, debido a que fueron descubiertos durante la revolución industrial, sólo se encuentran en objetos artísticos elaborados o restaurados con posterioridad al siglo XIX.

Las resinas poliméricas deben reunir una serie de condiciones para su empleo en el campo de la conservación/restauración de obras de arte. En principio deben de ser fácilmente solubles en una serie de líquidos o mezclas, para favorecer su aplicación como capa filmógena sobre una superficie. Una vez en forma de barniz, deben de ser lo más estables posible contra la radiación, la temperatura y los agentes medioambientales. En principio se considera como una sustancia adecuada la que posee una duración mínima de 400 años [112]. Otros factores importantes son su elevada dureza, inercia química, propiedades físicas estables, propiedades ópticas adecuadas, así como resistencia al amarillamiento y en general al cambio de coloración, al resquebrajamiento y al deterioro de sus propiedades artísticas (como barniz, aglutinante, consolidante, adhesivo, etc) [117]. Un determinado material se selecciona, para la elaboración o restauración una obra de arte, tras comprobar sus características y teniendo en cuenta sus posibles inconvenientes.

#### 1.6.2.1 Polivinilos

##### 1.6.2.1.1 Poliolefinas y resina de hidrocarburos saturada

Las poliolefinas más simples (polietileno y polipropileno), presentan escasa aplicación en el campo artístico, ya que resultan únicamente útiles en el relleno de objetos inacabados, mediante extrusión, moldeado e inyección [7].

El Kraton G se utiliza principalmente como plastificante en resinas de Regalrez, y como aditivo para polímeros sintéticos con el objetivo de aumentar su flexibilidad, por ejemplo para permitir el ajuste elástico de una capa de barniz [99]. Por su parte, el Arkon P90 se utiliza como barniz en pinturas al óleo modernas [102].

##### 1.6.2.1.2 Resina de cumarona (indeno-benzofurano)

La resina de cumarona se utiliza para la preparación de barnices y pigmentos, y mezclado con cloruro de polivinilo o nitrato de celulosa, para

la elaboración de capas protectoras frente al agua y los agentes químicos [104].

#### 1.6.2.1.3 Acetato de polivinilo

Los acetatos de polivinilo fueron los primeros polímeros sintéticos utilizados en objetos artísticos, por ejemplo en forma de cubriente para pinturas murales orientales como tratamiento previo a su desplazamiento [118], debido a la dureza y durabilidad de la película protectora que proporciona. Asimismo se utilizan como aglutinantes, adhesivos en materiales porosos, sobre todo en madera, y como aditivos en lacas, para aumentar el brillo, la adherencia y su resistencia a la luz [7,103,105]. En ocasiones también se utilizan junto a otras resinas como poliacrílicos, resinas de fenol-formaldehído, así como con plastificantes y pigmentos, mientras que son incompatibles con los aceites vegetales [104,105].

#### 1.6.2.1.4 Alcohol polivinílico

El alcohol de polivinilo se utiliza como adhesivo cuando se precisa de un material soluble en agua. En los barnices forma una película muy poco permeable al oxígeno, la cual experimenta rápidamente reacciones de deterioro. Su principal ventaja consiste en que puede ser retirado mediante limpieza con agua junto a posibles impurezas depositadas, y renovada periódicamente con facilidad [119]. Por su parte, la resina de Mowital se emplea como aglutinante, adhesivo y plastificante, así como en la producción de lacas [99,106]. En la elaboración de vidrieras se utiliza para depositar una película entre dos capas de vidrio [104].

#### 1.6.2.1.5 Poliacrílicos

Los polímeros acrílicos se utilizan en el campo artístico como barnices y como materiales de retoque, debido a su excepcional estabilidad, la ausencia de entrecruzamientos y su nula tendencia al amarillamiento. El homopolímero de metilmetacrilato presenta considerable inercia química, pero no es útil en obras de arte debido a su rigidez y su elevada temperatura de transición vítrea [120]. Por su parte, el Paraloid B72 es el más apreciado en campo de la conservación/restauración, debido a sus propiedades filmógenas como barniz, aglutinante, consolidante y adhesivo [121].

Algunos autores consideran que las propiedades ópticas de las películas de poliacrílicos no son satisfactorias, debido a su bajo índice de refracción. Esta dificultad se ha resuelto en parte con la introducción de un polímero de fenil acrilato y metilmetacrilato [122]. Otra desventaja que presentan es su insolubilidad en mezclas apolares como esencia de petróleo,

por lo que deben ser disueltos en líquidos con una cantidad elevada de hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, el poliacrílico Paraloid B67 es soluble en disolventes polares, pero tiene una ligera tendencia a formar entrecruzamientos y a amarillear [7].

#### 1.6.2.2 Polímeros de condensación

##### 1.6.2.2.1 Resinas alquídicas

Las resinas alquídicas se utilizan como barnices sobre superficies de madera y en pinturas, principalmente como sustitutos de la mezcla copal/aceite de linaza, debido a que sus propiedades son semejantes a las de los aceites secantes. También se emplea en lacas, como adhesivo y aditivo, así como en bases para esmaltes. Sin embargo, las resinas alquídicas presentan una insolubilidad mucho mayor que los aceites secantes, por lo que ejercen una protección más eficaz sobre la capa pictórica. Por otro lado, esta característica hace que sea difícil retirar la capa filmógena sin dañar la obra pictórica, por lo que no es conveniente emplearla en conservación preventiva [7].

Los polímeros alquídicos son altamente reactivos una vez aplicados sobre la superficie de la obra de arte, debido a la presencia de insaturaciones en su estructura. El material experimenta una serie de procesos de oxidación a través de sus dobles enlaces, catalizados por la luz, la temperatura y los cationes metálicos, que conducen a la formación de entrecruzamientos, de manera análoga al envejecimiento de los aceites secantes (apartado 1.4.4 anterior). Debido a ello se obtiene una red polimérica muy hidrofóbica, resistente, elástica e insoluble [106].

##### 1.6.2.2.2 Resinas epoxídicas

Las resinas epoxi constituyen una serie de materiales muy apreciados por sus propiedades como adhesivo. En el campo de la restauración se utiliza principalmente para la reparación de vidrio, debido su polaridad y su índice de refracción. [7].

##### 1.6.2.2.3 Resinas cetónicas

Los polímeros de ciclohexanona se utilizan ampliamente en barnices y material de retoque en obras pictóricas, donde son apreciadas debido que presentan propiedades cercanas a las de las resinas de colofonia, mastic y dammar [7,103,104,109].

Los productos sintéticos AW2 y MS2 se emplearon principalmente como aditivo en lacas y en aglutinantes oleosos, ya que una vez mezclados

con aceite de linaza o de tung (madera china), se obtiene un material filmógeno con adecuada adherencia y resistencia a los agentes medioambientales. Asimismo se utilizan mezclados con otras resinas como cloruro de polivinilo, alquídicos y nitrato de celulosa [7,103,104,109]. En un principio se incluyeron en recetas para la elaboración de barnices, pero actualmente se prefieren los derivados reducidos MS2-A y MS2-B, respectivamente, por su mayor capacidad filmógena y estabilidad frente a la fotooxidación y al amarillamiento, debido a la ausencia de insaturaciones en su estructura [7,109].

El Keton N se utiliza principalmente como aditivo en lacas y en la preparación de pigmentos [99], y en ocasiones se encuentra asimismo mezclado con aceites secantes, nitrato de celulosa y caucho sintético [104]. No obstante, no resulta adecuado para barnices de obras pictóricas [109].

La resina de Laropal A81 se utiliza en la elaboración de barnices en obras pictóricas, así como en lacas y esmaltes para aumentar la capacidad de relleno, la adherencia, dureza, brillo y resistencia al amarillamiento. También se emplea como aglutinante en la preparación de pigmentos. En ocasiones se mezcla con otro tipo de resinas para modificar sus propiedades, principalmente para aumentar su brillo. Combinada con nitrato de celulosa, se obtiene un material adecuado para la preparación de capas filmógenas, que se secan rápidamente en contacto con el aire. Asimismo se utiliza como aditivo del Tinuvin 292, para aumentar su adherencia. El Laropal A81 es compatible con polímeros alquídicos, resinas epoxídicas y plastificantes [99, 103,110].

#### 1.6.2.2.4 Polímeros de fenol/formaldehido

Las resinas de fenol-formaldehido se utilizan para la elaboración de barnices en obras pictóricas debido a su resistencia a los disolventes [123], y como adhesivo [103]. Asimismo se utilizan para la fabricación de moldes y esmalte para horno utilizados para la elaboración de objetos. La resina Bakelite (obtenida por condensación catalizada por álcalis) se utiliza para imitar materiales naturales como el ámbar, debido a su color amarillo-negruzco. Asimismo resulta adecuada para la aplicación de capas aislantes y como pigmento [7,103,111]. El producto resultante de la reacción catalizada por ácidos se utiliza como sustituto del copal de Manila y de la goma laca, así como aditivo en plastificantes y en capas filmógenas de aceites secantes [103].

### 1.6.2.3 Polímeros semiorgánicos

#### 1.6.2.3.1 Nitrato de celulosa

El polímero semiorgánico nitrato de celulosa es apreciado en el ámbito de la conservación/restauración como capa protectora y adhesivo. Sus propiedades adherentes se deben a la fortaleza de las interacciones intermoleculares de los grupos polares que la componen. Asimismo presenta la viscosidad, maleabilidad, plasticidad y reversibilidad adecuadas. Por otra parte, el nitrato de celulosa proporciona capas filmógenas de rápido secado, duras y quebradizas, con un elevado índice de refracción. No obstante presenta la desventaja de ser un material poco estable, aunque tiene poca tendencia al entrecruzamiento, por lo que al aplicarlo a un objeto se debe tener en cuenta su necesaria sustitución en poco tiempo [112]. Algunos expertos rechazan su uso debido a su baja resistencia ante el calor, la radiación y las impurezas ácidas [124,125], por lo que se proponen una serie de tratamientos sobre el producto original, como la desnitración y la eliminación de las impurezas ácidas, así como la adición de un plastificante adecuado [112].

El nitrato de celulosa ha sido ampliamente utilizado en arqueología, como consolidante y adhesivo en la reparación de cerámica [126], azulejos [127], esmaltes agrietados [127,128], marfil [128], vasijas, y materiales porosos [127,129], y en menor medida para la reparación de vidrios [130]. De forma general la estabilidad del nitrato de celulosa, como adhesivo, es de alrededor de 200 años, por lo que en términos de estabilidad no resulta un material adecuado. También se utiliza en capas filmógenas de objetos metálicos, como lacas sobre plata, hierro y barnices [125] así como para realizar copias de la superficie de la obra de arte [112]. Al estar expuesto al exterior, se considera que tiene una vida media de alrededor de 150 años [112]. Por ello algunos autores desaconsejan su uso como capa protectora, prefiriendo los polímeros de tipo acrílico para recubrir plata [131] y vidrio [125], debido a su resistencia a la abrasión, protección contra el deslustre y aplicabilidad.

#### 1.6.2.3.2 Polímeros de etilsiloxano

Las resinas de polietilsiloxano se utilizan principalmente para la preparación de esmaltes, combinadas con poliésteres, poliacrílicos y alquídicos. Asimismo se depositan sobre la superficie de vidriados y cerámica, para formar una capa aislante del agua.

### 1.6.3 Mecanismos de envejecimiento de resinas sintéticas

Las resinas sintéticas son materiales susceptibles de experimentar reacciones de degradación, causadas principalmente por la luz, el calor, el oxígeno, el agua, contaminantes medioambientales y agentes microbiológicos. Las consecuencias de su actividad consisten principalmente en polimerizaciones y entrecruzamientos, así como rupturas de enlaces y la aparición de cromóforos que modifican la coloración del material polimérico [120]. En general, los cambios químicos producidos causan la alteración de la estructura y propiedades del polímero, como el color, brillo, solubilidad, adhesividad, fragilidad, etc, lo que afectará al valor artístico del objeto [45].

Las reacciones de entrecruzamiento provocan un aumento de la masa molecular media de los polímeros, disminuyendo su solubilidad, mientras que las fragmentaciones provocarán el efecto contrario. En general, los polímeros, cuya estructura está mantenida por enlaces carbono-carbono, serán más estables que los polímeros de condensación. Estos últimos serán más sensibles a los procesos de hidrólisis, que pueden afectar a los enlaces entre monómeros y reducir el grado de polimerización de la resina sintética.

La tendencia al amarillamiento se debe a la formación de dobles enlaces conjugados y carbonilos sobre las cadenas laterales, mediante una serie de mecanismos catalizados por la radiación UV, o por el calentamiento en la oscuridad [132]. Este proceso se revierte por exposición a luz, que probablemente provoca la destrucción de los grupos cromóforos [133].

Por otra parte, las resinas sintéticas también pueden verse afectadas por la degradación provocada por microorganismos, ya que la capacidad de hongos y bacterias para utilizar estos materiales como fuente de carbono y de energía, producen en general aperturas de la cadena y la descomposición del polímero. La acción de los microorganismos está favorecida por la humedad ambiental y el calor [45].

## 2. Técnicas y metodologías analíticas de caracterización

La caracterización de materiales presentes en obras de arte presenta una gran dificultad, principalmente debido a la diversidad de materias primas usadas en su elaboración y a los procesos de degradación, que pueden dar lugar a un extenso número de sustancias. Asimismo, el valor histórico habitualmente asociado a las muestras de origen artístico impone severas restricciones respecto a la cantidad de muestra disponible para su estudio. Sin embargo, a pesar de dichas dificultades, se ha desarrollado un extenso número de metodologías dirigidas a la caracterización de este tipo de materiales basadas en diversas técnicas analíticas.

La espectroscopia molecular se utiliza para el análisis de una muestra en su conjunto, lo que permite tener una idea general acerca del tipo de material presente en la obra de arte. Las dos principales técnicas espectroscópicas, infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) y Raman, se basan en los movimientos vibracionales de los enlaces intermoleculares. Su principal ventaja consiste en que se pueden estudiar y diferenciar simultáneamente los materiales que se emplean en el campo artístico.

Las técnicas separativas permiten la resolución de una mezcla de sustancias, por lo que se obtiene una mayor información acerca de la composición química de las muestras. Estas técnicas están basadas en la diferencia de diversas propiedades entre los analitos, tales como: la afinidad entre las fases para cromatografía líquida de alta resolución, el volumen hidrodinámico en cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), la movilidad en un campo eléctrico en electroforesis, y la volatilidad en cromatografía gaseosa. En este último caso se distingue entre la volatilidad intrínseca de la sustancia y la de algún derivado, que se vaporizan tras su introducción en el inyector o de sus fragmentos obtenidos por ruptura térmica mediante pirólisis.

Los aceites secantes y las proteínas son analizables por las tres técnicas separativas, mientras que para las ceras y resinas naturales se prefiere la cromatografía gaseosa. En el caso de las resinas sintéticas se suele emplear la pirólisis acoplada a la cromatografía gaseosa, debido a la estabilidad de las macromoléculas que las componen, así como a la cromatografía por exclusión de tamaño. Por su parte, FTIR y Raman se pueden utilizar para la detección de la mayor parte de materiales en obras de arte.

### 2.1 Espectroscopia de infrarrojo y Raman

Estas técnicas analíticas se aplican al análisis de muestras procedentes de obras de arte debido a su versatilidad, la posibilidad de caracterizar simultáneamente materiales de origen diverso y la posibilidad de realizar las

medidas directamente sobre muestra sólida sin procedimientos experimentales complejos. Se basan en la detección de grupos funcionales en el esqueleto molecular de las sustancias estudiadas, a partir del cual se deduce su origen. Además se trata de herramientas útiles para el estudio de los efectos del envejecimiento en los materiales, ya que este proceso suele modificar la presencia de los grupos característicos de las distintas sustancias. Estas dos técnicas se basan en parámetros físico-químicos complementarios, por lo que su empleo combinado proporciona información completa acerca de su estructura [134].

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier ha sido empleada con éxito en estudios sobre el efecto de la humedad en pigmentos y aglutinantes [135], la degradación de aceites secantes por oxidación térmica [51,136], y el deterioro de resinas sintéticas por ataque microbiológico [137], así como para la caracterización de barnices, aglutinantes y pigmentos en obras pictóricas [138], de residuos resinosos en ánforas romanas [31], y también de ceras naturales [26,139] y resinas fosilizadas [140] en objetos arqueológicos. Asimismo resulta una técnica útil para la identificación de resinas sintéticas [6,141-147]. Por su parte, la espectroscopia Raman ha sido utilizada en la detección de aceites secantes, proteínas y resinas naturales presentes en aglutinantes y barnices [148-150], así como en la caracterización de pigmentos [148-153] y de ceras naturales [154], etc. Cabe resaltar su empleo como técnica analítica en la autenticación de marfil [155] y en la determinación de la fracción orgánica de barnices de violines [156]. Ambas técnicas pueden ser acopladas a un microscopio con el objeto de comprobar la homogeneidad de las muestras [148,150,153,155,157-159].

## **2.2 Cromatografía gaseosa**

La cromatografía gaseosa (GC) es la técnica analítica más extendida en el estudio de barnices, aglutinantes y consolidantes en general, debido a su versatilidad, su elevada sensibilidad y a su considerable poder de resolución, que se basa en la diferencia de volatilidad de los analitos. La instrumentación utilizada para la cuantificación son el detector de ionización de llama (FID), y el Espectrómetro de masas (MS). Este último es el más empleado en la actualidad, debido a que tiene la capacidad añadida de proporcionar el espectro de masas, que permite la identificación de los analitos sin tener que recurrir necesariamente a patrones. La muestra se puede introducir disuelta en un disolvente adecuado, en cuyo caso los analitos se volatilizan en el inyector, o en forma sólida, mediante la introducción de la muestra en un pirolizador, donde los fragmentos obtenidos por la ruptura térmica entran en el sistema cromatográfico en fase gaseosa.

### 2.2.1 Vaporización en inyector

La aplicación de la cromatografía gaseosa precisa habitualmente de una etapa previa para obtener derivados volátiles y térmicamente estables de los compuestos presentes en la muestra. Los procedimientos de derivatización más habituales están basados en el empleo de esterificantes como el cloroformiato de etilo [74,160-166] o de metilo [9,85], diazometano [53,93], trifluoruro de boro [167-169], metanólisis ácida [170], hidróxido de trimetilamonio (TMAH) [77,171], anhídrido trifluoroacético [152,165], trimetilsulfonio [172] y agentes sililantes como bistrimetilsililacetamida (BSA) [169], la *N-t*-butilmetil-silil *N*-metil trifluoroacetamida (MTBSTFA) [18,138,173], bis-trimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA) [18,21,23,26,31,32,35,39,75,173,174], el hexametildisilazano (HMDS) [152,174] y trimetilsililimidazol [175].

Así la GC ha sido aplicada con éxito en la caracterización de numerosos componentes de capas pictóricas y barnices de las obras de arte, como los aglutinantes lipídicos [18,32,138,154,163,164,176], proteínas [138,154,161-163,176], ceras [21,23,171], ácidos biliares [166], polisacáridos [154], ámbar [177], oleogomorresinas [178,179], resinas diterpénicas [74] y triterpenoides [53,77,86,93]. Es de resaltar su aplicación al estudio del proceso de envejecimiento de materiales tales como cera de abeja [26], aceites [39,165,168,169,173,180], diterpenoides [75,175], resinas triterpénicas [85] presentes en barnices, así como en el desarrollo de un método para la supresión de la interferencia de los pigmentos en la determinación de aminoácidos [160]. Como consecuencia de este amplio estudio se ha podido establecer la caracterización de muestras procedentes de objetos arqueológicos: aceites secantes, cera de abeja, resinas diterpénicas y taninos en momias egipcias embalsamadas de la época ptolemaica [174], restos de resinas en ánforas romanas [9,31], cera de abeja en recipientes de cerámica griega [35], así como resinas y colorantes procedentes de barnices de violines renacentistas [65].

### 2.2.2 Pirólisis previa

La pirólisis-GC es una modificación de la cromatografía gaseosa, que consiste en la inclusión previa de una etapa en línea (on-line) que origina la ruptura térmica de la muestra, tras la cual los productos pirolíticos formados se introducen en el sistema cromatográfico, por lo que resulta especialmente útil cuando la muestra se compone de macromoléculas de elevado peso molecular [181]. Una de las ventajas que presenta es la ausencia de tratamientos previos largos y laboriosos, dado que la fragmentación se puede efectuar directamente sobre la muestra sólida. Sin embargo, es aconsejable bloquear los grupos polares liberados tras la fragmentación mediante una reacción de derivatización. Así pues, la mayoría de los métodos aplicados

están basados en el empleo de hidróxido de trimetilamonio (TMAH) [41,77,80,82-84,94,143,182,183], aunque diversas dificultades como reacciones secundarias que pueden dar lugar a polialquilaciones, degradaciones, isomerizaciones y compuestos nitrogenados, así como la nula reactividad con grupos hidroxilo [184], han favorecido el uso de otros modificadores como el hexametildisilazano (HDMS) [23,85,185-187], hidróxido de trimetilsulfonio [188,189] y el hidróxido de trifluorometilfeniltrifenilamonio (TMTFTH) [77,190]. No obstante, también se han desarrollado métodos analíticos en los que se propone no realizar ninguna modificación química de los fragmentos [22].

La pirólisis is-GC/MS ha resultado una herramienta analítica útil para el desarrollo de metodologías dirigidas a la caracterización de aglutinantes oleosos [143,182,188-190], ceras [22,23], resinas diterpénicas [80,185,186], triterpenoides [77,85], ámbar báltico [191] y polímeros acrílicos [187] procedentes de obras artísticas, así como para realizar estudios acerca de la degradación de los aceites secantes [41,183] y compuestos diterpenoides [82-84, 94].

Esta técnica analítica resulta adecuada para la caracterización de resinas sintéticas, ya que los polímeros no pueden ser analizados directamente por cromatografía gaseosa, debido a su baja volatilidad, y la ruptura por ataque químico presenta menor reproducibilidad que la fragmentación térmica. En ese sentido es de destacar los estudios realizados por T. Learner *et al.* acerca de la identificación de polímeros empleados en obras de arte, como acetato de polivinilo, poliacrílicos, alquídicos y nitrato de celulosa [108,141]. Asimismo, la pirólisis-GC se ha empleado para la caracterización de resinas cetónicas [193] y de urea/formaldehído [193], polímeros fenol/formaldehído y epoxídicos [194], así como resinas organosilícicas [195]. Por otra parte, ha permitido la identificación de polímeros sintéticos empleados en la restauración de murales pintados por Giotto, en la Iglesia de Scroveni (Padua, Italia), donde se detectó poliestireno, resina acrílica, acetato de polivinilo, y polifluoropolímero. La presencia de este último no había sido detectada anteriormente en restauración, mientras que no se encontraron indicios de poliisobutilmetacrilato [196].

### **2.3 Electroforesis capilar**

La electroforesis capilar basa su poder resolutivo en la diferencia de movilidad de los analitos bajo la influencia de un campo eléctrico, en un medio tamponado. Su principal ventaja consiste en la posibilidad de trabajar con reducida cantidad de muestra.

Esta técnica se ha aplicado con éxito para la caracterización de aceites secantes [197] y proteínas [198,199] empleados en obras de arte, mediante detección conductimétrica sin derivatización previa. Por otro lado, también

ha resultado útil para la identificación de ácidos diterpenoides con detector de fluorescencia, mediante una derivatización previa con 4-bromo-7-metilcumarina [200].

## 2.4 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es una eficaz técnica separativa, basada en la diferencia de afinidad de los analitos en la columna y la fase estacionaria, a partir de la cual se han desarrollado numerosas metodologías dirigidas al estudio analítico de muestras de origen diverso. Su principal ventaja consiste en la elevada cantidad de variables que influyen en su poder separativo (clase de columna, disolventes en la fase móvil, uso de gradientes, temperatura, etc) y que pueden ser optimizadas hasta alcanzar una resolución adecuada entre los analitos de la mezcla. Asimismo, para la cuantificación existe la posibilidad de emplear un amplio abanico de detectores basados en la medida de propiedades muy diversas, obtenidas mediante espectroscopia molecular (UV-Visible, fluorescencia, resonancia magnética nuclear (RMN), etc), espectrometría de masas (MS), electroquímica (conductimetría, voltamperometría), quimioluminiscencia y la desviación del camino óptico (detector evaporativo de luz dispersiva (ELSD), índice de refracción (RI)).

La cromatografía líquida es la técnica analítica más extendida en la identificación de aminoácidos. Debido a su importancia y amplia presencia en la naturaleza, se han desarrollado numerosas metodologías dirigidas a su diferenciación y cuantificación. A causa de la interacción de los analitos con los protones, habitualmente se propone el empleo de un tampón en la fase móvil. Esta técnica analiza se utiliza asimismo para la separación de ácidos grasos, basándose en la diferencia de hidrofobicidad debido a las diferencia de longitud de cadena y de insaturaciones.

### 2.4.1 Cromatografía líquida con detector de ultravioleta visible

En el campo del estudio de obras de arte la cromatografía líquida se emplea principalmente en la identificación de pigmentos orgánicos, ya que debido a sus propiedades colorantes, éstos son directamente cuantificables por UV-Visible con elevada sensibilidad [138,201-203].

La detección de aminoácidos mediante la absorción UV-Visible ha sido desarrollada en diversas metodologías [253,254,255], pero generalmente se prefiere utilizar la fluorescencia, dada la mayor sensibilidad que proporciona.

Algunos métodos analíticos proponen la determinación de ácidos grasos mediante la HPLC-UV-Visible. En este caso, se precisa una reacción de derivatización de los analitos con agentes cromóforos, para aumentar la sensibilidad y permitir su detección. Las metodologías más extendidas están

basadas en reactivos como el p-nitrobencilsulfonato, 3,5-dinitrofenil sulfonato, 2-(ftalimino)etil p-toluensulfonato [213], todos éstos precisan tiempos de derivatización superiores a los sesenta minutos; á-bromoacetofenona [214-217], á,p-dibromoacetofenona [215,216], bromuro de p-nitrobencilo [215] y p-metoxianilina [218], éste último que requiere la previa formación del cloruro del ácido carboxílico. Asimismo se emplean otros derivatizantes, como el bromuro de p-fenilazofenazilo [219] y la nitrofenilhidazina [220-223], un agente cromóforo muy utilizado en el estudio de ácidos carboxílicos porque proporciona un rendimiento elevado de la reacción y límites de detección del inferior al nanomolar [220].

#### 2.4.2 Cromatografía líquida con detector de fluorescencia

Numerosos métodos de análisis de ácidos grasos sugieren el empleo de HPLC-Fluorescencia como técnica de identificación y cuantificación. En este caso, los analitos deben ser previamente modificados con compuestos fluorógenos, que pueden acoplarse por reacción con los grupos carboxilo, debido a la baja sensibilidad intrínseca que proporcionan aquellos. En ese sentido, es de señalar el completo estudio realizado por Toyo'oka *et al.* acerca del empleo y las propiedades de una amplia colección de derivatizantes fluorescentes aplicados en el análisis de ácidos grasos por HPLC-fluorescencia. [224]. Los más utilizados se subdividen en compuestos de diazometano, hidrazinas, aminas, alcoholes, sulfonatos y alquilderivados:

a) Diazometano. El 9-(diazometil)antraceno (ADAM) [225] es un reactivo ampliamente utilizado como derivatizante fluorescente, debido a la elevada sensibilidad que proporciona (del orden de picomolar). No obstante, tiende a formar productos secundarios y se descompone con facilidad, por lo que se prefiere el 1-pirenildiazometano (PDAM) que posee más estabilidad aunque sus derivados son menos fluorescentes [224].

b) Hidrazinas. El uso de reactivos como el 7-(dietilamino) cumarin-3-carbohidrazina (DCCH), 5,6-dimetoxi-2-(4'hidrazinocarbonil fenil)benzotiazol (BHBT-Hz) [226], 2-(5-hidrazinocarbonil-2-furil)-5,6-metilendioxibenzofurano (FM-Hz) [227] y 2(5-carbonil-2-oxazolil-5,6-metilendioxibenzofurano (OM-Hz) [228], proporciona sensibilidades del orden de picomolar, aunque se emplean habitualmente para el análisis de ácidos grasos de cadena corta.

c) Aminas y alcoholes. Los reactivos más utilizados como agentes fluorescentes son las aminas 9-aminofenantreno (9-AP) [229] y dansil cadaverina (DNS-CD) [230], así como los alcoholes 9-(2-hidroxietil)carbazol [231], 9(hidroximetil)antraceno (HMA) [224] y (4-piridil)-2-tiofenmetanol (PTM) [228]. Sin embargo, dada la baja reactividad intrínseca de estos agentes, se debe incluir una etapa de activación del grupo carboxilato, consistente en la obtención del haloderivado del ácido graso [224].

d) Sulfonatos. La reacción de derivatización está basada en el desplazamiento del grupo sulfonato por parte de los analitos. Los más habituales en el análisis de ácidos grasos por HPLC-Fluorescencia son el 2-(2,3-naftalimino)etil trifluorometansulfonato (NE-OTf) [232] y el 2-(2,3-antracendicarboxidiimida)etil trifluorometansulfonato (AE-Tof) [233].

e) Haloalquilados. Los derivatizantes más habituales son los reactivos bromoalquilados, de los cuales existe una amplia gama y se utilizan para el estudio de una gran variedad de compuestos con grupos carboxilo (ácidos grasos alifáticos y aromáticos, herbicidas, barbituratos, drogas y prostaglandinas). Los reactivos principales son las quinoxalinonas, como 3-bromometil-6,7-dimetoxi-1-metil-2(1H)-quinoxanilona (Br-DMEQ) [234] y 3-bromometil-6,7-dimetoxi-1-metil-2(1H)-quinoxalinona (Br-MMEQ) [235], así como las cumarinas 4-bromometil-7-acetoxicumarina (Br-MAC) [234], 3-bromoacetil-7-metoxicumarina (Br-AMC) [236], 3-bromoacetil-6,7-dimetoxicumarina (Br-AMDC) [237], y 4-bromometil-7-metoxicumarina (Br-Mmc) [238,239,240,241,242,243]. Para todos ellos, la etapa clave de la reacción es el desplazamiento del bromuro por el carboxilato en medio básico. El uso de Br-Mmc está descrito en numerosos estudios relativos a los ácidos carboxílicos, a causa de la cuantitatividad de la reacción, el bajo límite de detección (del orden de picomolar), la elevada sensibilidad y el amplio intervalo dinámico lineal [222,242].

La detección de fluorescencia es la más utilizada para la cuantificación de los aminoácidos. No obstante, dichos analitos no presentan propiedades fluorescentes, por lo que se modifican para formar un aducto cuantificable. Se han desarrollado numerosos métodos de derivatización, que utilizan como agentes fluorescentes una gran variedad de reactivos:

a) Cloruro de carbazol-N-(2-metilacetilo) (CMA-Cl). Este reactivo reacciona con rapidez con los aminoácidos para formar derivados muy estables [256].

b) 4-Fenantrolina (fanquinona). Este agente fluorescente proporciona un amplio intervalo de linealidad, pero tiene un tiempo de derivatización muy largo, del orden de 60 minutos [257].

c) Isocianato de 7-[(N,N-dimetilamino)sulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-ilo (DBD-NCS). Los derivados formados presentan elevada sensibilidad, pero la reacción incluye un proceso de oxidación, lo que incrementa la incertidumbre del método [258].

d) 6-Amino-quinolil-N-hidroxisuccinidilcarbamato (AQC). Proporciona límites de detección del orden de nanomolar [259].

e) Naftalen-2,3-dicarboxaldehído (NDA). Este derivatizante proporciona derivados estables con un límite de detección del orden de picomolar, aunque experimentan rápidos procesos de degradación linealidad de dos órdenes de magnitud [260,261].

f) Cloroformiato de 2-(9-carbazol)etilo (CEOC). Reacciona rápidamente y proporciona elevada sensibilidad, aunque en la resolución

cromatográfica se observan interferencias entre los derivados de ácido aspártico e histidina, por un lado, y lisina y tirosina por otro [262].

g) Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl). Reacciona rápidamente en medio básico con aminas primarias y secundarias dando lugar a derivados estables, proporciona límites de detección del orden de nanomolar e intervalo dinámico lineal con tres órdenes de magnitud, aunque forman derivados poco estables con cisteína, histidina y tirosina [212,263,264]

h) O-ftalaldehído (OPA). Se trata del reactivo cuyo uso se encuentra más extendido para el análisis de aminoácidos. El OPA forma derivados en medio básico con aminas primarias a temperatura ambiente, con rapidez y cuantitatividad. Asimismo proporciona límite de detección del orden de nanomolar, intervalo lineal de tres órdenes de magnitud y resolución de la totalidad de los derivados sin interferencias en condiciones no agresivas para las columnas. Por otro lado, no forma derivados estables con la cisteína ni con aminoácidos secundarios [265,266-271]. Sin embargo, se han desarrollado diversos métodos analíticos adecuados para la determinación de aminoácidos con grupos tiol [272, 273], mientras que algunos autores proponen el empleo combinado de OPA/FMOC para la determinación conjunta de aminoácidos primarios y secundarios [263].

#### 2.4.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

El espectrómetro de masas como detector en HPLC proporciona información sobre los analitos tanto cuantitativa, a través de la abundancia de los iones obtenidos, como cualitativa, ya que el espectro de masas facilita la identificación de los compuestos. Esto representa una gran ventaja respecto a los detectores de UV-Visible y fluorescente, que únicamente proporcionan datos cuantitativos.

El análisis de compuestos diterpénicos mediante HPLC presenta una gran dificultad, debido a la similar hidrofobicidad de los diferentes isómeros de los diterpenoides. Sin embargo, se emplea habitualmente para la determinación de la cantidad total de ácidos resínicos en análisis medioambiental, utilizando un detector de espectrometría de masas [204,205].

La cromatografía líquida ha sido de utilidad para la separación de compuestos termolábiles, no analizables por cromatografía gaseosa, como es el caso de intermediarios generados durante el envejecimiento de aceites secantes y terpenoides [53,81,95]. Por otra parte, también se ha utilizado la HPLC con detector UV-Visible y acoplado a un espectrómetro de masas para la identificación de triterpenoides en muestras frescas y envejecidas [53,81].

El espectrómetro de masas como detector es de gran utilidad debido a su versatilidad, ya que permite la cuantificación directa de ácidos

carboxílicos sin necesidad de derivatización previa [205,223,244-248], y se utiliza con fines cualitativos para la determinación estructural de los aductos formados ácido graso-derivatizante [214] y como elemento confirmativo, complementario a otro detector no destructivo [217,243].

Por otra parte, diversas metodologías proponen el uso de la espectrometría de masas para la identificación de los aminoácidos. Al ser directamente detectables con suficiente sensibilidad, no se precisa de una etapa previa de derivatización. En estos casos se suelen utilizar, para la separación, fases móviles con disolventes orgánicos (contaminantes) que se volatilizan en el nebulizador enviándose directamente a la atmósfera. Además, en la detección se identifican los aductos entre los aminoácidos y los protones, y en ocasiones con moléculas de la fase móvil (amino, agua, acetonitrilo, etc), así como iones resultantes de la fragmentación de los aminoácidos. Así pues, estos procesos complican los espectros de masas obtenidos y provocan un aumento del límite de detección. Los modos de ionización más habituales son por *ionspray* (I.S.P.) [274-277] y por electronebulización (*electrospray*, E.S.I.) [255,275,276,278,279]. No obstante, en ocasiones se recurre a una etapa de modificación previa de los aminoácidos, con el objetivo de aumentar la sensibilidad [280]. Igualmente esta técnica de detección se emplea para evaluar las características de los aductos aminoácido-modificador [261,262],

#### 2.4.4 Cromatografía líquida acoplada a otros detectores

El detector electroquímico se considera otra alternativa válida para la cuantificación de ácidos grasos. Algunas metodologías de análisis proponen una medida indirecta de la señal, mediante la introducción de algún catalizador electroquímico en la fase móvil, lo que evita la necesidad de una derivatización previa [249,250]. En ocasiones se propone tratamiento previo de los analitos con algún reactivo electroactivo para aumentar la sensibilidad, empleándose para ello derivatizantes como p-aminofenol [251] y 3-bromoacetil-1,1'-dimetilferroceno [252].

La detección de aminoácidos a través de las propiedades electroquímicas ha sido sugerida en numerosas metodologías. Para aumentar la sensibilidad se propone una reacción previa de derivatización con reactivos electroactivos, como el o-ftalaldehído [281,282,283,284], 6-aminoquinolilurea [285], aunque desaconsejado por que precisa el empleo de benceno en la etapa de derivatización, fenilisocianato [254] y p-N,N-dimetilaminofenilisotiocianato [286]. Por otro lado, para evitar la etapa de derivatización y aumentar la robustez y reproducibilidad del método, se utilizan electrodos modificados con cobre [287] o con un aminoácido-oxidasa [288]. Esta última presenta además mayor selectividad, debido a la especificidad de los enzimas.

Asimismo se proponen diversas metodologías de análisis de

aminoácidos que no precisan de modificación previa, empleando detectores de quimioluminiscencia, dispersión de luz por evaporación, resonancia magnética nuclear (RMN), conductividad e índice de refracción (RI) [255].

## **2.5 Cromatografía por exclusión de tamaño**

La cromatografía por exclusión de tamaño es una técnica separativa cuya capacidad de resolución se basa en la diferencia de tamaño de las moléculas de los analitos (volumen hidrodinámico). Su uso se encuentra extendido en el ámbito del estudio de materiales poliméricos para establecer la distribución de masas moleculares. En resinas sintéticas se ha empleado para el análisis de acetato de polivinilo [206], alcohol polivinílico [207], polímeros acrílicos [208], alquídicos [209], nitrato de celulosa [210], así como de una mezcla de policiclohexanonas y de resinas urea-formaldehído presentes en barnices aplicados en procesos de restauración [211].

En el campo del estudio de obras de arte resulta muy útil para evaluar los mecanismos de crecimiento de la red polimérica durante el envejecimiento de aceites secantes [51], resinas diterpénicas [41,84], triterpenos [53, 54, 93], así como en poliacrilatos [107].

## ***IV. PARTE EXPERIMENTAL***

En este Capítulo se expone una descripción general de los materiales (patrones, muestras procedentes de obras artísticas e instrumentación), y los procedimientos experimentales aplicados para el estudio analítico de los compuestos descritos en el Capítulo anterior y alcanzar los objetivos propuestos para la presente Tesis. El trabajo realizado se distribuye de la siguiente forma: caracterización de proteínas por HPLC-Fluorescencia, diferenciación de ceras naturales mediante GC, identificación de aceites secantes por HPLC-UV-Visible y Fluorescencia, caracterización de aglutinantes proteicos y oleosos por espectrometría de masas directa, estudio de compuestos orgánicos en barnices de violines mediante GC/MS y caracterización de resinas sintéticas mediante FTIR y Py-GC/MS.

### **1. Desarrollo de un método analítico para la caracterización de proteínas empleadas como aglutinantes en obras de arte pictóricas mediante cromatografía de líquidos con detector de Fluorescencia**

La metodología experimental descrita a continuación se propone para la diferenciación entre diversas proteínas ampliamente utilizadas en el campo artístico (gelatinas bovina y porcina, huevo, albúmina y caseína), a partir de la cantidad relativa de aminoácidos, y su caracterización en muestras procedentes de obras de arte. En primer lugar se sugirió una reacción de derivatización de los analitos para aumentar la sensibilidad, y se optimizaron las condiciones de HPLC para la separación de los derivados obtenidos. Posteriormente, se establecieron las condiciones de descomposición de la proteína y extracción de los aminoácidos, los cuales fueron derivatizados y cuantificados por HPLC-Fluorescencia. Los datos obtenidos de proporción relativa de cada aminoácido se tratan mediante estudio quimiométrico para la caracterización de las proteínas.

#### **1.1 Reactivos y disolventes**

Los siguientes reactivos y disolventes se emplearon en el tratamiento previo de la muestra: o-ftalaldehido (OPA) (para análisis, Carlo Erba, Val de Reuil, France), 2-mercaptoetanol (2-ME) (para análisis, Carlo Erba) (estos reactivos se almacenaron a -20°C), etilendiamintetraacetato disódico (Na<sub>2</sub>EDTA) disuelto en tampón de amoníaco y cloruro de amonio a pH=9 (Probus, Barcelona, España), ácido bórico (para análisis, Panreac, Barcelona, España), ácido clorhídrico (HCl) 37% para análisis (Scharlau, Barcelona, España), hidróxido de potasio (KOH) (para análisis, Merck, Darmstadt, Alemania) y metanol (para análisis, Fischer Chemical, Loughborough, UK). El agua empleada (grado nanopure II) se generó en el laboratorio con un equipo de producción de agua nanopure (Sybron-Barnstead, Dubuque, IA,

USA).

Las disoluciones se preparan de la forma siguiente: 100 mg de OPA y 1,25 mL de 2-ME en 25 mL de metanol (OPA/2-ME) (esta disolución se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  en oscuridad, bajo estas condiciones es estable durante una semana). Por su parte, el tampón que forma el medio de reacción se preparó disolviendo 6,194 g de ácido bórico y 6,524 g de hidróxido de potasio en 200 mL de agua nanopure, y ajustando el pH a 10,4 mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado.

Las fases móviles empleadas para la separación cromatográfica se prepararon de forma siguiente:

- Eluyente A: se disuelven 6,084 g de acetato de sodio (para análisis, Panreac) en un litro de agua nanopure, ajustando el pH a 5,8 mediante la adición de ácido acético glacial (pureza 99,99%, Aldrich, Steindhem, Alemania). Posteriormente se añadieron 50 mL de tetrahidrofurano (THF) (grado HPLC, Carlo Erba)

- Eluyente B: metanol (grado HPLC, Carlo Erba).

## 1.2 Patrones y sustancias de referencia

Los siguientes aminoácidos (AA) patrón se utilizaron para el estudio analítico: alanina (ala), arginina (arg), asparagina (asn), ácido aspártico (asp), glutamina (gln), ácido glutámico (glu), cisteína (cys), glicina (gly), histidina (his), isoleucina (ile), leucina (leu), lisina (lys), metionina (met), fenilalanina (phe), prolina (pro), 4-hidroxi-prolina (4-OH-pro), serina (ser), treonina (thr), triptófano (trp), tirosina (tyr) y valina (val). Todos ellos fueron grado GC y adquiridos de Sigma (Saint Louis, Missouri, USA). Las disoluciones de aminoácidos se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de patrón en HCl  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Para el estudio analítico se seleccionaron las siguientes proteínas patrón: caseína, albúmina, gelatina de vaca y de cerdo, (Sigma) y proteína de huevo, que se corresponden con los aglutinantes proteicos más habituales en ténpera y temple. La proteína de huevo se preparó en el laboratorio mezclando la clara y la yema, y la mixtura obtenida sobre un portaobjetos, el cual se irradia con una lámpara fluorescente OSRAM L36/37 a 350-400 nm y 36 W durante cuatro horas a 12 cm. Por otra parte, se prepararon de la misma forma dos portaobjetos con clara y yema de huevo por separado.

## 1.3 Descripción de muestras procedentes de obras de arte

Las muestras reales se obtuvieron, con un escalpelo, a partir de la superficie de las siguientes obras pictóricas:

**Muestra 1.** Retablo de San Miguel, 1542, Vicente Maçip (Catedral de Valencia)

(mostrada en la Figura 10 A en la página 131).

**Muestra 2.** Tríptico de la Magdalena, siglo XVI, Maestro de Alzira (Figura 38 A, página 187).

**Muestra 3.** Altar de Cincorres, siglo XVI, atribuido a Bernat Serra (Figura 38 B, página 187).

**Muestra 4.** Altar del Muro de Alcoi, siglo XVII, Jerónimo Rodríguez de Espinosa (Figura 10 B, página 131).

## 1.4 Instrumentación

Los análisis cromatográficos por HPLC-Fluorescencia se llevaron a cabo utilizando un Cromatógrafo líquido Modelo 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un inyector manual (bucle 20  $\mu$ L), una bomba cuaternaria, desgasificador de vacío on-line, horno para la columna y un detector de fluorescencia. El software utilizado para controlar al equipo y visualizar los resultados fue “Agilent Chemstation, for LC, Rev. A 09.03-847”.

La resolución de la mezcla de los ácidos grasos se llevó a cabo en una columna Zorbax XBD-C18 (longitud 15 cm, diámetro interno 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, tamaño de poro 80 Å, superficie 180  $\text{m}^2/\text{g}$ , temperatura máxima 60°C, intervalo entre 2 y 9, extremo doblemente encapsulado y carga de carbono 10 %), con una precolumna con el mismo relleno, fijando la temperatura a 30°C. La composición de la fase móvil se modifica según el gradiente mostrado en la Tabla 4, circulando a 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Las longitudes de onda de excitación y de emisión se fijaron en 340 nm y 450 nm, respectivamente [271].

**Tabla 4.** Programa del gradiente cromatográfico y protocolo de limpieza.

	tiempo (min)	eluyente A	eluyente B
	0	90	10
gradiente para la resolución	12	72	28
	20	70	30
	22	65	35
	31	63	37
	35	53	47
	38	45	55
	50	35	65
protocolo de limpieza	52	0	100
	58	0	100
	60	90	10

## 1.5 Tratamiento previo de muestras y patrones

En primer lugar, las muestras se hidrolizaron para romper los enlaces peptídicos y descomponer el biopolímero proteínico. Los aminoácidos

obtenidos se derivatizan con el propósito de formar los derivados detectables por Fluorescencia. La mezcla resultante se introdujo en el sistema cromatográfico para la separación y cuantificación de los analitos.

#### 1.5.1 Hidrólisis de las proteínas

La muestra sólida (0,5-1 mg), procedente de patrones o extraídas de obras pictóricas, se introdujo en un minivial de 0,3 mL hecho de vidrio resistente al calor y a la presión, y con tapón fuertemente enroscado para evitar el escape de compuestos de su interior (Supelco, Bellefonte, PA, USA) y fue tratado con ácido clorhídrico 12 mol.L<sup>-1</sup> durante 24 horas a 110°C [162]. A continuación se evaporó el disolvente, y el residuo sólido se redisolvió en 0,25 mL de ácido clorhídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, agitando para favorecer la disolución de los aminoácidos. Esta operación se repitió tres veces, reuniendo posteriormente los extractos en un tubo Pyrex. Tras el secado a 70°C, el sólido obtenido se redisolvió en 0,2 mL de ácido clorhídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Sobre esta disolución se efectuó la reacción de derivatización.

#### 1.5.2 Procedimiento de derivatización

En un tubo Pyrex se introdujeron 0,2 mL de la mezcla de aminoácidos, 0,1 mL del tampón borato y 0,4 mL de la disolución de OPA/2-ME [271]. Tras agitación durante cuatro minutos, la mezcla se hizo pasar a través de un filtro de Nylon de tamaño de poro 0,45  $\mu$ m, e inmediatamente una alícuota de 20  $\mu$ L se inyectó en el sistema cromatográfico.

Con el objetivo de suprimir la influencia de los pigmentos sobre la cuantificación de los aminoácidos, se repitió el procedimiento, pero utilizando 0,2 mL de la disolución de Na<sub>2</sub>EDTA a pH=9, en vez de ácido clorhídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> como disolvente para los analitos. El reactivo añadido secuestra los cationes metálicos, que ya no interferirán en la determinación de los aminoácidos [160]. Este tratamiento se empleó únicamente con las muestras procedentes de obras pictóricas.

## 2. Desarrollo de una metodología analítica para la caracterización de ceras naturales en obras pictóricas a partir de su contenido en ácidos grasos e hidrocarburos mediante cromatografía gaseosa

El método analítico que se detalla a continuación permitió la diferenciación de las ceras naturales más habituales en muestras de interés artístico y arqueológico (cera de abeja, carnauba, ceresina), a partir de la cantidad relativa de alcanos lineales y ácidos grasos, y su caracterización en una muestra procedente de una obra pictórica. Inicialmente se propuso un procedimiento de derivatización de los grupos carboxílicos, con el objetivo de incrementar su volatilidad, y se establecieron las condiciones de GC para la resolución de los ácidos grasos e hidrocarburos. Posteriormente, se sugirieron las condiciones de hidrólisis de las ceras, y la extracción de los analitos. La mezcla obtenida se analiza por GC por el método analítico propuesto, tras lo que se determina la cantidad relativa de cada ácido graso e hidrocarburo. El tratamiento estadístico aplicado a los resultados obtenidos permitió diferenciar de cada cera natural patrón, y su identificación en la muestra extraída de una obra pictórica.

### 2.1 Reactivos y disolventes

Los siguientes reactivos y disolventes se utilizaron para el tratamiento previo de las muestras: cloroforniato de etilo (ECF, pureza >98%, Fluka, Buchs, Suiza), piridina absoluta (Fluka), ácido clorhídrico 37% para análisis (Scharlau), bicarbonato sódico para análisis ( $\text{NaHCO}_3$ , Panreac), cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , pureza >98%, Fischer), etanol absoluto para análisis (Fischer), acetona (grado HPLC, Carlo Erba). El agua empleada (grado nanopure II) se generó en el laboratorio con un equipo de producción de agua nanopure (Sybron-Barnstead, Dubuque, IA, USA).

Las disoluciones utilizadas se prepararon de la siguiente manera: se mezclan 0,1 mL de ECF en 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  en un tubo Pyrex (1% ECF/ $\text{CHCl}_3$ ), y se disuelve bicarbonato de sodio en agua hasta saturación ( $\text{NaHCO}_3$ /agua)

### 2.2 Patrones y sustancias de referencia

Los siguientes patrones de hidrocarburos (abreviados  $\text{C}_i\text{H}$ ) se emplearon para el estudio analítico propuesto: *n*-icosano ( $\text{C}_{20}\text{H}$ , pureza >97%), *n*-heneicosano ( $\text{C}_{21}\text{H}$ , >98%), *n*-docosano ( $\text{C}_{22}\text{H}$ , >98%), *n*-tricosano ( $\text{C}_{23}\text{H}$ , >98%), *n*-tetracosano ( $\text{C}_{24}\text{H}$ , >99%), *n*-pentacosano ( $\text{C}_{25}\text{H}$ , >99%), *n*-hexacosano ( $\text{C}_{26}\text{H}$ , >99%), *n*-heptacosano ( $\text{C}_{27}\text{H}$ , >99%), *n*-octacosano ( $\text{C}_{28}\text{H}$ , >98%), *n*-nonacosano ( $\text{C}_{29}\text{H}$ , >99%), *n*-hentriacontano ( $\text{C}_{30}\text{H}$ , >99%), *n*-tritriacontano ( $\text{C}_{33}\text{H}$ , >99%), *n*-

tetratriacontano (C<sub>34</sub>H, >97%), n-pentatriacontano (C<sub>35</sub>H, >99%), todos ellos reactivos patrón para GC y suministrados por Fluka, así como n-triacontano (C<sub>30</sub>H, >99%) y ndotriacontano (C<sub>32</sub>, >97%), estándar para GC, y adquiridos de Sigma. Se preparó asimismo una disolución que contiene 1 mmol.L<sup>-1</sup> de cada hidrocarburo en cloroformo.

Los ácidos grasos (FA) patrón que se enumeran a continuación se utilizaron para el estudio analítico: ácido mirístico (C<sub>14</sub>), palmítico (C<sub>16</sub>), esteárico (C<sub>18</sub>), araquídico (n-icosanoico, C<sub>20</sub>), behénico (n-docosanoico, C<sub>22</sub>), lignocérico (n-tetracosanoico, C<sub>24</sub>), todos ellos pureza 99% para GC (Aldrich), así como ácido oleico (C<sub>18</sub>:1, pureza GC, Fluka), y ácido cerótico (C<sub>26</sub>, pureza >95). Se preparó una disolución de 1 mmol.L<sup>-1</sup> de cada ácido carboxílico disolviendo la cantidad adecuada en etanol, seguido de calentamiento para favorecer la disolución de los analitos más hidrofóbicos (lignocérico y cerótico).

Los patrones de ceras naturales seleccionados para el estudio analítico fueron: cera de abeja (origen animal), carnauba (vegetal) y cerasina (mineral), obtenidas en forma sólida a partir de RCM (Productos de conservación, Barcelona, España).

Con el objetivo de evaluar la influencia de la degradación de las ceras naturales en su caracterización, éstas se sometieron a un tratamiento de envejecimiento acelerado por irradiación UV. Para ello se disolvió la muestra sólida en cloroformo, y se extendió posteriormente sobre un portaobjetos, el cual se irradió empleando una lámpara OSRAM L36/37 a 350-400 nm y 36 W, durante cuatro semanas a una distancia de 12 cm [18].

### 2.3 Descripción de la muestra extraída de una obra de arte

La muestra real se obtuvo a partir de la superficie de una obra pictórica de Carmen López (México) en 2003 (*Muestra 5*), perteneciente al Instituto de Restauración del Patrimonio, Universidad Politécnica de Valencia. Se trata de una oleoresina en tabla de 20 x 20 cm. La toma de muestra se realiza por triplicado, en el ángulo de la pintura, donde se encuentra mezclada con un pigmento rojo.

### 2.4 Instrumentación

La instrumentación utilizada fue un cromatógrafo gaseosa Hewlett-Packard 6890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA), con detector de ionización de llama. La temperatura del inyector se mantiene a 250°C, mientras que la del detector se fijó en 300°C. La separación cromatográfica se realizó a través de una columna capilar de sílice fundida TRB-1701, 14% ciano-propil-fenil-silicona (longitud 30 m, diámetro interno 0,25 mm, y 0,15 ìm de espesor de película). La temperatura inicial fue de 100°C, y se aplicó

un gradiente de  $40^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  hasta  $275^{\circ}\text{C}$  ( 4,5 min), temperatura que se mantuvo durante 25 minutos, hasta elución completa de los analitos [165]. El gas portador utilizado fue una corriente de helio circulando a un caudal constante a  $1,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , produciendo una presión en la cabeza de columna de 115 kPa.

El volumen inyectado fue  $1,5\ \mu\text{L}$ , con un divisor de flujo de 1/20.

## 2.5 Tratamiento previo de muestras y patrones

Las ceras naturales y las muestras reales se someten a hidrólisis ácida para liberar los ácidos grasos de los ésteres, los cuales se modifican con etilcloroformiato para obtener los derivados etilados de cada ácido graso para incrementar su volatilidad. Posteriormente, la mezcla de hidrocarburos y derivados de los ácidos carboxílicos se analiza por GC, obteniendo las intensidades de los picos cromatográficos correspondientes a cada analito.

### 2.5.1 Tratamiento de las muestras de ceras naturales

La muestra sólida (0,5-1 mg), patrón o procedente de una obra pictórica, se introdujo en un minivial de 0,3 mL (descrito en el apartado 1.5.1), donde se añadió 0,1 mL de HCl  $12\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . La mezcla se calentó a  $110^{\circ}\text{C}$  en estufa durante 16 horas, tras lo que el disolvente se evaporó [163,165]. Tras enfriamiento, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de agua y 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó para favorecer la extracción. Los ácidos grasos y los hidrocarburos permanecieron en la fase orgánica, la cual se separó y se introdujo en un minivial. Después de evaporar el disolvente, el residuo sólido se sometió al protocolo de derivatización descrito en el siguiente apartado.

### 2.5.2 Procedimiento de derivatización de los ácidos grasos

Una cantidad de 100  $\mu\text{L}$  de la disolución que contiene la mezcla de ácidos grasos se introdujo en un microvial y se desecó en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el residuo sólido obtenido se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de etanol/piridina (4:1), se añadieron 8  $\mu\text{L}$  de ECF, se agitó vigorosamente y se sometió a ultrasonificación durante 10 s. Después se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de la disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y 50  $\mu\text{L}$  de ECF 1% en  $\text{CHCl}_3$ . Los derivados formados de los ácidos grasos se extrajeron en la fase orgánica, de la cual 1,5  $\mu\text{L}$  se introdujo en el sistema cromatográfico [163,165].

### 2.5.3 Análisis de hidrocarburos y ácidos grasos patrón

Para comprobar el tiempo de retención se inyectó en el cromatógrafo gaseosa directamente 1,5  $\mu$ L de la disolución clorofórmica que contiene una mezcla 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  de los siguientes hidrocarburos: n-eicosano, n-heneicosano, n-docosano, n-tricosano, n-tetacosano, n-pentacosano, n-hexacosano, nheptacosano, noctacosano, nonacosano, ntriacontano, n-hentriacontano, n-dotriacontano, n-tritriacontano, n-tetratriacontano y n-pentatriacontano.

Con el propósito de establecer los tiempos de retención de los etilésteres de los ácidos grasos, se introdujo en un minivial 0,1 mL de la disolución en etanol 1  $\text{mmol.L}^{-1}$  de los siguientes analitos: ácido mirístico, palmítico, oleico, esteárico, araquídico, behénico, lignocérico y cerótico. Tras evaporar el disolvente, el residuo obtenido se trató como se indica en el apartado 2.5.2.

### 3. Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización de aceites secantes en obras de arte mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector de absorción UV-Visible y Fluorescencia

A continuación se expone la metodología analítica empleada en el estudio comparativo sobre la diferenciación de los aceites secantes más comunes en pinturas al óleo (aceite de linaza, nuez y adormidera) por HPLC-UV y fluorescencia, y su caracterización en muestras procedentes de pinturas al óleo. En primer lugar, se propuso la derivatización de ácidos grasos patrón para incrementar las propiedades absorbivas o fluorescentes, así como la optimización de las condiciones cromatográficas para separar y cuantificar adecuadamente los derivados formados. Posteriormente se sugirió un procedimiento para liberar y extraer los ácidos grasos de la matriz de triglicéridos. Para comprobar el efecto del deterioro en la composición de los aceites secantes, se tomaron patrones frescos y envejecidos. Los valores obtenidos de proporción relativa de ácidos grasos permitieron la discriminación entre las diversas clases de aglutinantes lipídicos y su caracterización en muestras extraídas de obras pictóricas.

#### 3.1 Reactivos y disolventes

Los siguientes reactivos y disolventes fueron utilizados para el tratamiento previo de la muestra: 2-nitrofenilhidrazina (2-NPH), (pureza > 97%, Aldrich), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrociorada (1-EDC.HCl) (grado síntesis, Merck), piridina absoluta (Fluka, Buchs, Suiza), 4-bromometil-7-metoxicumarina (Br-Mmc) (pureza >97%, Aldrich), éter 18-corona-6 (pureza 99,5%, Aldrich), hidrogenocarbonato de potasio (pureza 98%, Aldrich), ácido clorhídrico 37% para análisis (Fischer), hidróxido de potasio para análisis (Scharlau, Barcelona, España), etanol absoluto para análisis (Fischer), metanol para análisis (Carlo Erba), n-hexano para análisis (Fischer), acetonitrilo grado HPLC (Carlo Erba), acetona (para análisis, Scharlau). El agua empleada (grado nanopure II) se generó en el laboratorio con un equipo de producción de agua nanopure (Sybron-Barnstead, Dubuque, IA, USA).

Las disoluciones de reactivos preparadas fueron: HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> en agua, KOH 15% p/v en metanol/agua (80:20 v/v), 2-NPH 0,02 mol.L<sup>-1</sup> en acetonitrilo/ácido clorhídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> en metanol (50:50 v/v), 1-EDC.HCl 0,25 mol.L<sup>-1</sup> en etanol con 3% de piridina, Br-Mmc 0,11 g/100 mL en acetona y éter 18-corona-6 0,07 g/100 mL en acetonitrilo. Las dos últimas se almacenaron a 20°C en la oscuridad.

Los siguientes disolventes se emplearon en la preparación de las fases móviles para la separación cromatográfica: metanol grado HPLC (Carlo

Erba), propanol grado HPLC (Scharlau), agua nanopure, ácido acético glacial (pureza 99,99%, Aldrich).

### 3.2 Patrones y sustancias de referencia

Los ácidos grasos (FA) utilizados en el estudio analítico fueron: mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), araquídico (C20), todos ellos pureza >99% (Aldrich, Saint-Louis, MO USA) y oleico (C18:1), pureza GC, suministrado por Fluka.

Se preparó una disolución de ácidos mirístico, palmítico, oleico y esteárico  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cada uno de ellos en etanol, así como una disolución de ácido araquídico  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  en etanol.

Las muestras patrón seleccionadas para el estudio analítico correspondieron a los aceites secantes más habituales en obras pictóricas: aceite de linaza, nuez y adormidera, (Kremer Pigmente, Aichstetten, Alemania). Con el fin de comprobar el efecto de la degradación de los aceites secantes sobre la composición de los aceites frescos, tres muestras de patrones se extendieron sobre un portaobjetos y se sometieron a tres tratamientos de deterioro:

- Envejecimiento acelerado térmicamente: la lámina de vidrio se introdujo en una cámara climática Dycometal DI-110 a  $50^{\circ}\text{C}$  con humedad relativa de 40% durante cuatro semanas [289].
- Envejecimiento acelerado por irradiación UV: la muestra se irradió con una lámpara fluorescente OSRAM L36/37, a 350-400 nm y 36 W a una distancia de 12 cm durante cuatro semanas [18].
- Envejecimiento natural: los portaobjetos se almacenaron durante 5 años a temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  sin efectuar ningún tratamiento [163].

### 3.3 Descripción de muestras procedentes de obras de arte

Las muestras procedentes de obras de arte se obtuvieron por erosión cuidadosa con un escalpelo sobre las capas superficial y pictórica (en áreas deterioradas) de las siguientes obras pictóricas elaboradas al óleo:

**Muestra 6.** Crucifixión, óleo sobre canva, siglo XVII, anónimo aunque atribuido a Tintoretto (Museo Mariano, Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia).

**Muestra 7.** Santa Teresa, siglo XVIII, anónimo (Museo Mariano, Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia).

**Muestra 8.** Santa Marta, siglo XVI anónimo (Museo de la Villajoyosa, Alicante).

**Muestra 9.** Obra inclasificada muy deteriorada, siglo XVI, Yañez de la Almedina (Catedral de Valencia).

- Muestra 10.** Obra inclasificada muy deteriorada, siglo XVI, Yañez de la Almedina (Catedral de Valencia).
- Muestra 11.** La Virgen intercede en presencia de la Trinidad, 1655-1726, Palomino, (Museo Mariano, Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia).
- Muestra 12.** Boceto del lienzo bocaporte del nicho de la Virgen, 1942-1943, Ramón Stolz, (Museo Mariano, Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia).
- Muestra 13.** La Virgen de los Desamparados entre ángeles que portan baldaquino y niños inocentes con velas, siglo XVI, pintura al óleo sobre panel (Museo Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia).
- Muestra 14.** La Virgen de los Desamparados, anónimo (Museo Mariano Basílica de la Virgen de los Desamparados, Valencia) (Figura 26, página 163).

### 3.4 Instrumentación

El estudio analítico de aceites secantes mediante HPLC-UV-Visible se llevó a cabo en un Cromatógrafo líquido Modelo 1100 (Agilent Technologies, Wald-brom, Alemania) equipado con un inyector manual (bucle 20  $\mu$ L), una bomba isocrática y un detector de absorbancia UV-Visible en onda variable. La separación de los ácidos grasos se efectuó en una columna Zorbax XDB-C8 (longitud 15 cm, diámetro interno 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, tamaño de poro 80 Å, superficie 180  $\text{m}^2/\text{g}$ , temperatura máxima 60°C, rango de pH=2-9, extremo doblemente encapsulado, carga de carbono 7,5 %). El software empleado para controlar el equipo y visualizar los resultados fue “Agilent Chemstation for LC, Rev. A 08.03-47”. La fase móvil empleada fue una mezcla metanol/agua/n-propanol/ácido acético (80/14/5/1), circulando a 1,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  a temperatura ambiente. Para la detección se fijó la lectura a 400 nm.

El análisis de ácidos carboxílicos por HPLC-Fluorescencia se llevó a cabo mediante la instrumentación y fase estacionara expuestas en el apartado 1.4 de este Capítulo. La composición de la fase móvil se modifica según un gradiente, desde metanol/agua (90/10) hasta (100/0) en 25 minutos y manteniendo durante 10 minutos, circulando a 1,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Las longitudes de onda de excitación y de emisión se fijaron en 325 nm y 395 nm, respectivamente.

### 3.5 Tratamiento previo de muestras y patrones

En primer lugar, las muestras se someten a hidrólisis con el objetivo de liberar los ácidos grasos de los triglicéridos de los aceites secantes, los cuales

se derivatizan posteriormente para ser detectables, en su caso, por absorción UV-Visible o Fluorescencia. La mezcla resultante se inyecta en el sistema cromatográfico para su resolución y cuantificación de los analitos.

### 3.5.1 Hidrólisis de los aceites secantes

La muestra sólida (0,5-1 mg), procedente de patrones y muestras se introdujo en un microvial de 0,3 mL (Supelco, Bellofonte, USA), se añadieron 0,1 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> y se calentó posteriormente la mezcla a 110°C durante 24 horas [163]. Después de enfriar, se adicionaron 0,25 mL de n-hexano, y a continuación se agita para favorecer la extracción. Esta etapa se repitió tres veces, tras lo que las fases orgánicas obtenidas se vertieron en un tubo Pyrex (Bibi Sterilin, Staff, UK), tras lo que el disolvente se evaporó por calentamiento a 70°C. El residuo sólido obtenido se somete al proceso de derivatización adecuado.

### 3.5.2 Formación de los derivados absorbentes de los ácidos grasos

La mezcla de ácidos grasos obtenida en el tubo Pyrex se disolvió en 0,1 mL de etanol, y se añadieron posteriormente 0,1 mL de la disolución prepara de 2-NPH y 0,2 mL de 1-EDC.HCl [219,221,222]. La mezcla se calentó en un horno de microondas (Firstline, 2450 MHz, 1300 W), donde además se introdujo un vaso de precipitados de 250 mL de agua, a 20 % de potencia (260 W), durante 6 minutos. Seguidamente se añadieron 50 ìL de la disolución de KOH 15%, y se volvió a calentar la mezcla bajo las mismas condiciones durante 3 minutos. Posteriormente se vertieron 50 ìL de la disolución de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup>, con el objetivo de acidificar la disolución resultante. Por último, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante dos minutos, se filtró y se enfrió con agua corriente. La disolución resultante se hizo pasar a través de un filtro de Nylon de 0,45 ìm y se introdujo directamente en el sistema cromatográfico una alícuota de 20 ìL de la disolución obtenida.

### 3.5.3 Formación de los derivados fluorescentes de los ácidos grasos

En el tubo Pyrex donde se encontraban los ácidos grasos se añadió una punta de espátula de KHCO<sub>3</sub> en polvo, así como 0,25 mL de Br-Mmc y 0,1 mL de éter 18-corona-6 [215,224]. A continuación la disolución se calentó en baño de agua a 55°C durante 25 minutos en ausencia de luz [215]. Posteriormente, se diluyó la mezcla con 0,25 mL de acetona y se hizo pasar a través de un filtro de Nylon de 0,45 ìm para separar la suspensión formada por el KHCO<sub>3</sub> y se introdujo en el sistema cromatográfico una alícuota de 20 ìL de la disolución resultante.

#### **4. Desarrollo de una metodología de caracterización de aglutinantes proteicos y oleosos mediante espectrometría de masas por infusión directa**

La metodología analítica que se presenta a continuación se empleó para la identificación de proteínas y aceites secantes mediante infusión directa en un espectrómetro de masas, sin etapa de derivatización o separación previa. En este caso se propone el empleo de los perfiles aminoácidos y los perfiles de los ácidos grasos obtenidos tras la hidrólisis de las proteínas y aceites secantes, para la identificación de aglutinantes proteicos y oleosos, respectivamente. Posteriormente, los dichos perfiles obtenidos se tratarán estadísticamente para diferenciar entre los diversos patrones, y caracterizar el aglutinante presente en las muestras extraídas de obras pictóricas.

##### **4.1 Reactivos y disolventes**

Se utilizaron los siguientes reactivos y disolventes para el tratamiento previo de las muestras: ácido clorhídrico 37 % para análisis (Scharlau), hidróxido de potasio (para análisis, Merck), metanol (grado HPLC, Carlo Erba), etanol absoluto para análisis (Fisher), n-propanol (grado HPLC, Scharlau) y n-hexano (grado análisis, Fisher Chemicals). El agua empleada se generó en el laboratorio, con un equipo de producción de agua nanopure (Sybron-Barnstead, Dubuque, IA, USA).

Se prepararon las siguientes disoluciones: HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> en agua nanopure, KOH 240 mmol.L<sup>-1</sup> en n-propanol y KOH 40 mmol.L<sup>-1</sup> en n-propanol.

##### **4.2 Patrones y sustancias de referencia**

Se utilizaron los siguientes aminoácidos (AA) patrón para el estudio analítico: alanina (ala), arginina (arg), ácido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), cisteína (cys), glicina (gly), histidina (his), isoleucina (ile), leucina (leu), lisina (lys), metionina (met), fenilalanina (phe), prolina (pro), 4-hidroxiprolina (4-OH-pro), serina (ser), treonina (thr), triptófano (trp), tirosina (tyr) y valina (val) (grado GC, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA). Las disoluciones de AA se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de patrón en HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> en agua nanopure.

Los ácidos carboxílicos (FA) empleados fueron: caprílico (C8), láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16), oleico (C18:1) y esteárico (C18). Las disoluciones de ácidos grasos se prepararon disolviendo la cantidad apropiada de analito en KOH 40 mmol.L<sup>-1</sup> en n-propanol/metanol 85/15.

Las proteínas seleccionadas para estudio analítico fueron los patrones

expuestos en el apartado 1.2 de este Capítulo, mientras que los aglutinantes oleosos fueron los aceites secantes envejecidos naturalmente, y mediante tratamiento acelerado térmicamente y por irradiación UV, tal y como se detalla en el apartado 3.2 del presente Capítulo.

### 4.3 Descripción de las muestras procedentes de obras de arte

La toma de muestra se realizó con ayuda de un escalpelo sobre zonas deterioradas de las obras pictóricas de manera a tomar parte de la superficie junto a la capa pictórica.

Las obras de arte seleccionadas fueron pinturas decoradas en témpera o temple citadas en el apartado 1.3 y al óleo descritas en el apartado 3.3 de este Capítulo como Muestras 6, 11, 12, 13, 14, así como de las siguientes:

**Muestra 15.** Escultura de San Juan en madera policromada, fechada en los siglos XVI-XVII, anónimo (Gran Tarajal, Tenerife).

**Muestra 16.** Retrato de Santa Teresa, al óleo, siglo XVII, anónimo, (colección privada).

**Muestra 17.** Murales decorados al óleo en la c pula de la Iglesia de Nuestra Señora del Remedio de Málaga, siglo XVII, anónimo.

**Muestra 18.** Colección de pinturas en la Capilla del Ecce Homo, óleos sobre lienzo adheridos al muro, siglo XVIII, anónimo) Pego, Comunidad Valenciana, España) (Figura 36 A, página 185).

**Muestra 19.** Techo policromado de la Cámara Dorada en la edificio de la Lonja de Valencia, de 18 x 7,20 m que consiste en 670 piezas doradas y policromadas, Juan del Poyo, Bartolomé Santal nea, Julián Sancho, Juan y Andrés Can n, Domingo Mínguez, Antonio Gerau, 1418-1461 (Figura 36 B, página 185).

### 4.4 Instrumentación

El estudio analítico de proteínas y aceites secantes se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas HP1100, provisto de una trampa de iones, con carga máxima  $3 \times 10^4$  cuentas y tiempo máximo de recolección de 300 ms, equipado con un electronebulizador (ESI). Se empleó n tr geno del 99,99% de pureza como gas nebulizador y como gas secante (Generador GasLab NG LCMS20, Equiclen, Madrid, España).

Para el análisis de proteínas la disolución de aminoácidos se infundió con un caudal de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  mediante el empleo de una jeringa impulsada por una bomba de jeringa (KD Scientific, Holliston, MA, USA). Los parámetros instrumentales fueron los siguientes: presión del nebulizador 25 psi, temperatura  $250^\circ\text{C}$ , flujo de gas  $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , voltaje del capilar 3,5 kV. El espectro de masas se registró entre 50 y 300  $m/z$ , en modo ion positivo,

enfocando a 90  $m/z$ , y los datos se adquirieron en 1 minuto.

En el estudio de aceites secantes, la mezcla de ácidos grasos, previamente extraídos, se introdujo en el nebulizador a través de un capilar de sílice fundida (Supelco, Bellefonte, PA, USA) de longitud 80 cm y diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ , dado que se observó que quedaban retenidos en el tubo previamente empleado en el caso de las proteínas. La infusión se realizó empleando un equipo de electroforesis (HP 3D, Agilent Technologies), aplicando una presión externa de 2 bar. El líquido envolvente fue una mezcla de ácido acético 0,1 % en agua/metanol 50/50 circulando a 4  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de trabajo del espectrómetro de masas se fijaron en: presión del nebulizador 25 psi, temperatura 200°C, flujo del gas de secado 5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , voltaje del capilar 3,5 kV, los voltajes de las máscaras de la trampa iónica fueron de 1; 2; -26,8 y -6 V, respectivamente [290]. El detector realizó un barrido entre 100-400  $m/z$ , enfocando a 255  $m/z$ , en modo ion negativo. Para cada medida, los datos se adquirieron durante 3 minutos, para reducir la influencia en el resultado final de posibles oscilaciones de la señal.

#### 4.5 Tratamiento estadístico de los datos experimentales

Los datos experimentales se analizaron estadísticamente mediante un método de análisis supervisado de datos, el Análisis Discriminante Lineal (LDA). Esta herramienta quimiométrica permite la construcción de un modelo capaz de pronosticar la pertenencia de una muestra a una categoría previamente definida, a partir de sus variables predictoras [291].

El modelo de LDA se construye a partir de un conjunto de muestras de categoría conocida, denominado conjunto de entrenamiento. La asignación de categoría debe de ser exhaustiva e inequívoca. Una vez se obtiene el modelo, éste se utiliza para la predicción de la categoría de pertenencia de las muestras de categoría desconocida.

La matriz de datos del conjunto de entrenamiento es de dimensiones  $n \times p$  (siendo  $n$  el número de muestras y  $p$  las variables predictoras) que se agrupan en  $k$  categorías. La capacidad clasificatoria del LDA se basa en un algoritmo que calcula unas funciones discriminantes (DF), a partir de la combinación lineal de las variables originales normalizadas (VN), que maximizan la varianza entre categorías (máxima separación entre grupos), a la vez que minimizan la varianza en el interior de las categorías (máxima compactación inter grupo).

El factor supervisor del modelo es la lambda de Wilks ( $\lambda_w$ ) que se define como:

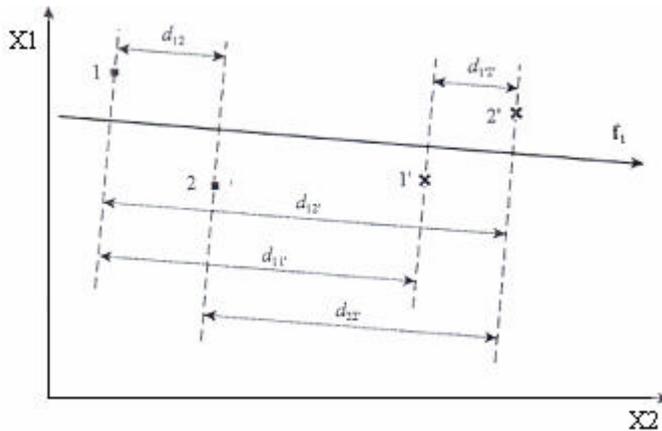
$$I_w = \frac{S_{\text{intra}}}{S_{\text{inter}}}$$

Donde  $S_{intra}$  y  $S_{inter}$  representa la varianza total de casos dentro de cada categoría y entre diferentes categorías, respectivamente. La optimización del modelo de LDA repercute en la minimización del factor  $\hat{\epsilon}_w$ .

La primera DF es la que mejor diferencia a los grupos (Figura 5), y sucesivamente cada nueva función discriminante es la que proporciona una discriminación superior entre las categorías. Las funciones discriminantes son ortogonales entre ellas. El número de DF obtenidas se corresponde con el número de variables originales o de categorías menos uno, seleccionándose el valor inferior. El modelo proporciona los coeficientes estandarizados ( $a_{DF;VN}$ ), los cuales indican el peso que cada variable ejerce sobre cada función discriminante:

$$DF_1 = a_{1,1} VN_1 + a_{1,2} VN_2 + \dots + a_{1,N} VN_p$$

Las funciones discriminantes sustituyen a las variables originales como indicadores de las características de los objetos, y proporcionan una mayor información acerca de su pertenencia a las diversas categorías.



**Figura 5.** Construcción de la primera función discriminante para diferenciar entre 4 objetos pertenecientes a dos categorías.

La representación gráfica de los objetos estadísticos en el espacio de las funciones discriminantes, los mostrará agrupados por categorías. El gráfico de puntuaciones se traza habitualmente sobre dos o tres primeras funciones discriminantes.

Para pronosticar la pertenencia de un determinado objeto a una de las categorías, se calcula el valor de las puntuaciones para cada función discriminantes, y el modelo le asigna la categoría cuyo centroide se encuentra a menor distancia. En la representación gráfica, la muestra de

categoría desconocida aparece junto a los demás casos de su categoría.

Las variables originales consideradas para la construcción del modelo se controlan mediante un algoritmo de selección por pasos. La entrada de una variable en el modelo se produce si disminuye el valor de  $\bar{e}_w$  de forma significativa, utilizando el test F de Snedecor con un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ , y a su vez otra variable original sale del modelo si su exclusión no aumenta el factor supervisor significativamente, bajo un nivel de significación de  $\alpha=0,1$ . La selección se detiene cuando ninguna variable cumple los criterios de entrada o de salida.

El análisis estadístico por LDA se llevó a cabo mediante el empleo del software SPSS (v.12.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

En el marco del estudio analítico propuesto, las abundancias relativas de cada aminoácido o ácido carboxílico y como variables predictoras las originales una vez normalizadas; las categorías serían cada tipo de proteína o de aceite secante; mientras que como objetos estadísticos se toma cada réplica analizada de las muestras.

#### **4.6 Tratamiento previo de muestras y patrones**

Las muestras patrón y procedentes de obras artísticas se sometieron a una hidrólisis previa para descomponer las macromoléculas (proteínas y triglicéridos), y obtener sus unidades básicas (aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente). Posteriormente éstos últimos se extrajeron en el medio adecuado, y se introdujeron directamente en el espectrómetro de masas, sin efectuar ninguna etapa derivatización o de separación.

##### **4.6.1 Aglutinantes proteicos**

La muestra sólida (0,5-1 mg), procedente de patrones o muestras reales se hidrolizó en medio ácido, tal y como se destalla en el apartado 1.5.1 de este Capítulo. El sólido obtenido se redisolvió en 1 mL de HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> y 1 mL de etanol. A continuación la mezcla se infundió directamente en el espectrómetro de masas.

##### **4.6.2 Aglutinantes oleosos**

La muestra sólida (0,5-1 mg), procedente de patrones y muestras reales, se introdujo en un microvial de 0,3 mL y 1 cm de diámetro (Supelco), al que se adicionaron 170  $\mu$ L de KOH 240 mmol.L<sup>-1</sup> en n-propanol y 30  $\mu$ L de metanol. Posteriormente la mezcla se calentó en placa calefactora hasta completa evaporación del disolvente. El sólido restante se acidificó por adición de 0,2 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> y los ácidos grasos se extrajeron con 0,2 mL de n-hexano. Tras la evaporación del disolvente

orgánico, el sólido obtenido se disolvió en 170  $\mu$ L de KOH 40  $\text{mmol.L}^{-1}$  en n-propanol y 30  $\mu$ L de metanol. La mezcla se agitó en baño de ultrasonidos durante 2 minutos para favorecer la solubilidad de los analitos, y a continuación se infundió directamente en el espectrómetro de masas.

## **5. Caracterización de los constituyentes de barnices de violines y laúdes italianos de la época renacentista mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas**

A continuación se detalla la metodología analítica que se aplicó para la caracterización de compuestos orgánicos en barnices de instrumentos de cuerda mediante GC/MS. En primer lugar se estudió una colección de materiales descritos como ingredientes en recetas de barnices, para obtener los tiempos de retención y espectro de masas de los compuestos principales. Para ello se propuso un procedimiento de derivatización de las muestras, consistente en la transesterificación de los grupos carboxílicos, para aumentar la volatilidad de las sustancias ácidas, así como un segundo protocolo de silylación de alcoholes para favorecer su detección. Posteriormente, se analizaron las muestras de capas filmógenas que recubren la superficie de tres instrumentos de cuerda italianos del Renacimiento y a partir de los compuestos detectados se propuso una hipótesis sobre los materiales utilizados en su elaboración.

### **5.1 Reactivos y disolventes**

El reactivo empleado para la derivatización fue hidróxido de (m-trifluorometilfenil)trimetilamonio  $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$  en metanol (Meth Prep II, Alltech, Paris, France), y N,O-bis[trimetilsilil] trifluoroacetamida + trimetilclorosilano 99/1 v/v, (BSTFA + TMCS) (Alltech).

Los disolventes utilizados fueron: diclorometano (para análisis, >99,5%, Sigma) y piridina (para análisis, >99,0%, Sigma).

### **5.2 Materiales de referencia**

La selección de los materiales de referencia se realizó a partir de un minucioso estudio de recetas de barnices de objetos de madera, elaboradas en Italia, Francia y Alemania, fechadas entre los siglos XIV-XVIII, así como de recetas modernas de barnices tradicionales. Los materiales utilizados en el estudio analítico fueron seleccionados a partir de los nombrados un número mayor de veces en las recetas consultadas. El dammar se añadió a la lista pese a que no aparece en barnices renacentista, debido a su amplio uso en rebarnizados del siglo XIX.

Los ingredientes finalmente considerados para el estudio analítico fueron los siguientes: aceite de trementina y de lavanda (Prolabo, Paris, Francia), colofonia (tres muestras con diferente grado de envejecimiento), trementina de Venecia, (HMB, Paris, Francia), una segunda muestra de trementina de Venecia, benjuí, dos muestras de copal de Manila, cinco muestras de goma laca con diferentes grados de purificación (blanca,

platinada, platinada descerada, cereza y komerlack) y dammar, obtenidos de Art & Conservation, Paris, Francia, (estas sustancias se encontraban almacenadas en el Laboratorio del Museo de la Música de París durante más de diez años), alcanfor, dos tipos de sandaraca y mastic (procedentes de la colección botánica del siglo XIX, del Centro de Investigación y Restauración de los Museos de Francia, muestras envejecidas naturalmente y de origen desconocido).

Los aceites esenciales y la trementina de Venecia se presentaron en estado líquido, y el resto de los materiales patrón son sólidos.

### 5.3 Descripción de los instrumentos de cuerda analizados

Las muestras procedentes de instrumentos de cuerda se tomaron, con ayuda de una lupa binocular y erosionando cuidadosamente con un escalpelo, a partir de la superficie barnizada de tres instrumentos de cuerda pertenecientes a la Colección del Museo de la Música de París (descritos a continuación y mostrados en la Figura 6). Los violines fueron previamente observados bajo luz visible y ultravioleta, para evitar que la muestra tomada provenga de una zona rebarnizada o reparada. En todos los casos se extrajo la menor cantidad de barniz posible, y en un área donde no afecte sus propiedades estéticas.

**Muestra V1.** Se trata del laúd occidental más antiguo que se conoce [292], y fue fabricado entre 1529-1559 en Bologna (Italia), por el *luthier* Laux Maler. Su longitud es de 809 mm. La caja de resonancia tiene 9 lados y mide 510 mm, mientras que la caja mediana tiene una anchura de 288 mm. La tabla está compuesta por madera de *Picea excelsa*. Probablemente, el barniz sea el original.

El laúd está almacenado y no se encuentra expuesto públicamente en el museo (número de inventario E.2005.3.1.).

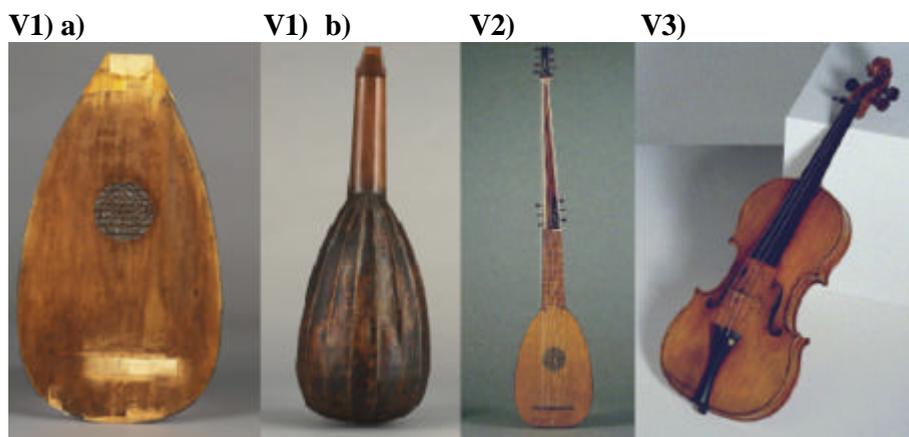
**Muestra V2.** Tiorba (instrumento musical de cuerda parecido al laúd pero de grandes dimensiones) fabricada en Padua (Italia), en 1606 por el *luthier* Wendelio Venere. Su longitud total es de 1941 mm. La caja de resonancia, de 620 mm de longitud y 413 mm de ancho, tiene 35 lados de madera de tejo (*Taxus bacata*), separados por redes de madera de color claro, y está protegida por una capa de ébano. La tabla armónica está constituida por dos partes de madera de *Picea abies*, mientras que el caballete está hecho de madera dura tintada de negro (no original). El mango es de madera resinosa y está chapado con madera de *Piratinera guianensis* en la parte posterior, con dos haces de siete tiras de marfil. La placa de teclas está fabricada en palisandro de río (*Dalbergia nigra*). El enclavijado doble es de madera de color claro (probablemente tilo), chapado con madera de *Piratinera guianensis* en la superficie, con dos tiras de marfil por el borde. El barniz se

encuentra en buen estado y es seguramente el original.

La tiorba se encuentra actualmente en exposición pública (número de inventario E.548).

**Muestra V3.** Violín “Sarasate”, fabricado en 1724 en Cremona (Italia), por el *luthier* Antonio Stradivarius. Su longitud total es de 598 mm y la caja de resonancia mide 358 mm. El fondo está compuesto por dos placas de madera de arce, decorado con ondas crecientes hacia el exterior. La tabla superior está formada por dos partes de madera de picea, cuyas venas se ensanchan hacia el borde. Las bridas son de madera de arce ondulada, mientras que las teclas, el cordelero y el botón están fabricados en ébano, y las clavijas en palisandro. El mango original se alargó con un calzo, una barra y un montaje durante el siglo XX. El barniz es de color anaranjado, causado por la presencia de partículas de HgS [59]. En la caja de resonancia aparece una etiqueta impresa, con el siguiente texto: “Antonius Stradivarius Cremonensis/Faciebat Anno 1724”, seguido de “A+S”. Otra inscripción en el clavijero indica “P.S.”.

El violín está actualmente en exposición pública (Número de inventario E.1729).



**Figura 6.** Imágenes de los instrumentos musicales estudiados: V1) laúd de Maler, a) vista parcial anterior, b) vista posterior; V2) tiorba de Venere; V3) violín de Stradivarius.

## 5.4 Instrumentación

La instrumentación utilizada fue un cromatógrafo de gases HP 5890 (Agilent Technologies, Inc), acoplado a un espectrómetro de masas QCG con trampa de iones (Thermo-Finnigan Inc, Waltham, MA, USA). La separación cromatográfica de los analitos se realizó a través de una columna capilar CP-5 Sil de bajo sangrado/MS, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película). El gas portador fue una corriente de helio a un flujo constante de 1,3 mL.min<sup>-1</sup>.

La temperatura del inyector del GC se fijó en 300°C. La temperatura inicial del horno fue de 40°C, mantenida durante 1 min. Posteriormente se aplica un gradiente de 10°C.min<sup>-1</sup> hasta llegar a 180°C, y a partir de ahí otro a 4°C.min<sup>-1</sup>, hasta alcanzar los 325°C, temperatura que se mantiene durante 8 minutos. La ionización de los analitos en el espectrómetro de masas se produjo bajo condiciones estándar a 70 eV. El detector midió por ciclos de 1 s, realizando un barrido de 50 a 850 *m/z*. El software Xcalibur 1.4 (Thermo-Finnigan) fue empleado para la integración de los picos cromatográficos y la visualización de los espectros de masas.

El volumen inyectado fue de 1  $\mu\text{L}$ , en modo sin división de flujo.

## 5.5 Procedimiento experimental

Los materiales de referencia patrón sólidos se pulverizaron en un mortero de ágata, y se tomó una pequeña cantidad de muestra patrón para los análisis, mientras que en el caso de los líquidos se tomó una gota con un cuentagotas. En las muestras heterogéneas, se seleccionaron las zonas de color más claro. Por su parte, las muestras reales se dividieron en dos, tomando una única parte para su estudio analítico.

La primera etapa del tratamiento de muestras consistió en una transesterificación/metilación de los analitos, y a continuación el producto obtenido se sometió a una segunda reacción para obtener los derivados sililados.

Las muestras se introdujeron en un microvial, al que se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de Meth Prep II en el caso de las muestras patrón, y 50  $\mu\text{L}$  para las muestras reales. La mezcla se calentó durante 16 horas en una estufa a 80°C, y tras enfriar se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. El líquido se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno a 40°C. El sólido remanente se disolvió en 200  $\mu\text{L}$  de diclorometano en el caso de las muestras patrón o en 5  $\mu\text{L}$  para las muestra procedentes de los instrumentos de cuerda. Por último, 1  $\mu\text{L}$  de la disolución se analizó por GC/MS, mientras que el resto se reservó para la siguiente etapa de derivatización.

Para la sililación se introdujeron 50  $\mu\text{L}$  de la alícuota metilada, en el caso de los patrones (4  $\mu\text{L}$  para las muestras reales), y se evaporó el

diclorometano a 40°C bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo sólido se redisolvió en 50 ìL de BSTFA+TMCS y 5 ìL de piridina (para las muestras de barnices 20 ìL y 2 ìL, respectivamente). La mezcla se calentó en placa a 70°C durante 15 minutos, y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos, tras lo que el derivatizante se evaporó a 40°C bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente el sólido resultante se disolvió en 50 ìL de diclorometano en el caso de muestras de materiales de referencia y 4 ìL para las muestras reales. En ambos casos, 1 ìL de la alícuota sililada se utilizó para el análisis. La comparación de los cromatogramas obtenidos antes y después de la sililación permite establecer la presencia de grupos hidroxilo en moléculas correspondientes a picos cromatográficos desplazados.

### **5.6 Interpretación de los espectros de masas**

La interpretación de los espectros de masas obtenidos se realizó a través de la comparación con los datos bibliográficos, así como con bibliotecas de espectros NIST y Wiley.

Los picos cromatográficos más importantes obtenidos a partir del análisis de cada uno de los materiales de referencia se almacenaron para la construcción de un banco de espectros de masas adecuado al estudio realizado. Posteriormente, la comparación entre los espectros de masas de los picos cromatográficos obtenidos al analizar las muestras reales y los almacenados en la biblioteca, permitió la identificación de las sustancias presentes en los barnices de los instrumentos de cuerda estudiadas, y emitir hipótesis acerca de las resinas utilizadas en su elaboración.

## **6. Caracterización de resinas sintéticas utilizadas en obras de arte modernas mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas con pirólisis previa**

La metodología analítica detallada a continuación se propuso para la caracterización de polímeros sintéticos por pirólisis-GC/MS. La muestra sólida se introduce en el pirolizador directamente sin tratamiento previo ni derivatizante. El estudio de los pirogramas obtenidos a través del análisis de los patrones permite establecer los fragmentos que caracterizan cada polímero sintético. Finalmente, el método propuesto se aplicó a muestras procedentes de una obra pictórica moderna. A partir del correspondiente pirograma se obtuvo la información para caracterizar la resina polimérica utilizada, así para proponer la presencia de diversos aditivos.

### **6.1 Patrones**

Los polímeros sintéticos utilizados para el estudio analítico, junto a sus características físicas, proveedor y número de inventario se detallan en la Tabla 5. Todos ellos pertenecen a la Colección de Materiales de Referencia almacenada en el Doerner Institut, Bayerische Staatgemäldesammlungen, Munich, Alemania, organismo encargado de la restauración, conservación y mantenimiento de las obras depositadas en las Pinacotecas del Estado de Baviera.

### **6.2 Descripción de las muestras procedentes de obras de arte**

Las muestras procedentes de obras de arte se tomaron con un escalpelo a partir de una pintura sobre lienzo del pintor alemán Baselitz "Senta", 1992/1993, (100,5 x 71 cm), perteneciente a la Bayerische Staatgemäldesammlungen, Munich, Alemania, con número de inventario 1785. La toma de muestra se realizó en la superficie de una zona cercana al marco. Las dos réplicas se tomaron de dos zonas coloradas con un pigmento acrílico en azul y negro, respectivamente.

### **6.3 Instrumentación**

La instrumentación utilizada para el estudio analítico fue un montaje compuesto por un Pirolizador de punto de Curie Pyromat V.1.08 (GSG Meß- und Analysengeräte, Bruchsal, Alemania), conectado a un Cromatógrafo de Gases 6890N (Agilent), acoplado a un espectrómetro de masas MSD, 5975C Inert mass (Agilent). La separación cromatográfica se realizó a través de una columna capilar HP 5MS de bajo sangrado con relleno de (5% fenil)metilpolisiloxano, dimensiones: 30 m de longitud, 250 µm de diámetro

**Tabla 5.** Características de las resinas poliméricas analizadas y origen.

resina	aspecto	color	proveedor (año)	número de inventario
<b>polivinilos</b>				
<b>poliestireno</b>				
Kraton G 1950	trozos pequeños (gomoso)	blanco	desconocido (1996)	90.39.09
Kraton G 1957	esferas pequeñas (duras)	blanco	desconocido (1998)	90.39.10
<b>resina de hidrocarburos saturada</b>				
Arkon P90	trozos pequeños	blanco	desconocido (1998)	90.39.12
<b>resina de indeno-benzofurano</b>				
cumaronas	trozos y polvo (homogéneo)	marrón	desconocido	90.39.3
<b>acetato de polivinilo</b>				
Mowilith 20	trozos pequeños y polvo	blanco	Fa (Hoest)	90.39.17.1
Mowilith 30	trozos pequeños	blanco	desconocido ( 1984)	90.39.17.2
Mowilith 40	esferas pequeñas (duro)	blanco	desconocido ( 1984)	90.39.17.3
Mowilith 50	esferas pequeñas (duro)	blanco	Kremer Pigmente	90.39.17.4
PVAc AYAA	trozos	blanco	Constr. Mat. Ltd. (Brooklyn) (1988)	90.39.8.1
PVAc AYAF	esferas pequeñas	blanco	Constr. Mat. Ltd. (1987)	90.39.8.3
PVAc AYAT	esferas pequeñas	blanco		90.39.8.4
PVAc AYA	trozos	blanco		90.39.8.2
Palmer Cement	compacto	transparente incoloro	desconocido	90.39.19.1
<b>Butiral de polivinilo</b>				
Mowital B20H	polvo	blanco	desconocido ( 1980)	90.39.18.1
<b>Poliacrílico</b>				
Paraloid*	muy viscoso	rojo	Berkes	no tiene
Pigmento de titanio con base acrílica	en tubo (pastoso)	blanco	Golden Acrylics	18.11.1
<b>Polímeros de condensación</b>				
<b>Alquílicas</b>				
Alkyd	líquido solidificado	amarillo	Kremer Pigmente	90.39.15
<b>Resinas cetónicas</b>				
AW2	polvo	blanco	desconocido	90.39.13
AW2	compacto	rojo	desconocido	90.39.14
Keton N	pastillas	amarillo claro	Museo Estatal de Baja Sajonia (Hannover)	90.39.16
Laropal A81	esferas pequeñas (duro)	blanco	desconocido	90.39.11
<b>Fenol-formaldehído</b>				
Resina Fenólica	trozos grandes	negro	desconocido	90.39.6
Resina Fenólica	cristales y polvo	rojo-marrón	desconocido	90.39.4
<b>Poliacroleína</b>				
Akroid	trozos y polvo (homogéneo)	rojo	Bender y Hobein (München)	90.39.1

\*resina líquida, el resto son materiales sólidos

interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película, y temperatura máxima de 325°C. El gas portador fue una corriente de helio a un flujo constante de 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (15  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ). El modo de inyección fue sin división de flujo.

La cámara del pirolizador está inicialmente a 200°C y la pirólisis se realiza a la temperatura seleccionada durante 10 s. La temperatura del inyector se fijó a 250°C, produciendo una presión inicial sobre la cabeza de la columna de 89 k Pa. La temperatura inicial del horno fue de 50°C, mantenida durante 2 minutos, posteriormente se aplicó un gradiente de 10°C·min<sup>-1</sup> hasta los 320°C (29 min). La ionización se realizó en condiciones estándar a 70 eV, a un voltaje de 200 V. La temperatura de la fuente se fijó a 250°C, mientras que la del cuadrupolo se estableció en 100°C. El detector realizó un barrido de iones 42 a 550  $m/z$ , con 2,87 ciclos por segundo.

#### 6.4 Procedimiento experimental

La muestra se introdujo en el crisol, con la ayuda del escalpelo, añadiendo la menor cantidad posible de materia. Posteriormente el crisol se encajó interior de un cilindro hueco de vidrio, el cual se situó en la jeringa del pirolizador.

La pirólisis se realizó mediante el método del punto de Curie. Para el estudio analítico realizado, se disponen crisoles correspondientes para 590; 650 ó 764°C.

Los crisoles se sometieron a un protocolo de limpieza después de cada pirólisis, consistente en lavado durante 20 minutos con metanol (grado HPLC, Fischer) y seguidamente 20 minutos con tetrahidrofurano (grado HPLC, Fischer), a ultrasonidos. La jeringa del pirolizador se limpia de igual manera.

La toma de muestra se realizó en función de las características de la resina patrón:

- Kraton G1650, Kraton G1657, Arkon P90, Mowilith 20, Mowilith 30, PVAc-AYAA, Palmer Cement, Pigmento acrílico, Alkyd, AW2 (90.39.14), Laropal A81: la alícuota se obtuvo cortando la resina patrón con un escalpelo.
- Resina de cumarona, Mowital B20H, AW2 (90.39.13), Resina fenólica (90.34.4), Akroid: se tomó directamente un grano del polvo.
- Mowilith 40, Mowilith 50, PVAc-AYAF, PVAc-AYAT, PVAc-AYA: la resina se reblandeció mojando con etanol, y posteriormente la alícuota se obtuvo cortando con un escalpelo.
- Paraloid: la muestra se tomó con una micropipeta.
- Keton N, Resina fenólica (90.34.6): se pulverizó un trozo del patrón en un mortero de ágata, y se introdujo en el crisol una partícula del polvo.

## ***V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

## **1. Caracterización de proteínas empleadas como aglutinantes en obras de arte pictóricas mediante cromatografía líquida con detector de Fluorescencia**

Las proteínas están entre los primeros materiales naturales que fueron utilizados con finalidad decorativa, por lo que aparecen en numerosos objetos artísticos. Estas sustancias se aplican como aglutinantes, consolidantes y cubrientes para pigmentos desde la antigüedad y su uso da lugar a las técnicas artísticas de témpera y temple. Debido a su importancia se consideran analitos de interés en el campo de la conservación/restauración, por lo que existen diversas metodologías para la caracterización de de proteínas en obras de arte. En su mayor parte se basan en la descomposición del biopolímero proteico, seguido de la identificación y cuantificación de los aminoácidos obtenidos por cromatografía gaseosa [18,32,160-162] y de líquidos [212], así como por electroforesis [198]. Habitualmente se realiza una reacción de derivatización, para adecuar las propiedades de los analitos a las requeridas por la técnica utilizada.

El estudio analítico de las proteínas también se realiza sobre otros tipos de muestras, principalmente biológicas y alimenticias. En estos casos las metodologías van generalmente dirigidas a la cuantificación de los aminoácidos. La técnica analítica más utilizada para el análisis de material proteico es la cromatografía líquida, con detector de fluorescencia [265-271] o espectrometría de masas [255,274-280].

La metodología analítica sugerida se fundamenta en el análisis de los aminoácidos procedentes del material proteico, mediante la cromatografía líquida, con un detector de Fluorescencia. La primera etapa consiste en la descomposición de la proteína mediante una hidrólisis ácida, seguida de la extracción de los aminoácidos con un disolvente adecuado. La mezcla obtenida se derivatiza a temperatura ambiente con un agente fluorógeno (o-ftaladehido) en medio básico, y se analiza por HPLC-Fluorescencia.

En general, durante la etapa de hidrólisis se produce una alteración de la composición de aminoácidos. Así pues, la asparaguina y la glutamina se hidrolizan a ácido aspártico y glutámico, respectivamente, mientras que este último experimenta parcialmente una ciclación, dando lugar al ácido piroglutámico. Por su parte, el triptófano se destruye durante el ataque ácido, por lo que no aparecerá en los análisis de las proteínas [160,162].

El trabajo realizado se centró en la optimización de los parámetros de la derivatización (tiempo de reacción, concentración de los reactivos), así como las condiciones de la separación cromatográfica (eluyentes, flujo, programa de gradiente). Posteriormente se midieron los parámetros analíticos de la metodología desarrollada, como la sensibilidad, intervalo lineal y límite detección.

El método analítico sugerido propone el empleo de o-ftaladehido, un reactivo ampliamente utilizado, que se caracteriza por su corto tiempo de reacción sin necesidad de calentamiento y el cual permite alcanzar elevados valores de sensibilidad y selectividad. Las proteínas seleccionadas para el estudio analítico fueron las más habituales en obras pictóricas decoradas en témpera o temple, como albúmina, caseína, gelatina de porcina y bovina, y huevo. La caracterización se efectuó en función de la proporción relativa de aminoácidos. Para aumentar la fiabilidad en la distinción del material proteico, los datos obtenidos se tratan estadísticamente con una herramienta quimiométrica, el Análisis por Componentes Principales. Finalmente, para evaluar la capacidad de predicción de la metodología sugerida, se analizaron muestras reales, procedentes de obras pictóricas pertenecientes al Patrimonio Cultural Valenciano.

Por otra parte, los cationes met licos procedentes de los pigmentos introducidos por el artista para proporcionar la coloración a la obra de arte, pueden formar complejos con ciertos aminoácidos, impidiendo su posterior derivativaci n y alterando la proporción de aminoácidos característica de cada proteína. Algunos autores han propuesto la adición previa de EDTA, el cual secuestra aquellos cationes reactivos, evitando su interferencia [160].

La metodología analítica propuesta presenta la ventaja respecto a las que utilizan cromatografía gaseosa, ya que permite la identificación de la arginina, la cual queda retenida en la columna capilar de sílice fundida. Por otra parte, su principal desventaja reside en que no se cuantifican la prolina ni la 4-hidroxiprolina, que actúan como marcadores en las algunas proteínas, aunque la caracterización se realiza de igual forma a través del tratamiento estadístico.

## **1.1 Optimización del procedimiento experimental**

### **1.1.1 Obtención de los aminoácidos a partir de la muestra**

Los aminoácidos se obtienen a partir de la descomposición del biopolímero proteico. Así pues, la muestra se somete a hidrólisis catalizada por el ácido clorhídrico 1:1, calentando a 110 C durante 24 horas, un protocolo de ruptura de enlaces peptídicos de probada eficacia y utilizado en la identificación de proteínas presentes en obras de arte [160,162]. En el marco del presente trabajo se propuso el uso de una concentración de HCl de 12 mol.L<sup>-1</sup>, para acrecentar la velocidad y cuantitatividad de la reacción, así como para reducir el impacto de una hipotética evaporación de parte del ácido clorhídrico durante el proceso de calentamiento.

Los protocolos más habituales de extracción de los aminoácidos de la matriz se basan en la evaporación del medio de hidrólisis, seguido de la

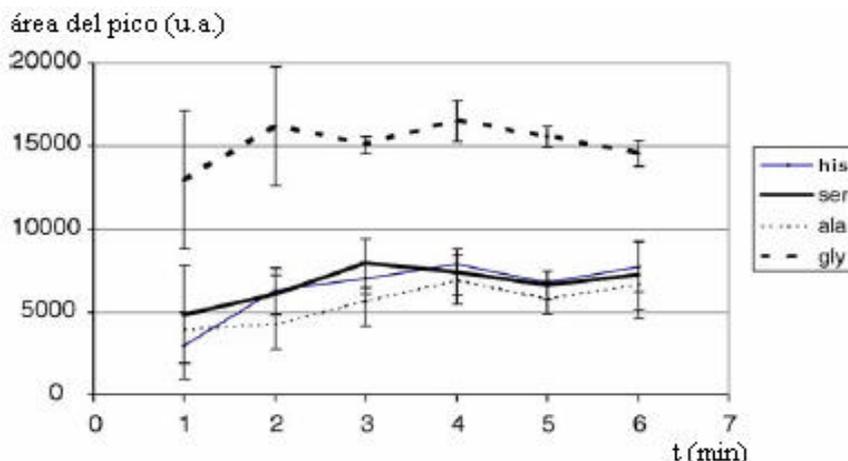
adición de 50  $\mu$ L de cloroformo y 50  $\mu$ L de agua, donde los aminoácidos pasarán preferentemente a la fase más polar [160,162]. La modificación propuesta consiste en utilizar únicamente una fase polar, para evitar la pérdida de analitos, ya que no se encuentran en la muestra interferentes apolares. El disolvente para la extracción se acidifica, ya que la solubilidad de los aminoácidos aumenta de forma general al alejarse de neutro, fundamentalmente en medio ácido [16]. El ácido clorhídrico resulta especialmente adecuado, ya que se evapora fácilmente sin dejar residuo y el anión cloruro es una entidad química con elevada inercia.

### 1.1.2 Optimización de la etapa de derivatización

El reactivo o-ftalaldehído es un derivatizante ampliamente utilizado para modificar los aminoácidos como tratamiento previo a su análisis mediante HPLC con detector de fluorescencia. En este sentido, Soufleros *et al.* han propuesto un método analítico, empleando OPA/2-ME, dirigido a la cuantificación de aminoácidos libres en vinos, validado en términos de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad [271].

La modificación propuesta consiste en primer lugar en la variación de la concentración y cantidad de reactivo que se utiliza para la derivatización. Los aminoácidos se obtienen tras la extracción en forma de residuo sólido, el cual se disuelve en un volumen adecuado de agua acidificada para favorecer la disolución y proporcionar el medio de reacción, mientras que las condiciones experimentales propuestas por Soufleros *et al.* están ajustadas para muestras líquidas [271]. Con el fin de reducir la dilución de los aminoácidos, se propone el empleo de la mitad de volúmenes de reactivos y muestras, lo que resulta en un aumento de la sensibilidad. Sin embargo, la cantidad total de o-ftalaldehído en el medio no se modifica para no afectar a la cuantitatividad y sensibilidad de la derivatización, por lo que se duplica su concentración en la disolución de reactivo.

El tiempo de reacción es un parámetro importante dentro de la metodología analítica, y exige un compromiso entre el grado de avance de la reacción y de la descomposición de los derivados formados. Por otra parte, la derivatización transcurre a temperatura ambiente, por lo que el control del tiempo de reacción resulta clave para obtener valores adecuados de reproducibilidad. Con el fin de optimizar este parámetro, se aplicó la metodología sugerida a 0,2 mL de una mezcla 1,25 mmol.L<sup>-1</sup> (0,25  $\mu$ mol) de cuatro aminoácidos: alanina (apolar), serina (polar), histidina (básico) y glicina (no quiral), empleando tiempos de derivatización de 1 a 6 min (Figura 7).



**Figura 7.** Valores para las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los OPA-derivados de los aminoácidos histidina, serina, alanina y glicina, obtenidos mediante la metodología propuesta a diversos tiempos de reacción. Valores de la media y desviación estándar de 5 medidas independientes.

Los resultados obtenidos muestran que el rendimiento de la reacción permanece constante a partir de los tres minutos, por lo que se toma un valor de cuatro minutos como tiempo de reacción óptimo.

### 1.1.3 Optimización de las condiciones cromatográficas

La separación de los derivados OPA-amino ácidos se llevó a cabo bajo las condiciones cromatográficas y de detección fluorescente propuestas por Soufleros *et al.* [271], utilizando como fase estacionaria una columna Zorbax XDB C18, con 15 cm de longitud. Bajo estas condiciones la presión soportada por la columna fue de 200 bares a tiempo 0 del gradiente, por lo que se redujo el caudal a la mitad ( $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Para conservar el poder resolutivo de la fase móvil (Tabla 4 en el apartado 1.5 del Capítulo III), el programa de gradiente se modifica para duplicar los tiempos de los puntos de inflexión. Así pues, se consigue reducir la presión en la entrada de la columna a niveles adecuados, aunque la separación se alarga hasta 45 minutos.

El uso de un horno termostático permite estabilizar la temperatura, y evitar que sus oscilaciones afecten a la capacidad de separación de la columna y por ello a la reproducibilidad de la metodología propuesta. El estudio de la temperatura (entre 10 y  $50^\circ\text{C}$ ) se llevó a cabo mediante el análisis de una mezcla de cuatro aminoácidos (alanina, serina, histidina y glicina,  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada uno de ellos). El uso de bajas temperaturas incrementa de forma considerable la presión ejercida por la bomba, mientras que al aumentar la temperatura no se aprecian mejoras significativas de la

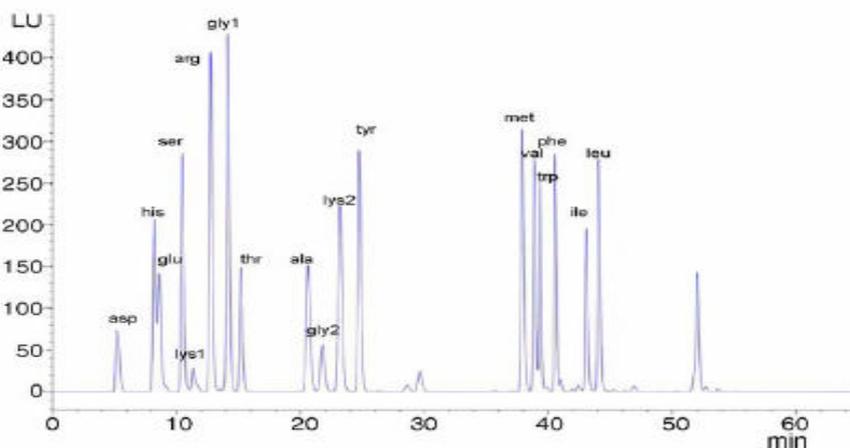
resolución cromatográfica. Así pues, se selecciona como valor óptimo la temperatura intermedia de 30°C.

## 1.2 Identificación de los aminoácidos y determinación de los parámetros analíticos del método

Con el propósito de comprobar la validez de los resultados obtenidos se evaluaron los parámetros analíticos del método. Así pues, se determinan los parámetros de selectividad, sensibilidad, linealidad, y límite de detección para los siguientes aminoácidos: alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina. Por su parte, la prolina, 4-hidroxiprolina y cisteína no se incluyeron en el estudio analítico, debido a la inestabilidad de los derivados que forman con el OPA, mientras que las amidas asparagina y glutamina se excluyen debido a que se descomponen durante la etapa de hidrólisis.

### 1.2.1 Identificación de los aminoácidos

La metodología analítica se aplicó a una mezcla de aminoácidos 0,8 mmol.L<sup>-1</sup> de cada uno, bajo las condiciones de derivatización y separación cromatográficas optimizadas (Figura 8).



**Figura 8.** Cromatograma obtenido a partir del análisis de una mezcla 0,8 mmol.L<sup>-1</sup> de cada uno de los siguientes aminoácidos: alanina (ala), arginina (arg), ácido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), glicina (gly), histidina (his), isoleucina (ile), leucina (leu), lisina (lys), metionina (met), fenilalanina (phe), serina (ser), tirosina (tyr), treonina (thr), triptófano (trp) y valina (val). Condiciones de separación: fase móvil circulando como el gradiente expuesto en la Tabla 4 a 1 mL.min<sup>-1</sup>, a 30°C y longitud de onda de excitación 340 nm y de emisión 450 nm.

La identificación de cada analito se llevó a cabo mediante comparación de los tiempos de retención, obtenidos previamente por el análisis de cada aminoácido de forma independiente.

Los resultados obtenidos indican que la mezcla de aminoácidos se resuelve adecuadamente en 45 minutos bajo las condiciones optimizadas, proporcionando picos cromatográficos con un perfil gaussiano. La glicina y la lisina muestran dobles picos [271], este último probablemente debido a la presencia de dos grupos aminos en su estructura, por lo que se formarán el mono- y di-OPA-derivados.

### 1.2.2 Determinación de los parámetros analíticos del método

El intervalo lineal, la sensibilidad y el límite de detección de la metodología sugerida se determinaron para los siguientes aminoácidos de interés analítico (por orden de elución): ácido aspártico, histidina, ácido glutámico, serina, lisina, arginina, glicina, treonina, alanina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina y leucina. La selectividad alcanzada se puede apreciar en la Figura 8 donde los analitos aparecen adecuadamente separados. Como patrón interno se utilizó 0,1 μmol de triptófano, mientras que la concentración de los analitos se expresa como cantidad de aminoácido en el tubo de reacción. En el caso de la glicina y la lisina, se toma la suma de las áreas de los dos picos cromatográficos que proporcionan. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Parámetros analíticos de la metodología propuesta para la identificación y cuantificación de los aminoácidos estudiados. (n=13)

AA	A(AA)/A(trp)= (a±s <sub>a</sub> ) [AA] (i mol) + (b±s <sub>b</sub> )		R <sup>2</sup>	intervalo lineal (nmol)	límite de detección* (nmol)
	pendiente	ordenada en el origen			
asp	5,8 ±0,1	-0,04±0,02	0,998	0,4-1000	0,12
his	8,75±0,05	-0,02±0,01	0,9995	0,4-660	0,08
glu	7,10±0,05	0,03±0,01	0,9991	0,4-660	0,10
ser	8,55±0,05	0,02±0,01	0,9992	0,4-660	0,08
lys	16,9±0,3	0,11±0,07	0,996	0,4-660	0,04
arg	10,4±0,3	0,12±0,05	0,993	0,4-660	0,06
gly	15,9±0,3	0,00±0,06	0,998	0,4-660	0,04
thr	6,55±0,05	-0,02±0,01	0,9990	0,4-1000	0,10
ala	8,15±0,05	-0,02±0,02	0,9991	0,4-1000	0,08
tyr	7,6±0,4	0,04±0,04	0,994	0,4-660	0,08
met	12,10 ±0,15	0,03±0,02	0,998	0,4-330	0,06
val	12,10 ±0,15	0,00±0,02	0,998	0,4-330	0,06
phe	8,1±0,1	-0,01±0,01	0,9990	0,4-660	0,08
ile	5,80±0,05	0,05±0,02	0,9990	0,4-1000	0,12
leu	6,70±0,15	0,05±0,03	0,996	0,4-660	0,10

\*calculado como el triple del cociente entre la desviación del blanco y la sensibilidad.

La sensibilidad proporcionada por cada derivado varía en función del aminoácido de origen, probablemente debido a diferentes valores de rendimiento fluorescente o grado de avance máximo de la derivatización.

Los parámetros analíticos del método resultan adecuados para el estudio que se propone. En especial, el bajo límite de detección alcanzado permite el estudio analítico de cantidades pequeñas de muestra, sin conllevar una incertidumbre elevada en la medida.

### **1.3 Estudio analítico de patrones de aglutinantes proteicos**

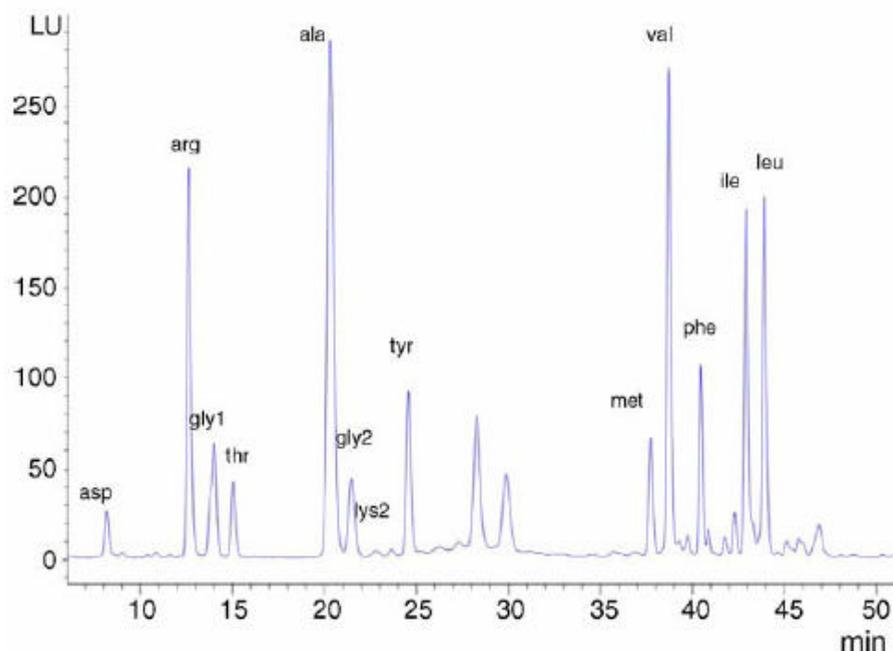
Algunas metodologías analíticas proponen la caracterización de proteínas a partir de la proporción relativa de aminoácidos [18, 32,161]. En otros casos se sugiere el cálculo del cociente entre la cantidad de cada aminoácido y uno seleccionado como referencia, usualmente la alanina [160,162]. Así pues, se evita que el error en la medida de algún analito, afecte en exceso a los demás. En el marco del presente estudio, se propone el empleo de la leucina como aminoácido de referencia, debido a su estabilidad, ausencia de grupos reactivos y reproducibilidad en su análisis [271].

Dada la cantidad de variables que se manejan para la identificación de proteínas, la comparación directa entre los valores obtenidos puede resultar confusa [18,32,161]. Algunos autores han sugerido el tratamiento quimiométrico de los datos mediante Análisis por Componentes Principales, el cual manipula y ordena la información para maximizar la varianza explicada y agrupar las muestras en función de la causa de varianza, en este caso el origen de las proteínas.

#### **1.3.1 Análisis de las proteínas patrón**

La metodología sugerida se aplica sobre las proteínas más habituales en pinturas decoradas en ténpera o temple: albúmina, caseína, gelatina porcina y bovina, y huevo. Los resultados obtenidos a partir del análisis de esa última se muestra en la Figura 9.

Los resultados muestran que la metodología propuesta proporciona adecuados valores de sensibilidad y selectividad, al ser aplicada a muestras procedentes de proteínas. Por otra parte, no se observaron interferencias entre los picos cromatográficos y otras sustancias de la matriz.



**Figura 9.** Cromatograma obtenido a partir del análisis de la mezcla de aminoácidos extraídos de la proteína de huevo. Condiciones de derivatización y separación cromatográfica se fijaron como en la Figura 8.

### 1.3.2 Caracterización de los aglutinantes proteicos

Los valores de los cocientes entre las áreas de los picos cromatográficos de los aminoácidos y la leucina ( $A(AA)/A(\text{leu})$ ), obtenidos a partir de la aplicación de la metodología propuesta a cada proteína se muestran en la Tabla 7. Paralelamente, se analizaron muestras procedentes de la clara y la yema del huevo por separado, obteniendo resultados similares.

Los resultados muestran desviaciones estándar más elevadas que el caso del análisis de los aminoácidos patrón, debido a la incertidumbre añadida por el tratamiento de la muestra, y a la variabilidad intrínseca de la composición de la proteína [16].

Para los aminoácidos de cadena carbonada apolar se encontraron valores de error superiores a los demás, probablemente debido a la ausencia de grupos reactivos que puedan experimentar reacciones paralelas. Por su parte, los cocientes calculados para la glicina y la lisina presentan valores de desviación estándar relativa elevadas, ya que ambos valores son el resultado de la suma de las áreas de dos picos cromatográficos, por lo que la

incertidumbre también se añade. Por otra parte, los valores obtenidos para los aminoácidos hidrofílicos ácidos (asp y glu), representan tanto su propio contenido como el de sus correspondientes amidas (asn y gln, respectivamente), en la estructura de la proteína, por lo que su determinación también se asocia una incertidumbre superior.

**Tabla 7.** Valores de los cocientes A(AA)/A(leu) obtenidos aplicando el método analítico propuesto mediante HPLC-Fluorescencia, para cada proteína estudiada.

aminoácido	A(AA)/A(leu)				
	albúmina	caseína	gelatina bovina	gelatina porcina	huevo
asp	0,37±0,07	0,3±0,1	0,3±0,1	0,1±0,1	0,013±0,006
his	0,30±0,09	0,4±0,1	0,06±0,05	0,3±0,02	0,13±0,03
glu	0,9±0,3	1,1±0,6	0,8±0,9	0,8±1,0	0,007±0,005
ser	0,6±0,2	0,4±0,2	0,03±0,04	0,01±0,02	0,04±0,02
lys	3±1	3,6±0,7	7±1	6,7±0,7	0,05±0,03
arg	1,6±0,3	0,77±0,08	4,2±0,6	5,4±0,7	1,0±0,2
gly	6±2	2,1±0,6	50±20	80±20	0,84±0,08
thr	0,5±0,1	0,41±0,06	0,20±0,01	0,3±0,1	0,24±0,03
ala	0,8±0,1	0,7±0,3	4,7±0,7	5,2±0,8	2,0±0,1
tyr	0,48±0,9	0,46±0,07	0,06±0,02	0,11±0,04	0,43±0,08
met	0,64±0,03	0,40±0,03	0,29±0,05	0,36±0,06	0,35±0,05
val	1,0±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,8±0,1	1,2±0,1
phe	0,62±0,06	0,44±0,05	0,50±0,05	0,53±0,08	0,40±0,03
ile	0,7±0,1	0,59±0,07	0,7±0,1	1,0±0,2	0,9±0,1

Valores de la media y desviación estándar a partir de 3 medidas independientes.

La cantidad relativa encontrada para los aminoácidos apolares como valina, isoleucina y fenilalanina fueron semejantes para las proteínas estudiadas, por lo que no aportan información significativa para la identificación de las proteínas por comparación directa del contenido de aminoácidos.

Las gelatinas se diferencian por su elevado contenido en glicina, y en menor medida también contienen más alanina, arguinina y lisina que las demás proteínas. Por otra parte, su contenido en aminoácidos es muy semejante, y su distinción resulta relativamente compleja. Esto se debe a que ambas proceden del colágeno de piel animal, donde ambas cumplen la misma funcionalidad, como el mantenimiento de la estructura. Sin embargo, se aprecia que la gelatina porcina contiene una cantidad ligeramente más elevada de glicina, isoleucina, metionina, histidina y tirosina.

Las proteínas de albúmina y caseína se diferencian de las otras tres proteínas patrón a partir de su proporción de glicina, lisina, arguinina, alanina, y en menor medida de treonina y metionina. Entre ellas, se distinguen a través del mayor contenido en glicina, arguinina y treonina de la albúmina.

Los resultados obtenidos para la clara y la yema de huevo son difícilmente distinguibles entre ellos y de su mezcla, a causa de su semejante proporción relativa para la mayoría de los aminoácidos estudiados. Así pues, se considera únicamente el contenido proteico en la mezcla de yema y clara de huevo. Por su parte, dicha proteína de huevo es claramente diferenciable de los demás aglutinantes a partir de la baja cantidad de lisina, glicina y ácido glutámico, a la vez que presenta valores intermedios para la arginina y alanina.

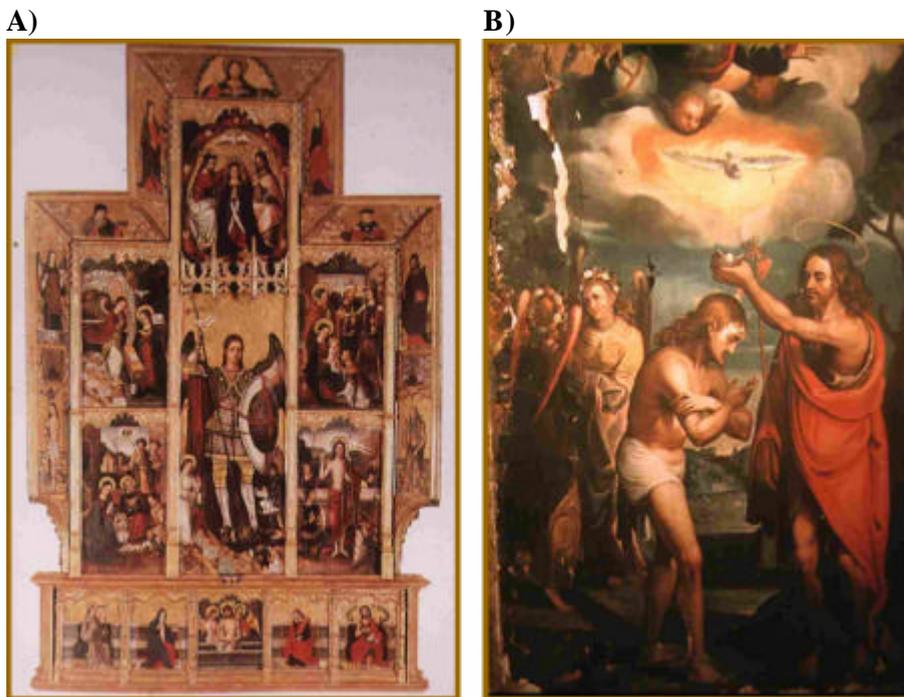
Con el propósito de incrementar la fiabilidad en la diferenciación de las proteínas, se propone un tratamiento quimiométrico de los datos mediante Análisis por Componentes Principales (PCA) [291]. Las variables seleccionadas para la construcción del modelo son las proporciones relativas de los aminoácidos incluidos en la Tabla 6, excluyendo el ácido glutámico, debido que se modifica en parte proporcionando ácido piroglutámico, (14) y como objeto se selecciona cada réplica de proteína patrón analizada (25). La representación gráfica de las puntuaciones obtenidas para los dos primeros PC muestra una agrupación definida de los objetos en función del origen de la proteína, con un nivel de varianza explicada por el modelo del 99% (Figura 12). Así pues, el modelo quimiométrico construido proporciona una adecuada herramienta para la caracterización de los aglutinantes proteicos a partir de la proporción relativa de aminoácidos.

#### **1.4 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte**

Con el objetivo de determinar la validez de la metodología propuesta, ésta se aplicó a la identificación de aglutinantes proteicos en muestras reales, procedentes de obras pictóricas decoradas mediante ténpera o temple y pertenecientes al Patrimonio Cultural Valenciano.

La Figura 10 muestra la imagen de dos de las obras pictóricas seleccionadas para el estudio analítico: “Retablo de San Miguel”, realizada por Vicente Maçip en 1542 y “Altar del Muro de Alcoi”, por Jerónimo Rodríguez de Espinosa en el siglo XVII.

La caracterización de los materiales presentes en una muestra real, presenta la dificultad de la reducida cantidad de muestra usualmente disponible, lo que exige una sensibilidad elevada, así como la presencia de otras sustancias, como barnices, aditivos y pigmentos, que pueden provocar interferencias durante la etapa derivatización y de separación cromatográfica. En efecto, la obtención de valores de proporción relativa de aminoácidos distorsionada por estos factores, puede conducir a una incorrecta clasificación de la proteína presente en la muestra. La influencia de los pigmentos se eliminó mediante la adición de EDTA al medio de reacción.

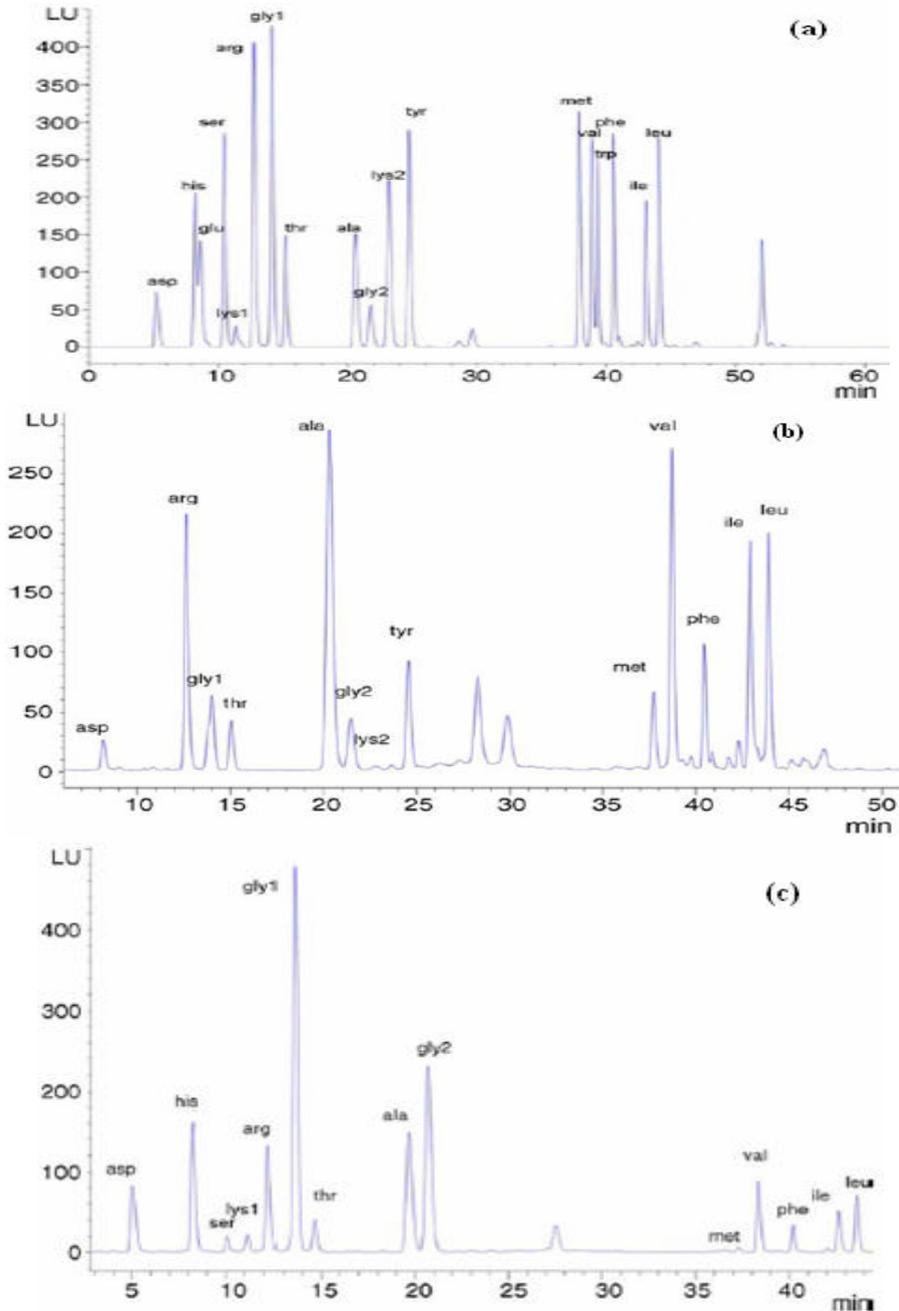


**Figura 10.** Obras pictóricas A) “Retablo de San Miguel”, 1542, Vicente Maçip (Muestra 1) y B) “Altar del Muro de Alcoi”, siglo XVI, Maestro de Alzira (Muestra 4).

#### 1.4.1 Aplicación de la metodología a muestras reales

Las muestras provenientes de obras pictóricas elaboradas mediante la técnica decorativa de témpera o de temple, citadas en el apartado 1.3 del Capítulo IV, se analizaron a través de la metodología sugerida. Así pues, en la Figura 11 se representa el cromatograma obtenido a partir del análisis de la mezcla de aminoácidos extraídos tras la hidrólisis de la muestra procedente de la pintura “Retablo de San Miguel”, realizada en 1542 por Vicente Maçip.

Los resultados obtenidos indican que la mezcla de los aminoácidos se resuelve adecuadamente sin interferencias cromatográficas por parte de otras sustancias de la matriz. Asimismo, la sensibilidad alcanzada permite la medida de las áreas de los picos correspondientes a los analitos sin incluir una incertidumbre elevada.



**Figura 11.** Cromatograma obtenido del análisis de la muestra de la obra pictórica “Retablo de San Miguel” (c), empleando el método sugerido mediante HPLC-Fluorescencia, comparado con el cromatograma obtenido en el análisis de los aminoácidos patrón (a), (Figura 8) y del análisis de clara de huevo (b) (Figura 9).

1.4.2 Caracterización de aglutinantes proteicos

Los valores de los cocientes de las áreas de los picos cromatográficos de los aminoácidos respecto al de la leucina (A(AA)/A(leu)), se muestran en la Tabla 8.

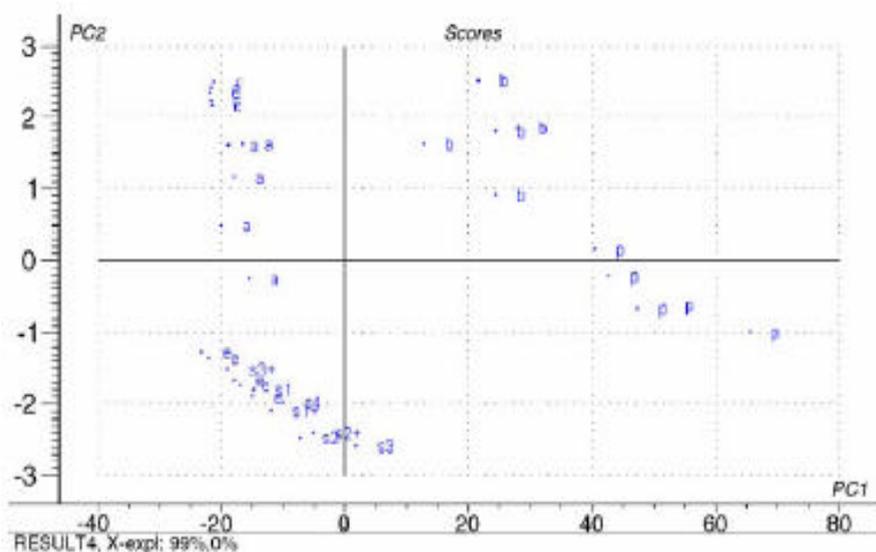
**Tabla 8.** Valores calculados de A(AA)/A(leu) y aglutinante proteico asignado para las muestras procedentes de obras pictóricas decoradas en témpera o temple.

aminoácido	A(AA)/A(leu) Muestra			
	1	2	3	4
asp	1,2±0,5	2,0±0,3	2±1	2,6±0,4
his	2,0±0,8	2,2±0,2	0,13±0,01	0,11±0,03
glu	0,0±0,0	0,4±0,1	2,1±0,7	2,4±0,7
ser	0,2±0,2	0,4±0,2	0,5±0,1	0,38±0,5
lys	0,39±0,01	3,6±0,7	1,0±0,3	0,9±0,3
arg	1,6±0,6	1,3±0,4	3,0±0,4	1,6±0,2
gly	9±5	2,1±0,6	25±5	14,0±0,7
thr	0,5±0,2	0,52±0,05	0,6±0,3	0,53±0,02
ala	2,5±0,9	2,3±0,5	2,6±0,9	1,9±0,3
tyr	0,0416±0,0001	0,46±0,07	0,12±0,02	0,14±0,04
met	0,08±0,01	0,40±0,06	0,2±0,1	0,4±0,1
val	1,2±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	1,2±0,2
phe	0,38±0,3	0,44±0,5	0,45±0,04	1,2±0,2
ile	0,70±0,05	0,59±0,07	0,7±0,2	1,7±0,2
proteína	huevo	huevo	probablemente huevo	huevo

Valores de la media y desviación estándar para tres análisis independientes para tres muestras diferentes, tomadas con un escalpelo de la superficie de la obra pictórica.

Los resultados muestran que la incertidumbre asociada a los valores obtenidos a partir del análisis de muestras reales es en general superior que para las proteínas patrón. Esto se debe principalmente a la considerable complejidad y heterogeneidad de los materiales en las obras de arte. Dado que la presencia de otras sustancias como aditivos y pigmentos, pueden afectar a la etapa de envejecimiento, el deterioro no haya afectado de igual manera a toda la superficie decorada. Asimismo, una distribución no homogénea de pigmento, puede que éstos influyan de forma diferente en cada muestra analizada.

Para la caracterización de los aglutinantes proteicos, los valores de A(AA)/A(leu) para cada muestra real analizada se introdujeron en el modelo quimiométrico por PCA, considerando cada una de ellas como un nuevo objeto. La posición de cada uno de ellos en el gráfico de puntuaciones resultante proporciona una hipótesis acerca de la proteína que contienen. Los resultados obtenidos indican que la proteína de huevo está presente en las cuatro muestras analizadas (Figura 12). Sin embargo, en el caso de la Muestra 3, el objeto se encuentra algo alejado los patrones.



**Figura 12.** Gráfico de puntuaciones correspondiente al análisis por componentes principales de los valores de cantidad relativa de aminoácidos, obtenidos mediante la aplicación de la metodología propuesta al estudio de : patrones de a) albúmina, c) caseína, b) gelatina bovina, p) gelatina porcina, e) huevo, muestras reales 1; 2; 3 y 4 sin tener en cuenta la influencia de los pigmentos s1), s2), s3), y s4), mediante la modificación del método con la adición de EDTA s1+), s2+), s3+), s4+).

Con el propósito de evaluar la posible influencia de los pigmentos en la caracterización de las proteínas, las muestras reales se analizaron siguiendo la metodología analítica propuesta, utilizando la disolución de EDTA como disolvente para los aminoácidos. En estas condiciones, los cationes metálicos quedarán secuestrados y no interferirán en derivatización de los analitos. A partir de los valores obtenidos de cantidad relativa mediante esta modificación, se caracterizan los aglutinantes proteicos presentes en las muestras, introduciendo los valores obtenidos en el modelo quimiométrico por PCA. Así pues, los resultados obtenidos se representan en el correspondiente gráfico de puntuaciones (Figura 12). En el caso de las Muestras 1; 2 y 4, no se aprecia influencia de los pigmentos en la caracterización de las proteínas, mientras que en la Muestra 3, mediante esta variante, se observa una concordancia mayor con los patrones de proteína de huevo. A partir de este resultado, se puede plantear que la discordancia inicialmente obtenida en la caracterización de la Muestra 3, se debe a la interacción de los aminoácidos con los pigmentos.

## **2. Caracterización de ceras naturales en obras pictóricas a partir de su contenido en ácidos grasos e hidrocarburos mediante cromatografía gaseosa**

Las ceras naturales son materiales utilizados desde la antigüedad como aglutinantes, consolidantes y cubrientes para colorantes, en obras pictóricas decoradas mediante encáustica [2,7,23,32,33]. Asimismo, se han empleado como materiales sellantes y aislantes del agua debido a su hidrofobicidad, por lo que se encuentran en numerosos objetos arqueológicos, como en vasijas, tumbas y materiales antiguos de construcción [7,21,27]. Debido a su importancia y su presencia en numerosos objetos artísticos, se han realizado numerosos estudios acerca de su caracterización y de procesos de envejecimiento [26].

Algunos autores proponen metodologías basadas en la pirólisis-GC-MS de la muestra sólida [22,23], así como mediante una derivatización con trimetilsilanos y análisis de los derivados formados por cromatografía gaseosa [21,22,171].

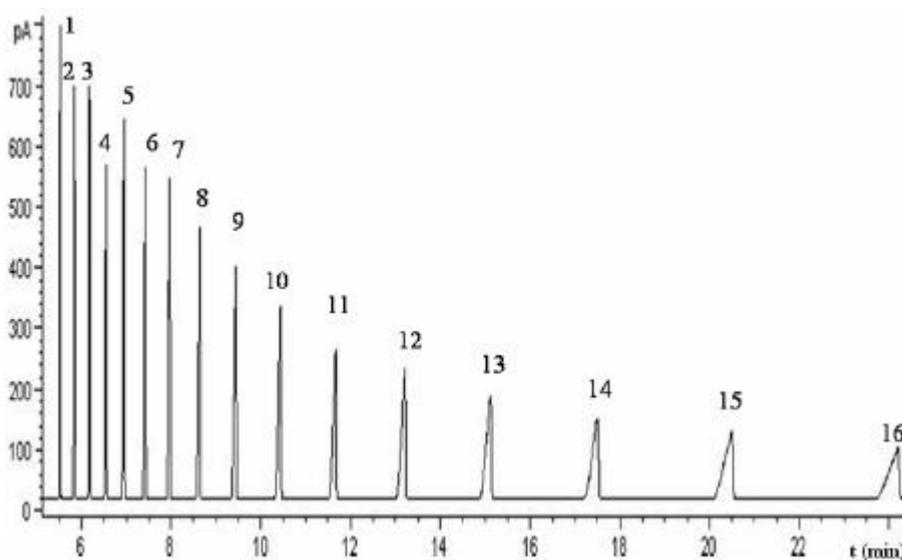
En el marco del presente estudio, se sugiere la caracterización de las ceras a partir de los compuestos principales, los alcanos lineales y los ésteres. La metodología se basa en la hidrólisis ácida de la muestra para liberar los ácidos grasos, la extracción de éstos últimos y los hidrocarburos de la matriz, la formación los etilderivados de los ácidos carboxílicos por adición de etilcloroformiato, y por último la separación cromatográfica, identificación y cuantificación de los analitos. El reactivo ECF se utiliza ampliamente como agente derivatizante en el estudio analítico de aceites secantes, debido a su cuantitatividad, rapidez de la reacción, además de tener lugar a temperatura ambiente [163,165]. Sin embargo, este derivatizante ha sido poco usado para la caracterización de ceras. Por su parte, los hidrocarburos son lo suficientemente volátiles para análisis por GC, por lo que no resulta necesaria su modificación. El inconveniente principal de la metodología propuesta radica en que la etapa de hidrólisis impide la obtención de información acerca de la estructura de los ésteres. Asimismo, la presencia de aceites secantes en la muestra puede alterar la proporción de ácidos grasos, y distorsionar la identificación de las ceras.

Las ceras naturales se diferencian en función de la cantidad relativa de ácidos grasos e hidrocarburos. Para aumentar la fiabilidad de la caracterización, los valores obtenidos se tratan estadísticamente con una herramienta quimiométrica, el Análisis por Componentes Principales. Por último, la evaluación de la capacidad del procedimiento de análisis sugerido, se llevó a cabo mediante su aplicación para caracterizar un aglutinante ceroso presente en una muestra perteneciente a una obra pictórica.

## 2.1. Separación cromatográfica de hidrocarburos y ácidos grasos

### 2.1.1 Identificación de los alcanos lineales

La mezcla de hidrocarburos patrón  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de cada uno de ellos en cloroformo se inyectó, directamente en el sistema cromatográfico, resolviéndose bajo las condiciones indicadas en el apartado 2.5.3 del Capítulo IV. El cromatograma resultante se representa en la Figura 13.



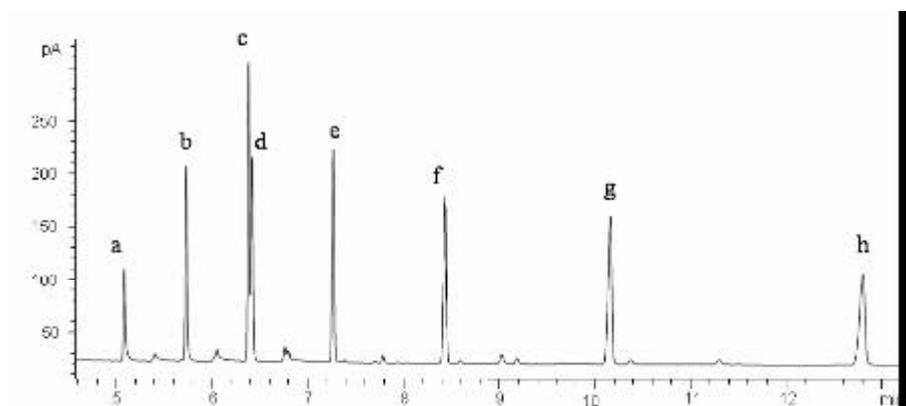
**Figura 13.** Cromatograma obtenido para el análisis mediante GC de una disolución  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de: 1) n-eicosano, 2) n-heneicosano, 3) n-docosano, 4) n-tricosano, 5) n-tetracosano, 6) n-pentacosano, 7) n-hexacosano, 8) n-heptacosano, 9) n-octacosano, 10) n-nonacosano, 11) n-triacontano, 12) n-hentriacontano, 13) n-dotriacontano, 14) n-tritriacontano, 15) n-tetratriacontano y 16) n-pentatriacontano.

Los resultados obtenidos muestran que los hidrocarburos son eluidos en orden creciente de hidrofobicidad (número de átomos de carbono) a tiempos de retención manejables (30 minutos) y sin solapamiento. Su sensibilidad también resulta adecuada para este tipo de análisis.

### 2.1.2 Identificación de los ácidos grasos

La disolución  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácidos grasos se sometió al proceso de derivatización por ECF (expuesto en el Capítulo IV, apartado 2.5.2). Posteriormente los derivados se extrajeron en cloroformo y se introdujeron

en el sistema cromatográfico. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Cromatograma resultante del análisis por GC de una disolución  $1\text{mmol.L}^{-1}$  en etanol de una mezcla de los siguientes ácidos grasos: a) mirístico, b) palmítico, c) oleico, d) esteárico, e) araquídico, f) behénico, g) lignocérico y h) cerótico.

Los derivados de los ácidos carboxílicos presentan tiempos de retención suficientemente separados entre sí, mayores al aumentar la longitud de la cadena carbonada (menor volatilidad), siendo el más elevado

14 min para el ácido cerótico. Únicamente los ácidos oleico y esteárico aparecen a tiempos de retención próximos, pero son cuantificables por separado. La sensibilidad obtenida es adecuada para este tipo de análisis.

Los hidrocarburos y los derivados de los ácidos grasos eluyen en la misma zona del cromatograma, pero cada una de las sustancias aparece a diferentes tiempos de retención, sin interferir entre ellas.

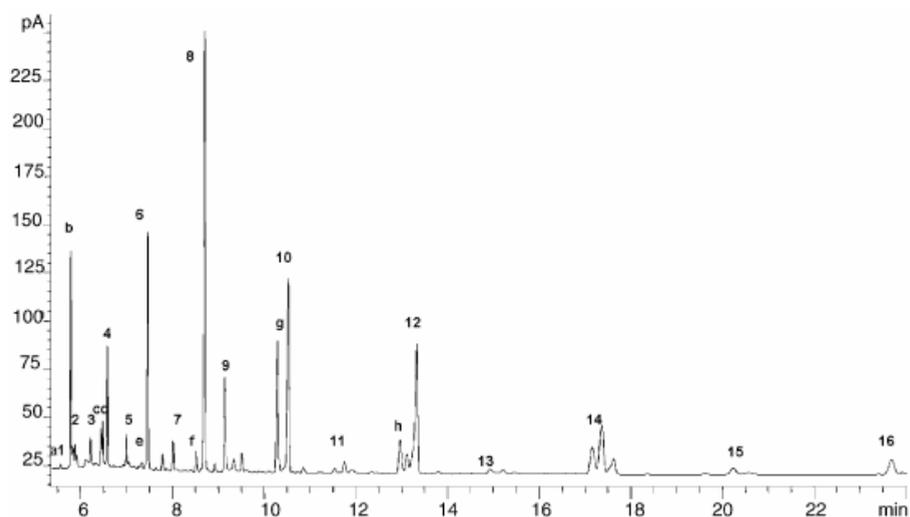
## 2.2 Estudio analítico de ceras naturales patrón

### 2.2.1 Análisis de ceras naturales

La metodología sugerida se aplica sobre las ceras naturales más utilizadas en encáustica: cera de abeja, carnauba y cerasina. La identificación de las sustancias se realiza a partir de los tiempos de retención obtenidos para cada analito patrón. El cromatograma resultante del análisis de la cera de abeja se muestra en la Figura 15.

Los resultados muestran que el método analítico sugerido proporciona adecuados valores de sensibilidad y selectividad, al ser aplicada a muestras procedentes de ceras naturales. Por otra parte, no se observaron interferencias entre los picos cromatográficos de los analitos y otras sustancias de la matriz. En todos los casos, se observa que la cantidad de hidrocarburos es

superior a la de ácidos carboxílicos, y para la cerasina el contenido en ácidos grasos es todavía más reducido.



**Figura 15.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra de cera de abeja por GC/FID mediante la metodología propuesta. Picos cromatográficos de los hidrocarburos: 1) C20H, 2) C21H, 3) C22H, 4) C23H, 5) C24H, 6) C25H, 7) C26H, 8) C27H, 9) C28H, 10) C29H, 11) C30H, 12) C31H, 13) C32H, 14) C33H, 15) C34H y 16) C35H, y de los etil derivados de los ácidos grasos: a) C14, b) C16, c) C18:1, d) C18, e) C20, f) C22, g) C24 y h) C26.

## 2.2.2 Caracterización de ceras naturales

### 2.2.2.1 Ceras patrón no envejecidas

La cantidad relativa de hidrocarburos y ácidos grasos se establece a partir del cálculo de los cocientes entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los alcanos lineales y del n-heptacosano ( $A(H)/A(C27H)$ ), así como la relación entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los etil derivados de los ácidos grasos y el etil éster del ácido palmítico ( $A(FA)/A(C16)$ ), respectivamente. El n-heptacosano se utiliza como referencia, debido a que está presente en gran cantidad en todas las ceras analizadas y es el hidrocarburo central, mientras que el ácido palmítico se selecciona debido también a que está en elevada proporción en las ceras analizables, y no posee dobles enlaces reactivos [163,165]. Los valores obtenidos de  $A(H)/A(C27H)$  y  $A(FA)/A(C16)$  para cada cera analizada mediante la metodología propuesta se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9** Cocientes entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los hidrocarburos C20H-C35H y al n-heptacosano, y de los etilderivados de los ácidos grasos C14-C26 con relación al área del pico cromatográfico correspondiente al etiléster del ácido palmítico, para las tres ceras estudiadas.

A(H)/A(C27H)			
hidrocarburo	cera de abeja	carnauba	ceresina
n-eicosano	0,008±0,003	0,12±0,8	0,13±0,04
n-heneicosano	0,04±0,02	0,4±0,2	0,5±0,1
n-docosano	0,04±0,02	0,8±0,2	1,0±0,2
n-tricosano	0,18±0,01	1,1±0,2	1,4±0,2
n-tetracosano	0,06±0,01	1,2±0,1	1,4±0,2
n-pentacosano	0,40±0,01	1,0±0,3	1,3±0,1
n-hexacosano	0,05±0,01	0,9±0,2	1,12±0,04
n-octacosano	0,039±0,003	0,8±0,1	0,77±0,03
n-nonacosano	0,55±0,02	0,8±0,1	0,66±0,05
n-triacontano	0,03±0,01	0,6±0,1	0,48±0,05
n-hentriacontano	0,55±0,04	0,6±0,1	0,40±0,06
n-dotriacontano	0,011±0,003	0,3±0,1	0,24±0,04
n-tritriacontano	0,09±0,03	0,26±0,08	0,16±0,03
n-tetratriacontano	0,02±0,01	0,12±0,04	0,09±0,02
n-pentatriacontano	0,001±0,002	0,1±0,1	0,07±0,02
A(FA)/A(C16)			
ácido graso	cera de abeja	carnauba	ceresina
mirístico	0,0073±0,0003	0,18±0,06	0,1±0,1
oleico	0,13±0,03	1,0±0,2	1,6±0,9
esteárico	0,090±0,006	1,4±0,2	0,9±0,3
araquídico	0,010±0,002	1,4±0,2	3±1
behénico	0,03±0,01	1,3±0,1	4±3
lignocérico	0,21±0,02	1,12±0,04	3±3
cerótico	0,04±0,03	0,77±0,03	1±1

Valores de la media y desviación estándar a partir de 5 medidas independientes.

Los resultados obtenidos muestran una mayor variabilidad en los cocientes calculados para los ácidos carboxílicos, por lo que se sugiere que la cantidad relativa de hidrocarburos es más fiable para la caracterización de las ceras naturales. Esto se debe probablemente a la mayor estabilidad de los alcanos lineales, causada por la ausencia en su estructura de puntos reactivos. Asimismo, la menor cantidad de ácidos carboxílicos provoca una mayor incertidumbre asociada a la medida.

#### 2.2.2.2 Ceras patrón envejecidas

Las muestras procedentes de ceras naturales sometidas al proceso de envejecimiento por irradiación UV (discutido en el apartado 2.2 del Capítulo IV) se analizaron mediante la metodología propuesta. Con el propósito de comprobar el efecto del proceso de degradación aplicado sobre las muestras, los resultados obtenidos con los de las muestras sin proceso de deterioro, se

calcularon los valores para A(H)/A(C27H) y A(FA)/A(C16) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Cocientes calculados entre el área de los picos cromatográficos de los alcanos lineales C20H-C35H y el n-heptacosano, y de los etilderivados de los ácidos grasos C14-C26 y del ácido palmítico, para las muestras de cera de abeja, carnauba y cerasina, envejecidas mediante irradiación UV.

A(H)/A(C27H)			
hidrocarburo	cera de abeja	carnauba	ceresina
n-eicosano	0,007±0,002	0,05±0,01	0,019±0,003
n-heneicosano	0,044±0,014	0,35±0,10	0,21±0,03
n-docosano	0,06±0,02	0,82±0,13	0,62±0,06
n-tricosano	0,22±0,04	1,11±0,13	1,08±0,08
n-tetracosano	0,10±0,03	1,15±0,07	1,16±0,06
n-pentacosano	0,46±0,02	1,11±0,03	1,15±0,04
n-hexacosano	0,09±0,02	0,90±0,06	1,10±0,03
n-octacosano	0,06±0,02	0,61±0,07	0,78±0,08
n-nonacosano	0,53±0,05	0,65±0,03	0,71±0,01
n-triacontano	0,04±0,01	0,38±0,05	0,51±0,01
n-hentriacontano	0,48±0,07	0,44±0,02	0,46±0,01
n-dotriacontano	0,022±0,002	0,24±0,2	0,278±0,005
n-tritriacontano	0,08±0,01	0,22±0,01	0,20±0,01
n-tetracontano	0,017±0,004	0,10±0,01	0,127±0,003
n-pentatriacontano	0,016±0,002	0,09±0,02	0,09±0,02

A(FA)/A(C16)			
ácido graso	cera de abeja	carnauba	ceresina
mirístico	0,008±0,001	0,08±0,03	0,12±0,5
oleico	0,03±0,03	0,14±0,06	0,33±0,10
esteárico	0,17±0,02	0,87±0,11	0,9±0,3
araquídico	0,032±0,005	0,5±0,2	1,0±0,3
behénico	0,04±0,01	0,6±0,2	2,3±0,4
lignocérico	0,21±0,05	1,2±0,3	2,9±0,5
cerótico	0,05±0,03	0,5±0,3	1,0±0,6

Valores de la media y desviación estándar a partir de 5 medidas independientes.

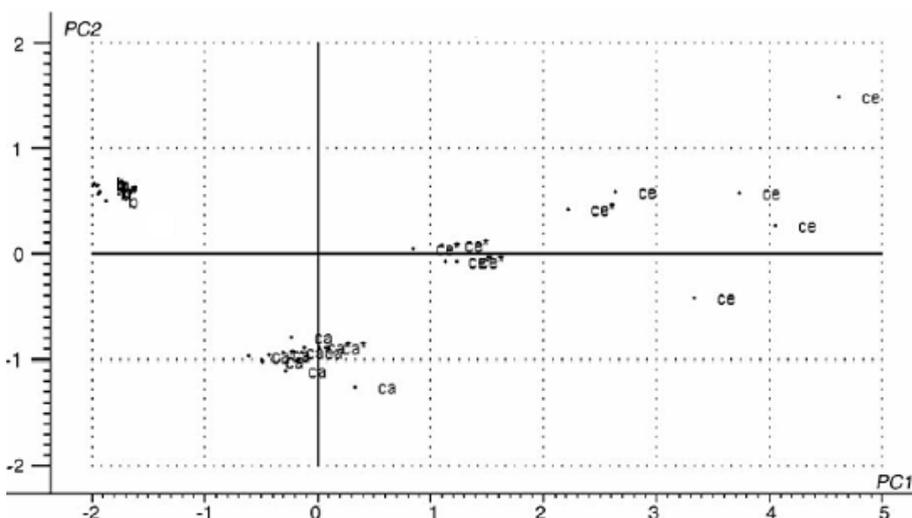
Los resultados obtenidos muestran que las proporciones relativas de hidrocarburos y ácidos carboxílicos no experimentan grandes variaciones.

Esta constatación se debe principalmente a que la mayoría de compuestos estudiados son moléculas saturadas, por lo que su reactividad no es muy elevada. Asimismo, la irradiación UV en las condiciones de envejecimiento acelerado aplicadas en este trabajo, no favorece el proceso de sublimación, que es la principal causa de variación en la cantidad de hidrocarburos [26].

## 2.2.2.3 Tratamiento quimiométrico de los datos

Los datos obtenidos se tratan estadísticamente mediante Análisis por Componentes Principales, lo que permite un aprovechamiento más eficaz de la información, y por tanto una mayor fiabilidad en la diferenciación de las ceras naturales.

Las variables seleccionadas para la construcción del modelo son los valores calculados de  $A(H)/A(C27H)$  y de  $A(FA)/A(C16)$  (indicados en las Tablas 9 y 10). Los datos obtenidos para los ácidos lignocérico y cerótico, debido a que su proporción en cerasina es muy elevado, lo que provocaría distorsión en el modelo. Asimismo, se descarta el ácido oleico, ya que su doble enlace le vuelve más vulnerable a los procesos de envejecimiento, sobre todo a los causados por la irradiación UV [7], por lo que se incluyen finalmente en el modelo estadístico 19 variables. Los objetos estadísticos son cada una de las réplicas analizadas de las tres ceras (abeja, carnauba y cerasina), frescas y envejecidas, en total 30. La representación gráfica de las puntuaciones de los dos primeros componentes principales se expone en la Figura 16.



**Figura 16.** Gráfico de puntuaciones para los PC1 y PC2 a partir del PCA de los valores obtenidos en el análisis por GC, aplicando la metodología propuesta, de: b) cera de abeja, ca) carnauba, ce) cerasina, b\*) cera de abeja envejecida, ca\*) carnauba envejecida y ce\*) cerasina envejecida. Las réplicas consisten en cinco análisis independientes de cada muestra. Varianza explicada por el modelo 80 %.

En el gráfico de puntuaciones obtenido se aprecia claramente una separación entre las diferentes categorías, mientras que los objetos que

difieren únicamente del estado de envejecimiento de la muestra aparecen solapados. Esta observación está en concordancia con la observación realizada en cuanto a la semejanza ente los valores de  $A(H)/A(C27H)$  y  $A(FA)/A(C16)$  de las ceras naturales patrón frescas y envejecidas. Por otra parte los objetos correspondientes a la cerasina tienen una dispersión elevada, mientras que los de la cera de abeja aparecen más concentrados. La causa de ello radica en la mayor variabilidad en la composición de la cerasina.

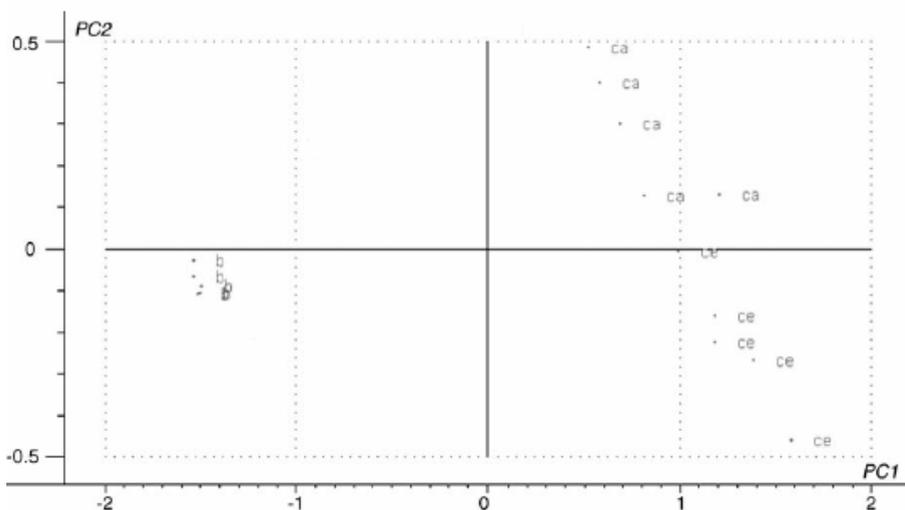
### 2.2.3 Diferenciación de las ceras naturales basada únicamente en la cantidad de hidrocarburos

En numerosas ocasiones, el artista aplica mezclas de sustancias para decorar la superficie de las obras pictóricas, por lo que es habitual encontrar en las muestras reales junto a las ceras otros materiales como pigmentos, aditivos, plastificantes, proteínas, aceites secantes y resinas naturales o sintéticas. La presencia de la mayor parte de estos compuestos en la matriz no afecta a la caracterización de las ceras naturales por la metodología sugerida, excepto en el caso de los aglutinantes lipídicos. Así pues, la hidrólisis liberará también los ácidos grasos de los triglicéridos, los cuales serán analizados junto a los ácidos carboxílicos procedentes de las ceras, distorsionando el modelo construido por PCA.

Con el objetivo de evitar la influencia de los aceites secantes en la identificación de las ceras, se propone la aplicación de un nuevo tratamiento estadístico por Análisis de Componentes Principales, teniendo en cuenta únicamente las proporciones relativas de los hidrocarburos. Así pues, las variables seleccionadas fueron los valores  $A(H)/A(C27H)$  (15), y los objetos estadísticos las réplicas analizadas de cada muestra de cera no envejecida (5 de cada una, en total 15). El gráfico de puntuaciones resultante se representa en la Figura 17.

Los resultados muestran que cada categoría aparece separada de diferenciada de las demás, por lo que este segundo modelo también resulta adecuado para la caracterización de ceras naturales.

En este caso, los objetos estadísticos de la cerasina y carnauba están igualmente dispersos, mientras que los de la cera de abeja aparecen más concentrados. Esto se debe a la menor variabilidad de la cantidad de hidrocarburos en la cera de origen animal. Por otra parte, la cerasina aparece mucho menos dispersa, ya que en su caso la incertidumbre asociada a las medidas de la cantidad relativa de los ácidos carboxílicos era muy elevada.



**Figura 17.** Gráfico para las puntuaciones correspondientes a los PC1 y PC2 construidos aplicando un estudio estadístico por PCA a los datos obtenidos del análisis cromatográfico de las siguientes ceras naturales patrón: b) cera de abeja, ca) carnauba y ce) ceresina. Las réplicas consisten en cinco análisis independientes de cada muestra. Varianza explicada por el modelo 94%.

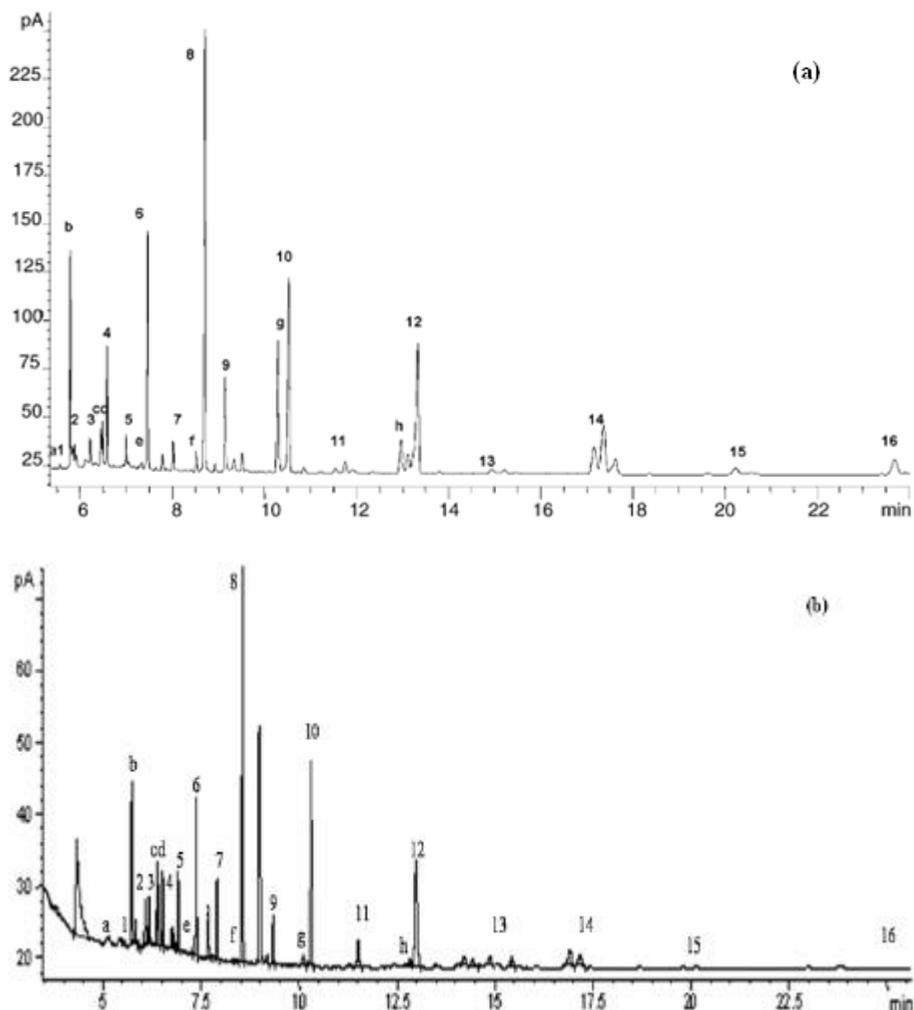
## 2.3 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte

Con el propósito de establecer la capacidad predictora de la metodología propuesta, ésta se aplicó para la caracterización la cera natural empleada por el artista en la elaboración de una obra de arte perteneciente al Patrimonio Cultural Mexicano. Se trata de una oleorresina sobre Tabla de 20 cm x 20 cm (descrita en el apartado 2.3 en el Capítulo IV), y la muestra se obtiene con un escapelo a partir de una zona que contiene pigmento rojo.

### 2.3.1 Aplicación de la metodología a muestras reales

Las muestras procedentes de la obra pictórica se analizaron por GC mediante la metodología propuesta. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 18.

Los resultados obtenidos indican que los alcanos lineales y los ácidos grasos se eluyen sin interferencias por parte de otras sustancias de la matriz. Asimismo, la sensibilidad del método analítico sugerido permite la medida del área de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos, sin asociar una incertidumbre elevada.



**Figura 18.** Cromatograma obtenido del análisis de una muestra procedente de una obra de arte pictórica por GC/FID, mediante la metodología propuesta (b), comparado con el obtenido para la cera de abeja (a) (Figura 15). Picos cromatográficos de los hidrocarburos: 1) C20H, 2) C21H, 3) C22H, 4) C23H, 5) C24H, 6) C25H, 7) C26H, 8) C27H, 9) C28H, 10) C29H, 11) C30H, 12) C31H, 13) C32H, 14) C33H, 15) C34H y 16) C35H, y de los etilderivados de los ácidos grasos: a) C14, b) C16, c) C18:1, d) C18, e) C20, f) C22, g) C24 y h) C26.

### 2.3.2 Identificación de la cera natural presente en la muestra real

Los valores de los cocientes  $A(H)/A(C27H)$  y  $A(FA)/A(16)$ , calculados a partir del análisis por GC de la muestra real, se exponen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Cocientes calculados entre el área de los picos cromatográficos de los alcanos lineales C20H-C35H y el n-heptacosano, y de los etilderivados de los ácidos grasos C14-C26 y del ácido palmítico, para la muestra real.

hidrocarburo	A(H)/A(C27H)	ácido graso	A(FA)/A(C16)
n-eicosano	0,07±0,09	mirístico	0,6±0,1
n-heneicosano	0,5±0,4	oleico	0,4±0,1
n-docosano	0,12±0,07	esteárico	0,6±0,3
n-tricosano	0,2±0,1	araquídico	0,2±0,2
n-tetracosano	0,2±0,1	behénico	0,1±0,2
n-pentacosano	0,4±0,2	lignocérico	0,3±0,4
n-hexacosano	0,3±0,2	cerótico	0,2±0,2
n-octacosano	0,2±0,1		
n-nonacosano	0,73±0,05		
n-triacontano	0,2±0,1		
n-hentriacontano	0,60±0,06		
n-dotriacontano	0,1±0,1		
n-tritriacontano	0,2±0,1		
n-tetracontano	0,06±0,05		
n-pentatriacontano	0,1±0,1		
cera natural en la muestra		cera de abeja	

Valores de la media y desviación estándar a partir de 3 medidas independientes.

Las desviaciones estándar asociadas a las proporciones relativas para hidrocarburos y ácidos carboxílicos son mayores que en el caso de las ceras naturales patrón. Este comportamiento está justificado por la considerable heterogeneidad de las muestras. Asimismo, la composición química se modifica debido a los procesos de degradación causados por agentes externos como la humedad, el calor, la luz solar, agentes medioambientales, etc, cuyos mecanismos son poco conocidos [7,12,26] aumentando la complejidad de la muestra. Los ácidos carboxílicos son en general más sensibles al deterioro [27], y su envejecimiento puede verse influenciado por los pigmentos [165], lo que introduce mayor variabilidad en su cantidad relativa.

La caracterización de la cera natural presente en la muestra se lleva a cabo a partir de los valores obtenidos de A(H)/A(C27H) así como A(FA)/(C16) en el primer modelo construido por PCA, y únicamente los datos calculados de A(H)/A(C27H) para el segundo PCA [291]. En ambos casos, la representación de las puntuaciones de los PC1 y PC2 indica que la muestra real contiene cera de abeja.

### **3. Caracterización de aceites secantes mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de absorción UV-Visible y Fluorescencia**

Los aceites secantes son materiales filmógenos ampliamente presentes en obras de arte pictóricas, y empleados en el ámbito de la conservación y restauración de objetos artísticos. Debido a su importancia, estos materiales oleosos han sido extensamente estudiados por los especialistas en Química Analítica cuyo interés se centra en los materiales presentes en obras de arte, por lo que se han desarrollado una amplia variedad métodos de análisis de estas sustancias. Las metodologías existentes están basadas principalmente en la hidrólisis de los triglicéridos para liberar los ácidos grasos, seguido de una esterificación, o bien efectuar una única etapa mediante transesterificación, cuyos derivados obtenidos se analizan por cromatografía gaseosa [163].

El estudio de ácidos grasos también se realiza sobre otra clase de muestras, notablemente de origen biológico y alimenticio. Sin embargo, en estos casos las metodologías desarrolladas están dirigidas a la cuantificación de los ácidos carboxílicos, habitualmente mediante cromatografía de líquidos. La detección se lleva a cabo principalmente mediante la evaluación de la absorbancia [220-223], fluorescencia [238-243] o por espectrometría de masas [205,214,217,223,243-248]. Los ácidos grasos se someten en estos casos a una etapa previa de derivatización para adecuarlos al detector seleccionado, si resultara necesario.

Los métodos analíticos propuestos se basan en el análisis de los ácidos grasos presentes en las muestras mediante la cromatografía líquida de alta resolución, con detección en un caso por UV-Visible y en otro mediante Fluorescencia. En primer lugar, la muestra se somete a hidrólisis ácida para liberar los ácidos grasos contenidos en los triglicéridos, y posteriormente, éstos se separan por extracción líquido/líquido y se derivatizan por calentamiento mediante un agente cromógeno (2-NPH) o fluorescente (Br-Mmc). La mezcla de ácidos grasos se resuelve en el sistema cromatográfico, previa optimización de las fases estacionaria y móvil, tras lo que los analitos se cuantifican por medio del detector adecuado.

El trabajo realizado se centró en la optimización de los parámetros de reacción (disolvente, pH, concentración, tiempo y temperatura), así como las condiciones de separación cromatográfica y detección (gradiente, fases móviles, longitudes de onda). Asimismo se determinaron los parámetros analíticos como la sensibilidad, el intervalo lineal y el límite de detección. La etapa de optimización se realizó utilizando los ácidos grasos principales en los aceites secantes envejecidos: palmítico, esteárico, oleico y mirístico. Los aglutinantes frescos también contienen grandes cantidades de ácido

linolénico y linoleico pero su proporción disminuye drásticamente debido a su oxidación durante el proceso de secado, por lo que no se consideran esenciales para el estudio analítico propuesto.

La resolución de la mezcla de los ácidos grasos mediante HPLC presenta la ventaja de la separación de los ácidos oleico y esteárico, los cuales, debido a su semejante volatilidad, aparecen en cromatografía gaseosa casi solapados. Los derivatizantes 2-NPH y Br-Mmc son selectivos y forman derivados con elevada sensibilidad, además de reaccionar con los grupos carboxílicos en condiciones de calentamiento no extremo, lo que permite el control del tiempo de reacción.

Los aglutinantes oleosos seleccionados fueron los más habituales en obras pictóricas, los aceites de linaza, nuez y adormidera, todos ellos deteriorados mediante envejecimiento natural y acelerado por calentamiento y por irradiación UV. La caracterización de los aglutinantes se efectuó en función de la cantidad relativa de ácidos grasos. Por último, con el fin de evaluar el método propuesto, se analizaron muestras reales, procedentes de obras pictóricas pertenecientes al Patrimonio Cultural Valenciano.

### **3.1 Optimización del procedimiento experimental**

#### **3.1.1 Obtención de los ácidos grasos a partir de la muestra**

Los ácidos grasos se liberan mediante una hidrólisis ácida por medio de una reacción de ácido clorhídrico concentrado sobre los triglicéridos a 110°C durante 16 h, un método de ruptura de ésteres eficaz y utilizado en la identificación de aglutinantes en obras de arte [163]. Sin embargo, para el presente trabajo se aumentó la concentración de ácido clorhídrico a 12 mol.L<sup>-1</sup>, para incrementar la velocidad y cuantitatividad de la reacción, así como evitar problemas relacionados con la posible evaporación de parte del ácido clorhídrico durante el proceso de calentamiento.

La separación de los ácidos grasos de la matriz se efectúa habitualmente mediante evaporación previa del hidrolizado, y la adición de 50 mL de agua y 50 mL de cloroformo. Los analitos se disolverán preferentemente en la fase más apolar [163]. El disolvente orgánico que se emplea para la extracción de los ácidos grasos es un parámetro de gran importancia para el método analítico. En efecto, un líquido no muy apolar, puede arrastrar parte de la fase acuosa e introducir compuestos hidrofílicos que pueden interferir en la identificación de los ácidos grasos, mientras que un disolvente demasiado hidrofóbico puede no extraer completamente a los ácidos carboxílicos más polares. Se evaluó la capacidad de extracción de diclorometano, cloroformo y n-hexano.

En los dos primeros casos, al añadir el líquido se forma una emulsión inestable en la interfase, y se aprecia que éste toma una coloración amarillenta, semejante al hidrolizado. Esta observación muestra que parte de la fase acuosa se introdujo en la fase orgánica, reconfirmado por el hecho que, tras la evaporación del disolvente apolar, queda un residuo líquido de mucha menor volatilidad, probablemente agua. Además, la similar coloración dificulta la toma de la fracción orgánica. Sin embargo, el n-hexano conserva su coloración transparente tras ser añadido, forma una interfase más estable y nítida, y no se observa la entrada del hidrolizado dentro de la fase orgánica. No obstante, debido a la elevada apolaridad del n-hexano, la extracción de los ácidos carboxílicos menos hidrofóbicos se producirá con un rendimiento menor.

En la Tabla 12 se resumen las características de los disolventes, junto a las observaciones obtenidas en la optimización de la extracción líquido/líquido.

**Tabla 12.** Características de los disolventes empleados y observaciones realizadas durante la extracción líquido/líquido.

disolvente	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	CHCl <sub>3</sub>	n-hexano
características			
momento dipolar (D)	1,55	1,15	0
hidrofobicidad	moderada	elevada	muy elevada
solubilidad en agua (g/100 mL)	1,3	0,8	inmiscible
densidad (g.cm <sup>-3</sup> )	1,325	1,48	0,6548
T ebullición (°C)	39,8	62	69
observaciones			
coloración al interaccionar con la fase acuosa	amarillenta	amarillenta	incolora
interfase	emulsión inestable	emulsión inestable	nítida
residuo líquido tras evaporación	sí	sí	no

Los resultados obtenidos indican claramente que se produce mediante el empleo de n-hexano una separación más adecuada de ambas fases y por tanto una mejor eliminación de la matriz.

En el marco del trabajo realizado, se propone la extracción directa desde el hidrolizado, para evitar la pérdida de analitos durante la evaporación. El volumen añadido de disolvente orgánico se eleva a 250 iL, y se propone repetir la extracción líquido/líquido varias veces, reuniendo las fases orgánicas obtenidas, con el objetivo de incrementar la cuantitatividad. Así pues, se espera separar la totalidad de los ácidos grasos de la matriz, evitando que permanezcan en el hidrolizado.

Para la determinación de los parámetros de recuperación, se toma una muestra de aceite de linaza envejecido térmicamente, tratada mediante el procedimiento experimental propuesto. Así pues, se realizan sucesivas

extracciones líquido/líquido sobre el hidrolizado, hasta que ya no se observa la presencia de analito. En la Tabla 13, se exponen los valores de recuperación obtenidos para cada una de las extracciones.

**Tabla 13.** Rendimiento del procedimiento propuesto a cada una de las extracciones líquido/líquido.

ácido graso	mirístico	palmítico	oleico	esteárico
1ª extracción	(60±20)%	(59±14)%	(60±20)%	(61±14)%
2ª extracción	(84±9)%	(80±4)%	(90±20)%	(84±5)%
3ª extracción	(95±7)%	(90±10)%	(95±8)%	(93±8)%
4ª extracción	(99±2)%	(96±8)%	total	(99±2)%
5ª extracción	total	total	total	total

valores de la media y desviación estándar obtenidas a partir de 3 medidas independientes.

Los resultados obtenidos muestran que la extracción repetida tres veces representa un adecuado equilibrio entre una elevada recuperación y un excesivo alargamiento de la duración del tratamiento previo.

### 3.1.2 Optimización de la etapa de derivatización

#### 3.1.2.1 Reacción un agente cromógeno: 2-nitrofenilhidrazina

El método propuesto incluye una etapa de derivatización con 2-nitrofenilhidrazina, se trata de un agente cromógeno ampliamente utilizado para la determinación de compuestos carboxilados, para obtener las correspondientes nitrofenilhidrazidas de los ácidos grasos. La elección de este reactivo deriva del método propuesto por H. Miwa *et al.* [220,221].

En este caso, la mezcla de ácidos carboxílicos extraídos, disuelta en etanol, reacciona con el 2-NPH.HCl en medio acuoso, catalizado por la mezcla EDC.HCl y piridina en etanol, de acuerdo con H. Miwa *et al.* [220,221,222]. Sin embargo, el reactivo utilizado en el presente trabajo es 2-nitrofenilhidrazina no clorhidratado, cuya principal diferencia consiste en que no se disuelve en agua.

En primer lugar se examinó la solubilidad de la 2-nitrofenilhidrazina en una serie de disolventes y mezclas, cuyo resultado se muestra en la Tabla 14.

Los resultados obtenidos muestran que la 2-nitrofenilhidrazina es soluble en acetona, cloroformo y acetonitrilo/metanol (50/50). Para determinar cual resulta más adecuado como medio de reacción, el procedimiento experimental se aplica sobre 0,1 mL de una disolución 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido mirístico (0,025 ìmol). En medio acetona no se observa ninguna reacción, mientras que en cloroformo se obtiene un pico cromatográfico de área 38±7 u.a. y en acetonitrilo/metanol (50/50 v/v) de

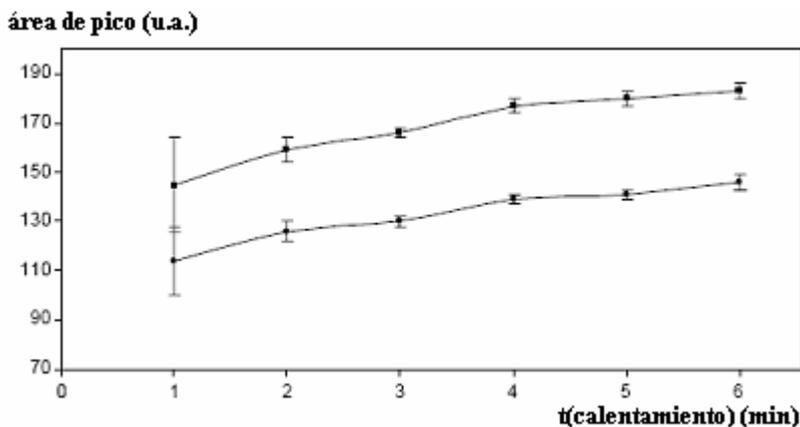
185±3. Este último se selecciona como disolvente de para el reactivo 2-NPH, debido a la solubilidad y sensibilidad que proporciona.

**Tabla 14.** Solubilidad de la 2-NPH en diversos líquidos y mezclas.

disolvente	solubilidad
agua	no
acetona	sí
metanol	no
etanol	no
acetonitrilo	no
cloroformo	sí
hexano	no
metanol/agua	no
etanol/agua	no
acetonitrilo/agua (50/50 v/v)	no
acetonitrilo/metanol (50/50 v/v)	sí
acetonitrilo/etanol (50/50 v/v)	no

La influencia de la concentración de protones en el medio se estableció mediante un estudio de cuantitatividad a diversos pH. En estudios anteriores la derivatización transcurre en medio ácido, proporcionado por el mismo 2-NPH.HCl [220-222]. El método se aplicó a 0,1 mL de una disolución 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> de ácido mirístico, ajustando el disolvente del reactivo 2-NPH a pH 2,3 y pH 7. Las áreas cromatográficas de los picos obtenidos son de 185±3 y 63±3 u.a., respectivamente. Así pues, el disolvente más adecuado para la 2-NPH se establece como una mezcla de HCl 0,01 mol.L<sup>-1</sup> en metanol y acetonitrilo (50/50 v/v). La disolución obtenida presenta una coloración anaranjada.

Algunos autores plantean etapas de calentamiento a temperaturas elevadas durante un prolongado periodo de tiempo [220,221]. En el presente trabajo se sugiere un calentamiento mediante horno microondas, con el objetivo de reducir el tiempo de reacción. Así pues, para evitar que la mezcla reactiva reciba un exceso de energía, se selecciona una baja potencia, 260 W, que además es fácilmente alcanzable por el horno sin que se produzcan fluctuaciones de energía. Para reducir aun más la potencia recibida por la muestra, se propone la introducción de un vaso de precipitados con 250 mL de agua a temperatura ambiente dentro del microondas. Con estas condiciones se pasó a la optimización del tiempo de reacción, aplicando la metodología analítica a una mezcla de ácido palmítico y esteárico 0,25 mmol.L<sup>-1</sup> en etanol (0,025 ìmol en el tubo de reacción). Los valores obtenidos para el área de los picos cromatográficos de ambos analitos se representan en la Figura 19.



**Figura 19.** Representación gráfica del área de los picos cromatográficos de las hidrazidas del ácido palmítico ( ) y esteárico ( ) en función del tiempo de reacción. Valores de la media y desviación estándar de 5 medidas independientes.

Los resultados obtenidos muestran que las áreas permanecen aproximadamente constantes a partir de 6 minutos, por lo que se sugiere que coincide con el máximo rendimiento de la formación de las hidrazidas y se toma como valor óptimo de tiempo de reacción. La duración de la etapa de la derivatización es considerablemente menor al calentamiento en baño de agua (20 minutos) [220-222]. Tras la reacción de derivatización, la mezcla presenta una coloración naranja-amarillento.

Tras la derivatización es conveniente destruir el exceso de reactivo, mediante la adición de 50  $\mu$ L de KOH y calentamiento [220-222], de lo contrario la línea base experimenta una elevación progresiva a partir de 6 minutos, que puede interferir en la medida de los picos cromatográficos. En este caso, el calentamiento se realiza en las mismas condiciones que la reacción de derivatización. El tiempo óptimo de reacción se establece mediante el estudio de la elevación de la línea base y de la estabilidad de las hidrazidas a diferentes tiempos de reacción (Figura 20). Para este estudio se aplicó el método analítico a una disolución de de ácido mirístico  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$  ( $0,025 \text{ } \mu\text{mol}$  en el tubo de reacción).

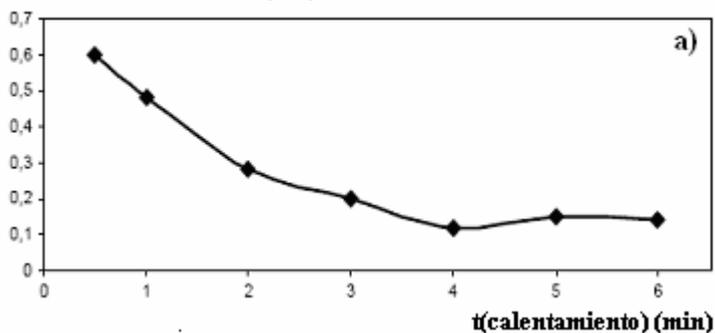
A partir de 3 minutos se observa que la elevación de la línea base alcanza valores asumibles sin afectar a la estabilidad del derivado formado. El cambio de pH provoca una alteración brusca de la coloración, que pasa a violeta oscuro.

Tras el proceso de derivatización, el pH de la mezcla es fuertemente básico, por lo que no es directamente introdurible en el sistema cromatográfico, ya que un exceso de iones hidróxidos puede ser causa un deterioro irreversible de la columna. El procedimiento se modifica mediante la adición de 50  $\mu$ L de HCl 3 M para acidificar el medio. La mezcla se vuelve

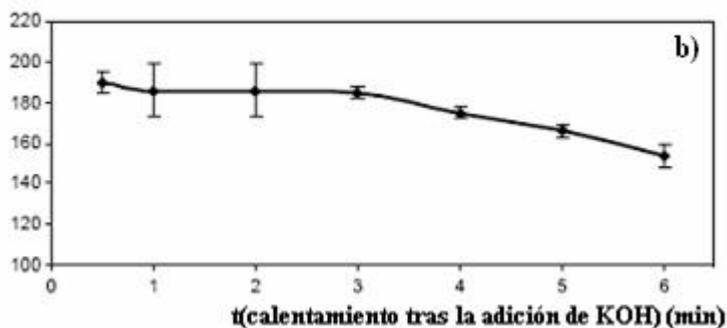
amarillenta, y se aprecia un precipitado de KCl, insoluble en el medio de reacción. La suspensión se elimina filtrando la disolución, la cual ya es directamente inyectable en el sistema cromatográfico.

Las propuestas relativas a la optimización del método permiten obtener resultados fiables, sensibles y reproducibles, con un reducido tiempo de reacción y en condiciones no agresivas para los reactivos y la instrumentación.

**elevación de la línea base (u.a.)**



**área de pico (u.a.)**



**Figura 20.** Representación gráfica de la elevación de la línea base a 6 minutos (a) y el área del pico cromatográfico correspondiente al ácido mirístico (b) en función del tiempo de calentamiento, para la eliminación del exceso de 2-NPH. Valores de la media y desviación estándar de 5 medidas independientes.

### 3.1.2.2 Reacción con un agente fluorógeno: 4-bromometil-7-metoxicumarina

El reactivo 4-bromometil-7-metoxicumarina es un derivatizante de amplio uso en el análisis de compuestos con grupos carboxílicos, especialmente ácidos grasos, mediante HPLC con detector de fluorescencia. En este sentido es de destacar el trabajo de Lam y Grushka, estos autores han propuesto condiciones de derivatización que proporcionan resultados adecuados para los análisis previstos en el presente trabajo [240].

La reacción se produce en baño de agua a 55°C, en este caso no se propone el empleo de horno de microondas, ya que el medio de reacción (acetona y acetonitrilo), no contiene enlaces excitables por irradiación. En este caso no es necesaria una reacción posterior para eliminar el exceso de reactivo, ya que éste no interfiere posteriormente en la separación cromatográfica [240].

La cantidad de reactivo utilizado para la derivatización fue considerada excesiva, dado el reducido contenido de analitos en muestras de origen artístico [7]. Así pues, se toman 0,1 mL de una disolución patrón cuya concentración total de ácidos grasos es de 1 mmol.L<sup>-1</sup>, por lo que en el tubo de Pyrex se encuentran 0,0001 mmol. Al introducir los 0,5 mL de la disolución de Br-Mmc 0,11 g/100 mL, se añaden 0,002 mol de reactivo. La adición de la mitad de Br-Mmc no modifica la sensibilidad y permite consumir una cantidad menor de reactivo.

## 3.1.3 Optimización de las condiciones cromatográficas

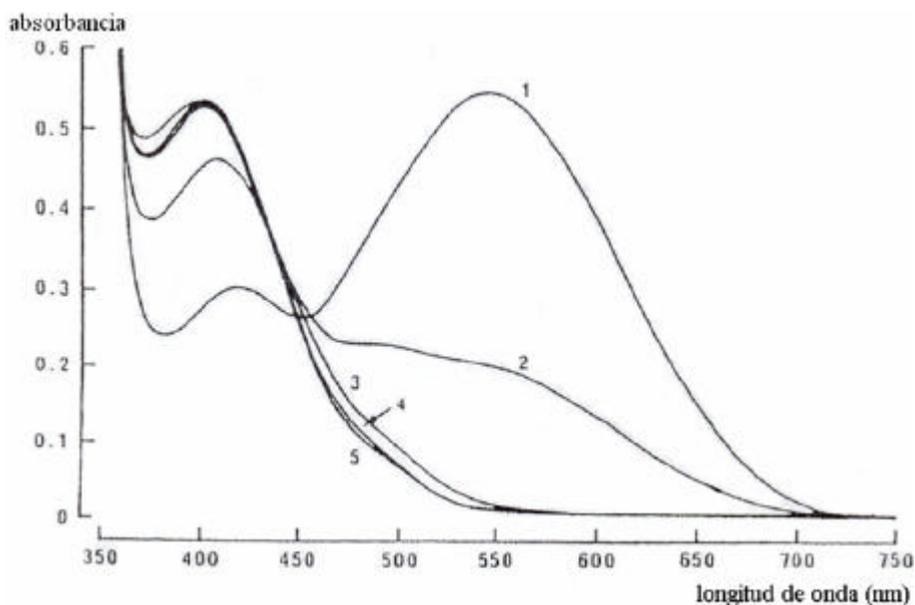
### 3.1.3.1 Separación cromatográfica de las hidrazidas

La resolución de la mezcla de las hidrazidas correspondientes a los ácidos grasos resulta una etapa fundamental para la identificación y cuantificación de los analitos, por lo que resulta primordial que los parámetros instrumentales estén ajustados de forma adecuada.

La fase estacionaria seleccionada para la separación cromatográfica fue una columna apolar Zorbax XDB-C8. Para la resolución de la mezcla de las hidrazidas de los ácidos estudiados (de mirístico a esteárico), a través de una fase estacionaria hidrofóbica, se ha sugerido como fase móvil una mezcla metanol/agua 86/14 en modo isocrático [220]. No obstante, en las condiciones utilizadas el tiempo de retención fue excesivo, y a medida que se reduce la proporción de agua, la disminución del tiempo de retención resulta muy dependiente de la cantidad de metanol, por lo que éstos oscilan con facilidad. La modificación que se propone consiste en la adición de un alcohol más hidrofóbico, manteniendo la cantidad de agua constante, por lo

que se estudió la influencia del etanol, *n*-propanol y *n*-butanol en varias proporciones. Finalmente, la modificación de la fase móvil inicial, con un 5 % de *n*-propanol, manteniendo la cantidad de agua, permitió la obtención de tiempos de retención estables y adecuados (15 min para el ácido esteárico, de mayor hidrofobicidad).

Las propiedades absorbivas de las hidrazidas están influenciadas por el pH del medio. A  $\text{pH} > 12$ , presentan una coloración violeta intensa (máximo a 600 nm), mientras que a pH inferiores a 8,5 el máximo de absorción se desplaza progresivamente al azul [221] (Figura 21).



**Figura 21.** Espectro de absorción de acetato de 2-nitrofenilhidrazida (se derivatizó una cantidad de 0,5  $\mu\text{L}$ ). El medio de reacción se ajustó al cada pH con ácido clorhídrico 3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , a partir de la mezcla obtenida tras la etapa de adición de KOH. Se midió entre los siguientes pH: 1) 13,85; 2) 10,5; 3) 8,5; 4) 6,5 y 5) 4,5.

Por otro lado, la naturaleza de la fase estacionaria obliga a fijar el pH entre 3 y 8 para evitar su deterioro. Con esta restricción, las condiciones ideales resultan a  $\text{pH} \approx 4$  y detección a 400 nm, bajo las cuales se observa un máximo de absorbancia a  $\text{pH} \approx 4$  y 400 nm [221]. La absorción de los analitos presenta otro máximo a 230 nm [221], pero se desecha debido a que es una zona del espectro donde absorbe el metanol, así como subproductos de la derivatización, que provocan una elevación de la línea base a partir de 6 minutos.

La adición de ácidos minerales, como el clorhídrico, para la ajustar el pH de la fase móvil [220], se encuentra totalmente desaconsejada, debido a que, incluso a bajas concentraciones, puede atacar a la instrumentación cromatográfica. Para la acidificación de la fase móvil se propone en este caso la adición de ácido acético glacial, el cual es no agresivo y permite fijar el pH con seguridad.

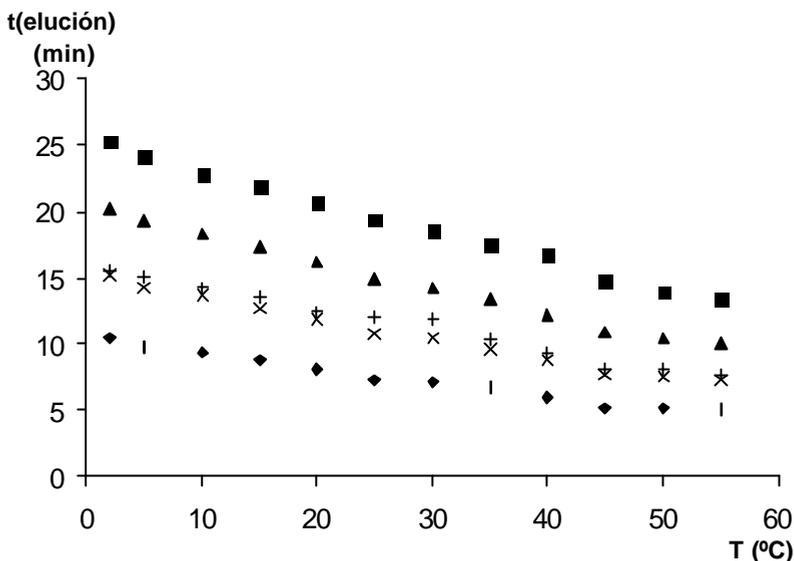
### 3.1.3.2 Resolución de los aductos cumarina-ácido graso

La resolución de la mezcla de ácidos grasos derivatizados con Br-Mmc se lleva a cabo por cromatografía líquida de fase reversa, utilizando mezclas de metanol/agua para la elución. Dada la hidrofobicidad de la fase estacionaria y la apolaridad de los analitos (creciente de mirístico a esteárico), algunos autores han sugerido como fase móvil una mezcla metanol/agua 85/15 en modo isocrático [240].

En el presente trabajo se propuso como fase estacionaria una columna apolar Zorbax XDB-C18 [293]. Con el objetivo de reducir el tiempo de retención, y mejorar la separación, se realizó un amplio estudio de gradientes metanol/agua, comprobando la influencia de los parámetros tales como proporción inicial, pendiente y proporción final. El gradiente de metanol/agua, de 90/10 a 100/0 en 25 minutos se encontró el más adecuado en términos de tiempo de retención (15 minutos para el ácido esteárico), separación y perfil de pico cromatográfico.

La temperatura puede influir en la resolución de la mezcla a través de la entalpía del proceso de desorción del analito de la columna y su disolución en la fase móvil, y de la variación de la viscosidad del líquido eluyente. Como resultado, la temperatura influirá sobre el perfil y el tiempo de retención de los picos cromatográficos.

El uso de un horno termostático permite controlar la temperatura y evitar que su propia variación intra día pueda afectar a la reproducibilidad del método propuesto. El estudio realizado consistió en aplicar el método sugerido a una mezcla de ácidos mirístico, palmítico, oleico, esteárico y araquídico  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$  en cada uno de ellos ( $0,025 \text{ } \mu\text{mol}$  en el tubo de reacción), a temperaturas de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $55^{\circ}\text{C}$ . La presión sobre la bomba aumenta considerablemente al enfriar la fase móvil, mientras que la fase estacionaria se deteriora progresivamente a altas temperaturas. Por ello se desaconseja el uso continuado de temperaturas extremas para la separación cromatográfica. En la Figura 22 se muestra la dependencia del tiempo de retención sobre la temperatura.



**Figura 22.** Representación gráfica del tiempo de retención de los ácidos mirístico (■), palmítico (x), oleico (+), esteárico ( ) y araquídico ( ) en función de la temperatura del horno termostático.

El tiempo de retención disminuye al aumentar la temperatura, sin que se llegue a producir inversión, mientras que la separación entre el palmítico y el oleico es máxima a 30°C. Así pues, esta temperatura intermedia se tomó como adecuado para la separación cromatográfica de los derivados de los ácidos grasos estudiados.

Las longitudes de onda de excitación y emisión, las cuales ejercen una marcada influencia en la sensibilidad y reproducibilidad del método analítico, se optimizaron mediante un procedimiento iterativo. El máximo de excitación anteriormente propuesto se estableció en 325 nm [293], desde del cual se toma el espectro de emisión, cuyo máximo se encuentra a 395 nm. A partir de este valor se traza el espectro de excitación, el cual presenta un máximo a 325 nm. Así pues, las longitudes de onda de excitación y emisión se fijan a 325 nm y 395 nm, respectivamente.

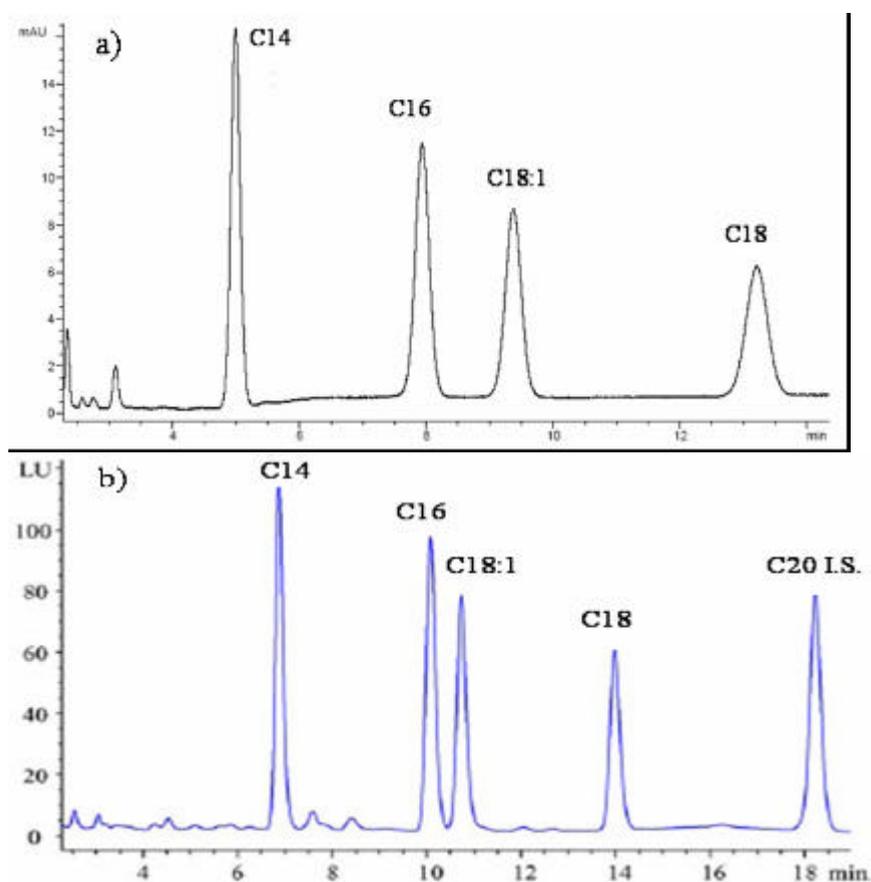
### 3.2 Identificación de los ácidos grasos y determinación de los parámetros analíticos del método

Con el objetivo de establecer la validez de la metodología sugerida, se determinaron los parámetros analíticos, como la selectividad, linealidad, sensibilidad y límite de detección, para los ácidos grasos que se utilizan para la caracterización de los aceites secantes (mirístico, palmítico, oleico y

esteárico).

### 3.2.1 Identificación de los ácidos grasos

Ambas metodologías desarrolladas se aplican al análisis de una mezcla de patrones de ácidos mirístico, palmítico, oleico, esteárico y araquídico, con una cantidad de cada uno de ellos de 0,025  $\mu$ mol, empleando las condiciones de derivatización y separación cromatográficas previamente optimizadas (Figura 23). La identificación de cada uno de los ácidos grasos se realizó a partir de medidas de cada analito de forma independiente y comparando posteriormente los tiempos de retención obtenidos.



**Figura 23.** Cromatogramas obtenidos de una mezcla (0,025  $\mu$ mol) de los ácidos mirístico (C14), palmítico (C16), oleico (C18:1), esteárico (C18) y araquídico derivatizados con 2-NPH bajo las condiciones optimizadas de derivatización y separación cromatográfica para análisis por: a) HPLC-UV-Visible, b) HPLC-Fluorescencia.

Ambas metodologías presentan picos cromatográficos con un perfil gaussiano, y no se observan interferencias entre ellos ni con otras sustancias. El tiempo de retención aumenta a medida que se incrementa la longitud de la cadena carbonada del ácido graso (más hidrofobicidad), y disminuye al introducir insaturaciones.

La resolución cromatográfica en el caso de la metodología propuesta para HPLC-UV-Visible resulta más adecuada, ya que los ácidos palmítico y oleico están más separados y los tiempos de retención son ligeramente menores. Por otra parte, los picos cromatográficos obtenidos por HPLC-Fluorescencia son más estrechos, lo que implica un número superior de platos teóricos.

### 3.2.2 Parámetros analíticos de las metodologías propuestas

El intervalo lineal y los parámetros de sensibilidad de las metodologías sugeridas para el análisis de los ácidos grasos (mirístico, palmítico, oleico y esteárico) se determinan utilizando como patrón interno una cantidad de 0,025  $\mu$ mol de ácido araquídico (Tabla 15). La concentración de los analitos se expresa como cantidad de ácidos grasos añadida al tubo de reacción.

**Tabla 15.** Parámetros analíticos de las metodologías propuestas para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos estudiados.

HPLC-UV-Visible					
ácido graso	A(FA)/A(ara)= (a $\pm$ s <sub>a</sub> ) [FA] (nmol) + (b $\pm$ s <sub>b</sub> )	R <sup>2</sup>	intervalo lineal (nmol)	límite de detección* (nmol)	
	pendiente	ordenada en el origen			
mirístico	32,0 $\pm$ 0,3	-0,01 $\pm$ 0,04	0,9993	3-300	1,5
palmítico	31,9 $\pm$ 0,4	-0,02 $\pm$ 0,05	0,9991	3-300	1,5
oleico	26,9 $\pm$ 0,1	0,03 $\pm$ 0,05	0,9990	3-300	1,5
esteárico	25,4 $\pm$ 0,2	0,01 $\pm$ 0,04	0,9994	3-300	1,5
HPLC-UV-Fluorescencia					
mirístico	32,9 $\pm$ 0,3	0,07 $\pm$ 0,02	0,9990	0,1-180	0,06
palmítico	31,7 $\pm$ 0,7	0,05 $\pm$ 0,06	0,9990	0,1-180	0,06
oleico	29,1 $\pm$ 0,5	0,06 $\pm$ 0,02	0,9992	0,1-180	0,06
esteárico	22,9 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,02	0,9997	0,1-180	0,06

n=6

\*calculado como el triple del cociente entre la desviación del blanco y la sensibilidad.

Los dos métodos analíticos sugeridos para el análisis de ácidos grasos presentan adecuados valores de sensibilidad, intervalo lineal y límites de detección. Sin embargo, con las medidas de fluorescencia se obtiene una sensibilidad 25 veces superior a la absorción UV-Visible.

### 3.3 Estudio analítico de los aceites secantes patrón

Las metodologías más extendidas para la identificación de los aceites secantes están fundamentadas en el cálculo del cociente de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico. La justificación del uso de este parámetro se basa en la invariabilidad del cociente (C16)/(C18) durante el envejecimiento, debido a la estabilidad proporcionada por la ausencia de dobles enlaces [7,294]. El cálculo de la proporción relativa de dos ácidos grasos permite contrarrestar el error sistemático introducido en las diferentes etapas de tratamientos de la muestra.

Otros autores proponen el uso del cociente (C18)/(C16) como parámetro identificativo de los aceites secantes [163]. En efecto, el error sistemático asociado a un cociente es menor cuando el denominador es mayor, como lo muestra la siguiente expresión:

$$e\left(\frac{x}{y}\right) = \frac{ye(x) - xe(y)}{y^2}$$

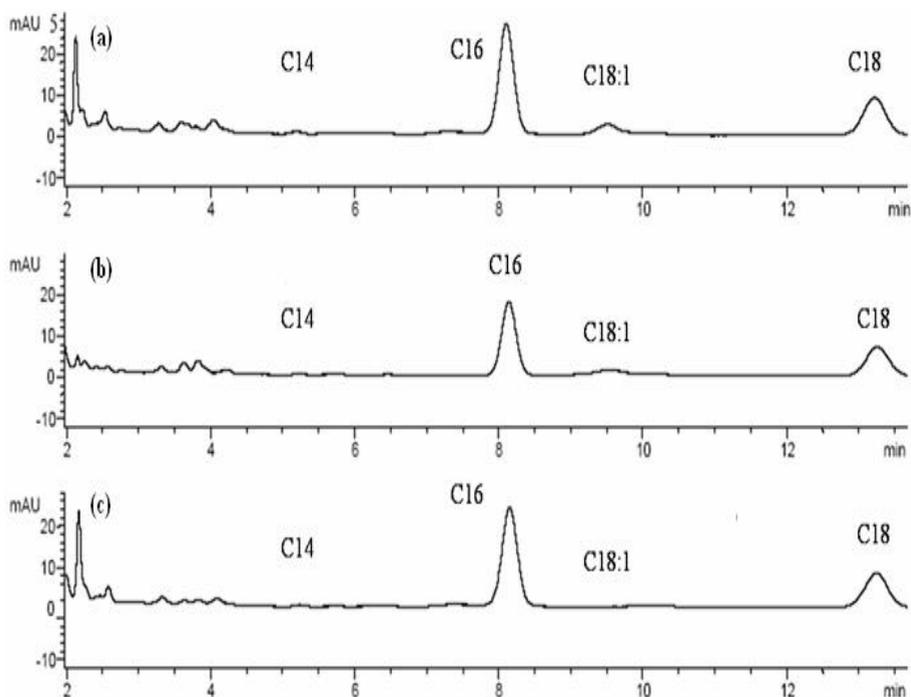
En los aglutinantes lipídicos estudiados (aceite de linaza, nuez y adormidera) la cantidad de ácido palmítico es en todos los casos superior a la de esteárico [163], por lo que se deduce que el cociente (C18)/(C16) presentará un error menor. Dado que además resulta igualmente adecuado para la caracterización de los aceites secantes, se toma en este caso también como parámetro identificativo.

Los ácidos grasos insaturados experimentan una mayor reactividad ante la oxidación, por lo que su cantidad en la muestra se reducirá de forma significativa tras el envejecimiento. Sus correspondientes proporciones relativas no resultan adecuadas para la caracterización del aceite secante, pero son útiles para el estudio del envejecimiento. Así pues, la comparación de las cantidades relativas de ácidos grasos permite tanto la caracterización de aglutinante lipídico como analizar la influencia del envejecimiento en la composición química.

#### 3.3.1 Aplicación de los métodos analíticos propuestos a patrones de aceites secantes

Las metodologías propuestas se aplicaron sobre muestras procedentes de patrones de tres clases de aceites secantes (linaza, nuez y adormidera) ampliamente utilizados para la decoración de pinturas al óleo. Se estudiaron

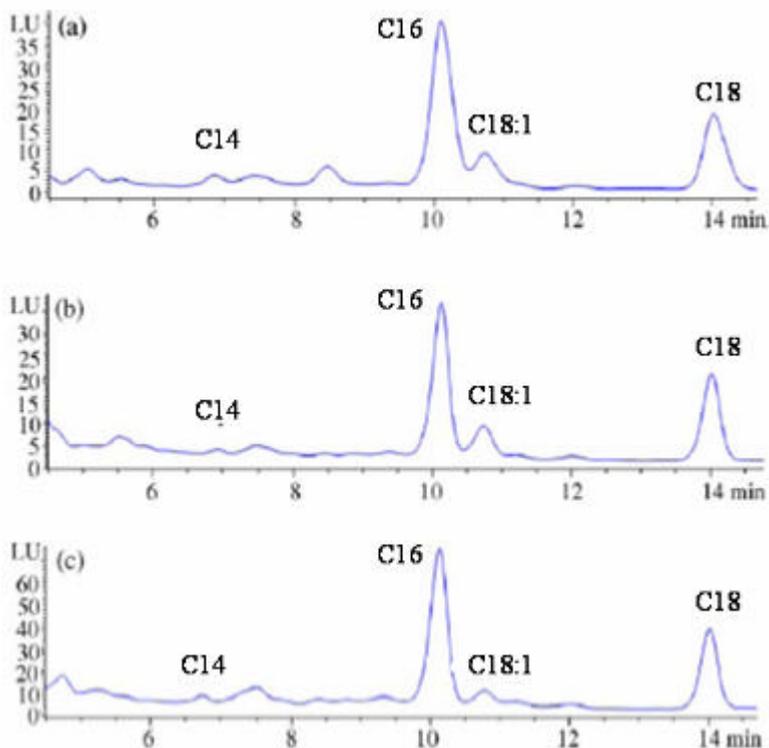
muestras de aceite secante fresco, así como sometidas a diversos tratamientos de envejecimiento: natural, acelerado térmicamente y por irradiación UV (descritos en el apartado 3.2 del Capítulo IV). Los cromatogramas correspondientes al estudio de aceite de linaza mediante HPLC-UV-Visible y HPLC-Fluorescencia se muestran en las Figuras 24 y 25, respectivamente.



**Figura 24.** Cromatograma obtenido por la separación de los ácidos grasos derivatizados con 2-NPH/1-EDC.HCl bajo las condiciones optimizadas, y extraídos tras la hidrólisis de muestras procedentes de aceite de linaza patrón envejecido: a) naturalmente durante cinco años, b) acelerado térmico, c) bajo irradiación. Las condiciones instrumentales de HPLC-UV-Vis son análogas a las expuestas en la Figura 23.

En ambos casos los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos estudiados aparecen sin interferencias por parte de otras sustancias presentes en los aceites patrón. Por otra parte, los resultados muestran que la sensibilidad del método es suficiente en ambas

metodologías para la cuantificación de los ácidos grasos procedentes de los aglutinantes lipídicos patrón.



**Figura 25.** Cromatograma obtenido por la resolución una mezcla de los ácidos grasos derivatizados con 4-bromometil-7-metoxicumarina en condiciones optimizadas, obtenida a partir de una muestra procedente de aceite de linaza sometido a envejecimiento: a) natural durante 5 años, b) acelerado térmicamente, c) acelerado por irradiación UV. Condiciones cromatográficas análogas a las expuestas en la Figura 23.

### 3.3.2 Caracterización de los aceites secantes

Los cocientes entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los ácidos grasos y el ácido palmítico se determinan para cada aceite secante patrón (linaza, nuez y adormidera), teniendo en cuenta si el aceite es fresco o sometido a tratamiento de envejecimiento (natural o acelerado térmicamente o por irradiación UV). Los resultados obtenidos empleando la técnica de cromatografía líquida con detección por absorción

UV-Visible y Fluorescencia se muestran en la Tabla 16 y 17, respectivamente.

**Tabla 16.** Valores de los cocientes (C14)/(C16), (C18:1/C16) y (C18/C16), obtenidos aplicando la metodología propuesta empleando HPLV-UV-Visible, para cada aglutinante lipídico estudiado y clase de envejecimiento aplicado.

aceite secante	envejecimiento	C14/C16	C18:1/C16	C18/C16
linaza	fresco	0,03±0,02	2,6±0,3	0,54±0,01
	natural 5 años	0,035±0,005	0,16±0,03	0,55±0,05
	térmico	0,029±0,008	0,19±0,03	0,61±0,03
	irradiación UV	0,03±0,02	0,02±0,03	0,54±0,02
nuez	fresco	0,030±0,003	2,03±0,01	0,30±0,01
	natural 5 años	0,019±0,003	0,18±0,04	0,32±0,01
	térmico	0,030±0,012	0,36±0,04	0,34±0,05
	irradiación UV	0,020±0,017	0,010±0,008	0,31±0,04
adormidera	fresco	0,06±0,03	1,36±0,01	0,18±0,01
	natural 5 años	0,017±0,008	0,035±0,004	0,21±0,01
	térmico	0,094±0,0003	0,14±0,02	0,21±0,02
	irradiación UV	0,009±0,002	0,013±0,006	0,190±0,003

Valores de la media y desviación estándar a partir de 5 medidas independientes.

**Tabla 17.** Valores de los cocientes entre las áreas de los picos correspondientes a los ácidos carboxílicos de interés y el ácido palmítico, obtenidos aplicando la metodología propuesta para el análisis por HPLV-UV-Fluorescencia a cada aglutinante lipídico estudiado y clase de envejecimiento aplicado.

aceite secante	envejecimiento	C14/C16	C18:3/C16	C18:2/C16	C18:1/C16	C18/C16
linaza	fresco	0,03±0,01	7±1	3±1	3,5±0,5	0,48±0,05
	natural 5 años	0,04±0,01	-	-	0,20±0,01	0,49±0,01
	térmico	0,014±0,004	-	-	0,21±0,05	0,59±0,03
	irradiación UV	0,05±0,01	-	-	0,07±0,01	0,49±0,03
nuez	fresco	0,03±0,02	2±1	8±1	2,0±0,3	0,28±0,03
	natural 5 años	0,06±0,03	-	-	0,18±0,04	0,31±0,03
	térmico	0,015±0,005	-	-	0,26±0,07	0,31±0,06
	irradiación UV	0,02±0,01	-	-	0,03±0,01	0,29±0,05
adormidera	fresco	0,04±0,03	0,04±0,04	3±1	1,7±0,2	0,16±0,03
	natural 5 años	0,021±0,009	-	-	0,04±0,02	0,21±0,04
	térmico	0,04±0,01	-	-	0,088±0,007	0,24±0,03
	irradiación UV	0,011±0,003	-	-	0,029±0,002	0,19±0,01

Valores de la media y desviación estándar a partir de 5 medidas independientes.

Ambas metodologías analíticas propuestas aplicadas al estudio de aceites secantes frescos y envejecidos arrojan resultados semejantes.

Los ácidos poliinsaturados se encuentran en grandes proporciones en las muestras frescas, y su cantidad disminuye drásticamente durante el proceso de deterioro. Los ácidos linoleico (triinsaturado) y linoleico

(diinsaturado) llegan a desaparecer completamente durante el proceso de secado, por lo que no se encontrarán en muestras reales. Este resultado coincide con la descripción del proceso de deterioro expuesto en el apartado 1.4.4 del capítulo III).

En todos los casos el ácido oleico se encuentra en proporciones elevadas en las muestras de aceite fresco, y su concentración se reduce drásticamente al envejecer, debido al doble enlace presente en su estructura. Esto resulta aún más acusado en el envejecimiento por irradiación UV, por lo que se considera que este tratamiento resulta más agresivo para el aceite secante. Por otra parte, no se establece relación entre el cociente  $(C18:1)/(C16)$  y el origen de la muestra, por lo que este parámetro se considera únicamente orientativo acerca del proceso de deterioro de la muestra.



**Figura 26.** Obra pictórica “La Virgen de los Desamparados”, anónimo y perteneciente al Museo Mariano de la Basílica de los Desamparados, Valencia)

El aceite de linaza es el aglutinante lipídico más rico en ácidos grasos con dobles enlaces, especialmente linolénico, coincidiendo con sus superiores propiedades secantes. Por su parte, el aceite de nuez contiene principalmente ácido linoleico, y en menor medida linolénico y oleico, por lo

que su proceso de deterioro es algo más lento. El aceite de adormidera contiene mucha menor proporción de ácidos carboxílicos con dobles enlaces, por lo que experimenta los mecanismos de degradación mucho más lentamente y se considera como semisecante.

El ácido mirístico se encuentra en todos los casos en una cantidad muy reducida, y además no se deduce relación clara entre el cociente C14/C16 y el origen del aceite o el tipo de envejecimiento, por lo que se considera que no aporta información significativa.

El cociente esteárico/palmitico varía claramente en función del origen de la muestra, y resulta prácticamente independiente del tratamiento de envejecimiento. Esto se debe a la falta de dobles enlaces en su estructura, lo que aumenta su resistencia frente a los procesos de degradación del aceite secante. Por lo tanto, se considera que el cociente (C18)/(C16) es el parámetro discriminante adecuado para la caracterización de los diferentes aglutinantes oleosos.

### **3.4 Estudio analítico de muestras procedentes de obras de arte**

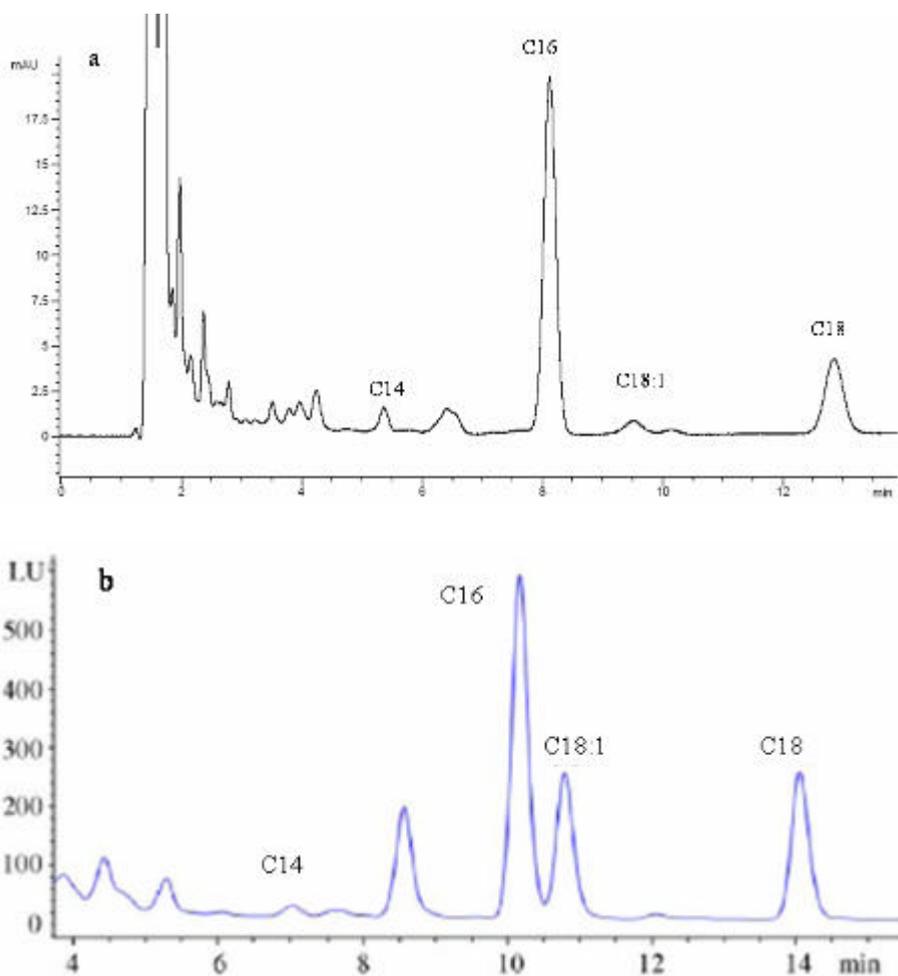
Con el propósito de establecer la capacidad de caracterización de las metodologías sugeridas, se analizaron muestras procedentes de pinturas al óleo.

La Figura 26 muestra una de las obra pictórica seleccionadas para el estudio analítico, titulada “La Virgen de los Desamparados”, anónimo y perteneciente al Museo Mariano de la Basílica de los Desamparados, Valencia (Muestra 14).

Las muestras procedentes de obras de arte presentan mayor dificultad en su estudio que los patrones, debido a la presencia en la matriz de otras sustancias como pigmentos, barnices y aditivos, que pueden interferir en la identificación del aglutinante lipídico aplicado por el artista. Otro impedimento añadido consiste en la baja proporción relativa de aceite secante y la reducida cantidad de muestra disponible (<1 mg), por lo que se exige una sensibilidad elevada.

#### **3.4.1 Aplicación de los métodos propuestos a una muestra de pintura al óleo**

Las muestras procedentes de las obras pictóricas fueron sometidas a los procedimientos experimentales propuestos con el fin de caracterizar los aceites secantes que contienen. En la Figura 27 se muestran los cromatogramas correspondientes al estudio analítico de la muestra procedente de la obra pictórica “Crucifixión”, anónima, pero asignada a Tintoretto.



**Figura 27.** Cromatograma obtenido a partir de una muestra procedente de la pintura al óleo “Crucifixión”, del siglo XVII, anónima aunque asignada a Tintoretto, mediante las metodologías propuestas por a) HPLC-UV-Visible y b) HPLC-Fluorescencia.

Ambas metodologías propuestas son lo suficientemente sensibles y selectivas para el estudio analítico de muestras procedentes de obras pictóricas, ya que los picos obtenidos son cuantificables y no interfieren con otras sustancias de la matriz.

3.4.2 Identificación del Caracterización de aglutinantes lipídicos en muestras procedentes de obras pictóricas al óleo

La caracterización de los aceites secantes en muestras procedentes de obras pictóricas al óleo, descritas en el apartado 3.3 del capítulo IV (Muestras de 6 a 10), se llevó a cabo a partir de la proporción relativa de ácidos grasos. Así pues, los valores de los cocientes mirístico/palmitico, oleico/palmitico y esteárico/palmitico, obtenidos al aplicar las metodologías analíticas propuestas por HPLC-UV-Visible y HPLC-Fluorescencia se muestran en la Tabla 18 y 19, respectivamente.

**Tabla 18.** Valores para los cocientes de las áreas de los picos cromatográficos respecto al del ácido palmítico, obtenidos mediante estudio analítico por HPLC-UV-Visible.

muestra	C14/C16	C18:1/C16	C18/C16	aceite secante sugerido
6	0,10±0,01	0,10±0,06	0,7±0,2	linaza
7	0,08±0,04	0,08±0,07	0,33±0,02	nuez
8	0,21±0,07	0,26±0,10	0,53±0,07	linaza
9	0,08±0,02	1,1±0,2	0,55±0,10	linaza
10	0,07±0,03	0,08±0,02	0,66±0,16	linaza

Valores de la media y desviación estándar obtenidos a partir de tres medidas independientes de tres muestras diferentes tomadas de la obra de arte.

**Tabla 19.** Valores calculados para los cocientes mirístico/palmitico, oleico/palmitico y esteárico/palmitico a partir de la metodología analítica propuesta empleando HPLC-Fluorescencia.

muestra	C14/C16	C18:1/C16	C18/C16	aceite secante sugerido
6	0,11±0,01	0,5±0,1	0,43±0,06	linaza
7	0,22±0,03	0,5±0,2	0,35±0,05	nuez
8	0,18±0,04	0,6±0,3	0,45±0,05	linaza
9	0,20±0,08	0,28±0,07	0,7±0,1	linaza
10	0,28±0,05	0,35±0,09	0,43±0,08	linaza
11	0,33±0,09	0,38±0,09	0,7±0,2	linaza
12	0,6±0,1	0,6±0,1	0,51±0,09	linaza
13	0,4±0,1	0,5±0,2	0,55±0,06	linaza
14	0,18±0,7	0,2±0,1	0,6±0,2	linaza

Valores de la media y desviación estándar obtenidos a partir de tres medidas independientes de tres muestras diferentes tomadas de la obra de arte.

Los resultados obtenidos muestran que las desviaciones estándar encontradas en las muestras reales son más elevadas que en el caso de los aceites secantes patrón, debido a la considerable complejidad y heterogeneidad de las obras de arte pictóricas [7]. Asimismo, la discrepancia entre los resultados proporcionados por las dos metodologías puede ser debida a la misma falta de homogeneidad de las muestras.

Los cocientes calculados para las muestras procedentes de obras pictóricas no coinciden con los obtenidos con los obtenidos a partir de los

aceites secantes patrón envejecidos. En efecto, los procesos de deterioro que experimentan las muestras reales difieren de los tratamientos aplicados. En general, una obra de arte no se expone a elevadas temperaturas, excepto en incendios ocasionales, ni tampoco recibe grandes dosis de radiación UV, al exhibirse habitualmente dentro de edificios (museos, castillos, iglesias, monasterios, etc) donde se encuentran resguardadas de la luz solar directa. Por otra parte, las muestras de aceites secantes degradadas sin tratamiento tampoco se pueden considerar representativo, ya que las muestras de aglutinantes oleosos se dejaron degradar naturalmente durante cinco años, mientras que las pinturas de al óleo estudiadas tienen como mínimo tres siglos. Los procesos de envejecimiento que experimenta una muestra real está determinada por las agresiones medioambientales (humedad, oxígeno, microorganismos, agentes químicos, temperatura, luz solar, etc), que dependen de la historia de la obra de arte y son habitualmente desconocidas y difícilmente modelizables [7,12]. Además, los pigmentos inorgánicos presentes en la obra pictórica pueden acelerar o retardar la degradación de algunos ácidos grasos [18].

Los cocientes oleico/palmítico y mirístico/palmítico, obtenidos son en todos los casos más elevados que los obtenidos en los aceites secantes envejecidos, probablemente debido a la protección de los cationes metálicos de los pigmentos, o a las diferencias entre los mecanismos naturales y artificiales de envejecimiento.

Los valores de C18/C16 para todas las muestras se mantienen entre 0,43 y 0,7, excepto en el caso de las muestras 2 y 4. Esto indica que la mayoría de obras de arte decoradas al óleo se empleó aceite de linaza, debido principalmente a sus superiores propiedades secantes. En la Muestra 7 se caracterizó aceite de nuez, probablemente aplicado por el artista para obtener un secado más lento. Por otro lado, el aceite de adormidera no se detectó en ninguna muestra real.

#### **4. Caracterización de aglutinantes proteicos y oleosos mediante espectrometría de masas por infusión directa**

Los aglutinantes proteicos y oleosos cumplen importantes funciones en la obra artística, y son materiales apreciados en el campo de la conservación y restauración, debido principalmente a sus capacidades filmógenas. Estas sustancias han sido ampliamente estudiadas y se dispone de diversas metodologías dirigidas a la identificación de proteínas y aceites secantes en muestras procedentes de obras pictóricas, principalmente mediante GC [160,162,163,165] y HPLC [212], tal y como se detalla en los apartados 2.2 y 2.4 del Capítulo III. No obstante, los procedimientos experimentales incorporan etapas intermedias de derivatización y de separación previas a la detección, que pueden afectar a principalmente a la exactitud, precisión y linealidad del método, y por tanto a la fiabilidad de la caracterización.

Los parámetros analíticos de una metodología dependen de la exactitud y precisión de cada una de las etapas involucradas. Por lo tanto, la simplificación del procedimiento experimental mediante la eliminación de etapas intermedias, permitirá minimizar la introducción de fuentes de varianza y aumentar la sencillez, rapidez, robustez, reproducibilidad, precisión y exactitud del método analítico.

Las etapas intermedias que se introdujeron en el estudio analítico de proteínas y aceites secantes son la extracción, derivatización y separación cromatográfica. La etapa de derivatización es habitualmente imprescindible para la detección en HPLC [212,220,240] y para aumentar la volatilidad de los analitos en GC [160,162,163,165]. La aportación de incertidumbre se debe a los parámetros de la reacción, como cuantitatividad, variabilidad del rendimiento e inestabilidad de los derivados. Por su parte, la etapa de resolución cromatográfica puede introducir fuentes de varianza, debido a la manipulación de disolventes y sales que pueden afectar a los derivados analizados, así como interferencias por parte de otras sustancias de la matriz o de productos secundarios de la reacción. En general, la introducción de etapas cuyos procedimientos sean largos y complejos, pueden causar pérdida de precisión debido a errores experimentales. Asimismo, estas etapas consumen generalmente reactivos y disolventes tóxicos, por lo que su exclusión proporciona una metodología más sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

El método de análisis de aglutinantes que se propone está basado en la hidrólisis de las proteínas o aceites secantes, la extracción de los aminoácidos o ácidos grasos, respectivamente, y su detección mediante la espectrometría de masas. La nebulización e ionización de la disolución de la

muestra se realizan mediante una fuente de electronebulización (ESI), evitando la fragmentación de las sustancias introducidas, las cuales se identifican a partir del ion con  $m/z$  equivalente a su masa molecular y se cuantifican a partir de la abundancia relativa del correspondiente ion. El método propuesto tiene la ventaja de permitir la identificación de todos los aminoácidos, incluyendo la arginina, que no se identifica en GC [160,162] así como la prolina, 4-hidroxiprolina y cisteína, que no se detectan en HPLC (apartado 1 del presente Capítulo). El análisis por espectrometría de masas directa permite la identificación de todos los ácidos grasos, incluso de cadena corta o insaturados. El principal inconveniente radica en que no se pueden caracterizar simultáneamente otros materiales que pueden estar presentes en las muestras procedentes de obras pictóricas, como barnices o ceras.

El trabajo realizado se centró en el estudio de la etapa de tratamiento de la muestra (hidrólisis, extracción y empleo del disolvente adecuado) así como en la optimización de las condiciones instrumentales del espectrómetro de masas, como presión y temperatura del nebulizador, caudal de la corriente del gas secante, anchura del barrido, masa enfocada y polaridad del detector.

Por último, la cantidad relativa de aminoácidos o ácidos grasos se considera como parámetro característico de cada clase de aglutinante. Los datos obtenidos para cada patrón se utilizan para la construcción de un modelo estadístico mediante Análisis Discriminante Lineal (LDA), una herramienta quimiométrica que permite aumentar la fiabilidad de la caracterización. Finalmente, la metodología propuesta se aplicará sobre muestras reales pertenecientes al Patrimonio Cultural Valenciano.

## 4.1 Optimización del tratamiento de muestra

### 4.1.1 Aglutinantes proteicos

La optimización de las condiciones de hidrólisis para muestras que contienen proteínas se detallan en el apartado 1.1.1 del presente Capítulo.

La detección se realiza bajo polaridad positiva, por lo que los analitos deben de estar totalmente protonados para obtener una sensibilidad óptima. El HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  en agua es un excelente disolvente para los aminoácidos (apartado 1.1.1 del presente Capítulo), y mantiene una cantidad suficiente de protones en el medio. Sin embargo, la entrada de agua en el nebulizador del espectrómetro de masas no resulta adecuada, debido a su elevada tensión superficial y la baja volatilidad. Así pues, la mezcla de aminoácidos se disuelve en 2 mL de una mezcla HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  en agua/etanol 1:1.

La posible influencia de la hidrólisis sobre los analitos se estudio mediante el análisis cuantitativo de cada uno de los aminoácidos

(1 mmol.L<sup>-1</sup>) por separado, antes y después de ser sometidos al proceso de hidrólisis (detallado en el apartado 1.5.1 del Capítulo IV), sin que se observaran modificaciones significativas de la sensibilidad.

#### 4.1.2 Aglutinantes oleosos

La descomposición de los triglicéridos se realiza mediante una saponificación [18]. Las condiciones experimentales fueron optimizadas para el análisis de aceites, completando la reacción en un tiempo en alrededor de 2 minutos, contrariamente a las 16 horas para la hidrólisis ácida (expuesta en el apartado 3.1.1 del presente Capítulo).

Las sales carboxílicas obtenidas son insolubles en disolventes apolares, por lo que se acidifica el residuo sólido para producir los correspondientes ácidos grasos. Estos últimos se extraen con n-hexano (apartado 3.1.1 de este capítulo), que permite dejar atrás las interferencias polares, así como el cloruro de potasio formado.

La detección se realizó bajo polaridad negativa, por lo que los analitos se introdujeron desprotonados en un medio fuertemente básico. Por otra parte, la inyección de disoluciones salinas concentradas en el espectrómetro de masas es desaconsejable, por lo que los ácidos grasos se disuelve en KOH 40 mmol.L<sup>-1</sup> en n-propanol/metanol 85/15. Este medio proporciona una adecuada desprotonación y disolución de los ácidos grasos, sin resultar dañino para la instrumentación.

La mezcla de analitos se introdujo en el nebulizador a través de un capilar de sílice fundida, impulsada por la aplicación de presión externa. La automatización del impulso de la disolución de la muestras hacia el nebulizador proporciona una elevada estabilidad en el caudal de entrada, y por tanto aumenta la reproducibilidad del método analítico. Por otra parte, el volumen de muestra introducido se reduce hasta 0,1 mL, por lo que los analitos se diluyen en una menor cantidad de líquido, aumentando la sensibilidad.

### 4.2 Identificación de los analitos

#### 4.2.1 Aminoácidos

La identificación de los analitos se realizó bajo ambas polaridades (positiva y negativa), ya que los aminoácidos tienen la capacidad tanto de captar como liberar protones. La detección en forma de cationes proporcionó una mayor sensibilidad en las medidas, en este caso la identificación de los aminoácidos se realizará partir de los correspondientes aductos [AA+H]<sup>+</sup> con [M+H]<sup>+</sup> *m/z*. Tal y como se detalla en la sección 1 de este Capítulo,

glutamina, asparaguina y triptófano desaparecen durante la hidrólisis, por lo que no se consideran en el estudio analítico. Leucina, isoleucina y 4-hidroxiprolina tienen la misma masa molecular, por lo que sus iones se solapan en el espectro de masas. La diferenciación de dichos analitos que se propone está basada en la comparación de los espectros de masas de segundo grado ( $MS^2$ ), obtenidos a partir de la fragmentación de los iones moleculares. Así pues, la isoleucina y la leucina siguen siendo indistinguibles, mientras que la 4-hidroxiprolina proporciona un  $MS^2$  claramente diferenciado. No obstante, en las muestras de proteínas patrón no se encontró 4-hidroxiprolina, por lo que este aminoácido no se incluye en el estudio analítico. Asimismo, leucina e isoleucina se consideraron de forma conjunta.

Los aminoácidos seleccionados para el estudio analítico, el etiquetado de sus correspondientes iones y sus masas moleculares se exponen en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Parámetros analíticos de los aminoácidos estudiados.

amino ácido	masa molecular ( $g \cdot mol^{-1}$ )
glicina	75,07
alanina	89,09
serina	105,09
prolina	115,13
valina	117,15
treonina	119,12
cisteína	121,15
leucina+isoleucina	131,17
ácido aspártico	133,10
lisina	146,16
ácido glutámico	147,13
metionina	149,21
histidina	155,16
fenilalanina	165,19
arginina	174,20
tirosina	181,19

La equivalencia entre los iones y los aminoácidos se comprobó mediante análisis independientes de cada uno de ellos.

#### 4.2.2 Ácidos grasos

Los ácidos grasos se detectan en el espectrómetro de masas aprovechando sus propiedades ácidas bajo polaridad negativa, por lo que se introducen en el nebulizador en forma de carboxilato. Cada analito se detecta como ion  $R-COO^-$ , del valor  $m/z$  equivalente a  $[M-H]^-$ .

La espectrometría de masas permite la identificación de numerosos ácidos grasos, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados inestables causantes de las propiedades secantes, así como los productos de

descomposición como los ácidos de cadena corta y los ácidos dicarboxílicos. Estos últimos, son doblemente ácidos y en este caso se detectan a partir del ion monodesprotonado de masa molecular  $[M-H]^-$ . Los ácidos grasos seleccionados para el estudio analítico, sus correspondientes iones y masas moleculares se detallan en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Parámetros analíticos de los ácidos grasos estudiados.

Acido graso	Ion $[M-H]^-$ ( $m/z$ )
caprílico (C8)	143*
pelargónico (C9)	157
capríco (C10)	171
subérico (diC8)	173
eicosanoico (C11)	185
azelaico (diC9)	187
láurico (C12)	199*
sebácico (diC10)	201
mirístico (C14)	227*
palmitoleico (C16:1)	253
palmítico (C16)	255*
linolénico (C18:3)	277
linoleico (C18:2)	279
oleico (C18:1)	281*
esteárico (C18)	283*

\* La equivalencia entre los iones y los ácidos grasos indicados se comprobó mediante análisis independientes de cada uno de ellos.

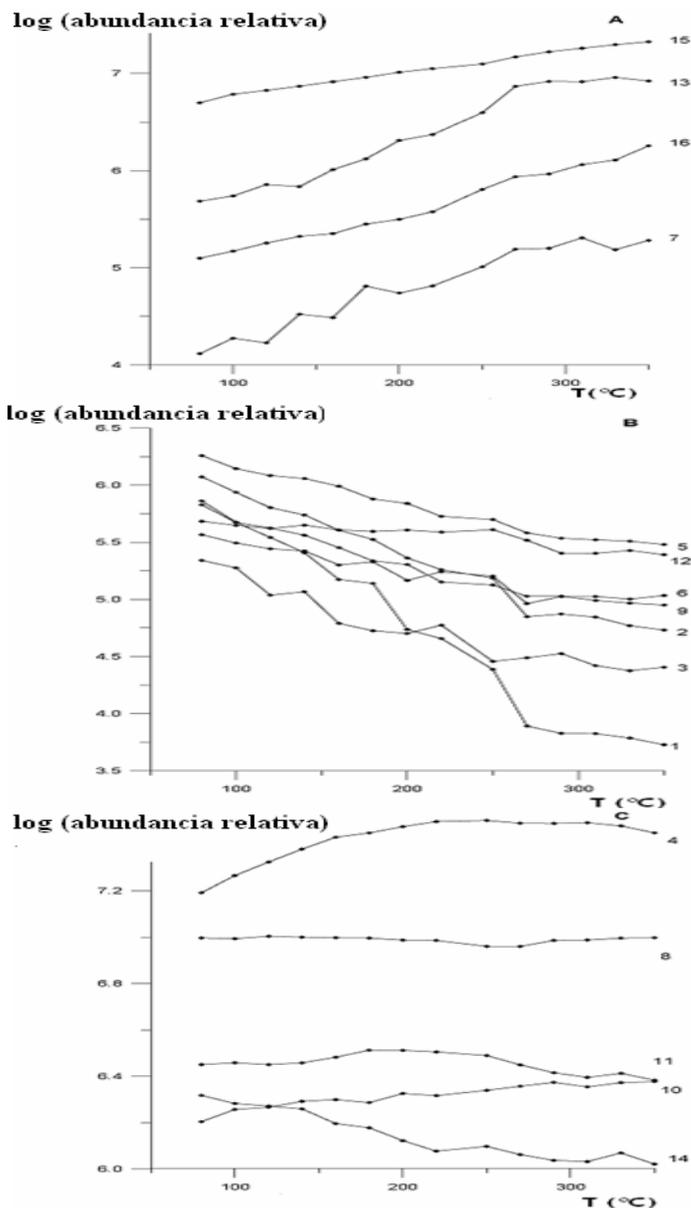
### 4.3 Optimización de los parámetros instrumentales

#### 4.3.1 Detección de los aminoácidos

Las condiciones instrumentales se optimizaron empleando como muestra la mezcla de aminoácidos procedente de la hidrólisis de gelatina bovina. El barrido del detector (50-300  $m/z$ ) cumple ampliamente el intervalo de masas de los analitos, y se deja un margen superior para detectar posibles productos secundarios o péptidos.

La precisión y la sensibilidad de las medidas disminuyen para iones de masas moleculares alejados de la masa molecular ( $m/z$ ) a la que se focalizan las medidas. Un estudio realizado a varios valores mostró que este efecto era mucho más acusado para los iones ligeros, por lo que para el presente estudio se comprobó que los mejores resultados se obtuvieron empleando como masa molecular enfocada un valor de 90  $m/z$ .

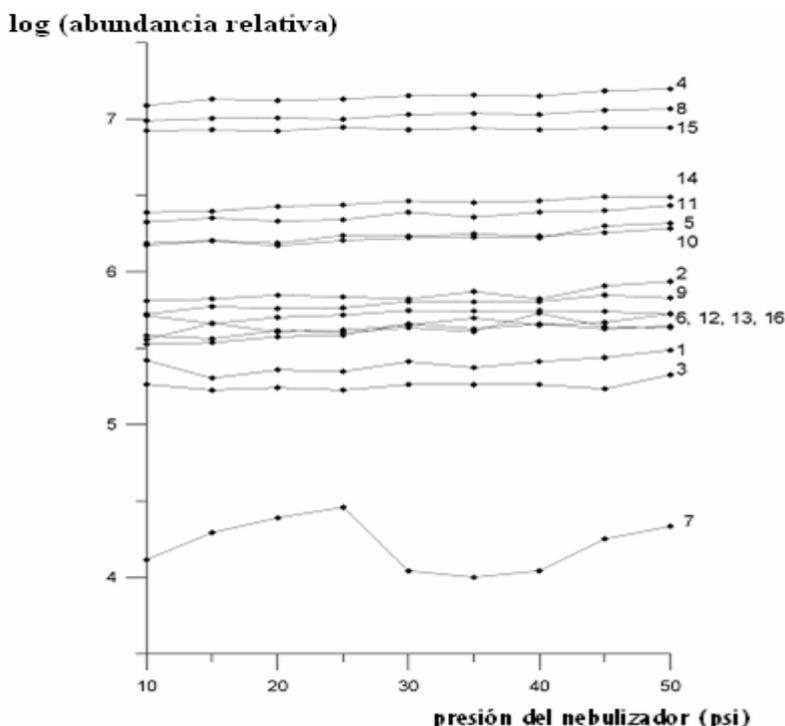
La optimización de la temperatura se realizó entre 80°C y 350°C. Las representaciones gráficas de los valores del logaritmo de abundancia relativa frente a la temperatura de secado se pueden observar en la Figura 28.



**Figura 28.** Logaritmo decimal de las abundancias relativas de los iones correspondientes a los aminoácidos a partir de la hidrólisis de una gelatina bovina, detectados mediante espectrometría de masas directa en función de la temperatura. Condiciones instrumentales optimizadas, presión del nebulizador 25 psi y caudal del gas secante 8 L.min<sup>-1</sup>. Aminoácidos (numerados en orden de masa molecular): A): (7) cisteína, (13) histidina, (15) arginina, (16) tirosina, B) (1) glicina, (2) alanina, (3) serina, (5) valina, (6) treonina, (9) ácido aspártico, (12) metionina, C) (4) prolina, (8) isoleucina y leucina, (11) ácido glutámico, (10) lisina y (14) fenilalanina.

Los resultados muestran tres grupos de aminoácidos con diferente comportamiento frente a la temperatura. Para la cisteína, histidina, arguinina y tirosina, altas temperaturas de secado proporcionan elevadas sensibilidades, probablemente debido a que se produce una volatilización y nebulización de los analitos más completa. En el caso de glicina, alanina, valina, treonina, ácido aspártico y metionina, el incremento de temperatura provoca una disminución de la señal analítica, debido posiblemente a una aceleración de procesos de descomposición. Los aminoácidos prolina, isoleucina y leucina, ácido glutámico, lisina y fenilalanina no resultan excesivamente influenciados por la temperatura, ya que los dos efectos detallados más arriba se compensan. Finalmente, el valor intermedio de 250°C se tomó como temperatura de nebulización óptima.

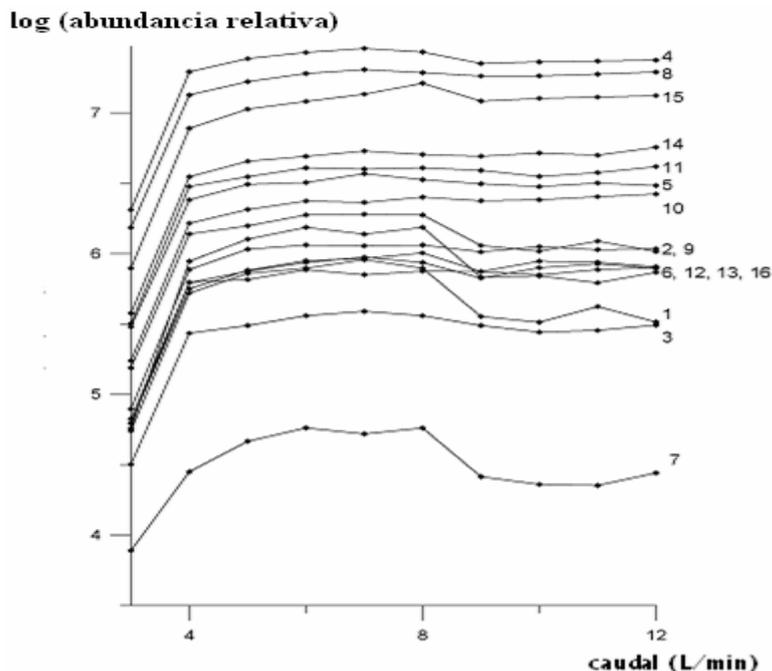
Se optimizó la presión de nebulización entre 10 y 50 psi (Figura 29).



**Figura 29.** Logaritmo decimal de las abundancias relativas de los iones correspondientes a los aminoácidos obtenidos a partir de la hidrólisis de una gelatina bovina, detectados mediante espectrometría de masas directa, en función de la presión del nebulizador. Condiciones instrumentales, temperatura de 250°C y caudal del gas secante 8 L.min<sup>-1</sup>. Aminoácidos (en orden de masa molecular): (1) glicina, (2) alanina, (3) serina, (4) prolina, (5) valina, (6) treonina, (7) cisteína, (8) isoleucina y leucina, (9) ácido aspártico, (10) lisina, (11) ácido glutámico, (12) metionina, (13) histidina, (14) fenilalanina, (15) arguinina y (16) tirosina.

Los resultados obtenidos muestran que la presión del nebulizador no presenta una influencia significativa sobre la sensibilidad. No obstante, para la instrumentación no resulta aconsejable el empleo de elevadas presiones, por lo que se seleccionó un valor intermedio (25 psi).

Finalmente, se estudió la influencia del caudal del gas de secado en la señal en el intervalo comprendido entre 3 y 10 L.min<sup>-1</sup> (Figura 30).



**Figura 30.** Logaritmo decimal de las abundancias relativas de los iones correspondientes a los aminoácidos obtenidos aplicando la metodología propuesta a una muestra de gelatina bovina, detectados mediante espectrometría de masas directa en función del caudal del gas secante. Condiciones instrumentales optimizadas, temperatura de 250°C y presión del nebulizador 25 psi. Aminoácidos indicados como en la Figura 29.

Los datos obtenidos muestran que el caudal del gas secante no es significativo a partir de 5 L.min<sup>-1</sup>, por lo que para asegurar una sensibilidad adecuada, se escogió un caudal de 8 L.min<sup>-1</sup>.

#### 4.3.2 Detección de los ácidos grasos

Los parámetros instrumentales se fijaron tras su optimización a partir del análisis de muestras de aceites mediante espectrometría de masas directa a una temperatura de trabajo de 200°C, presión del nebulizador a 25 psi, y el caudal de la corriente de gas portador a 5 L.min<sup>-1</sup> [290]. La optimización de

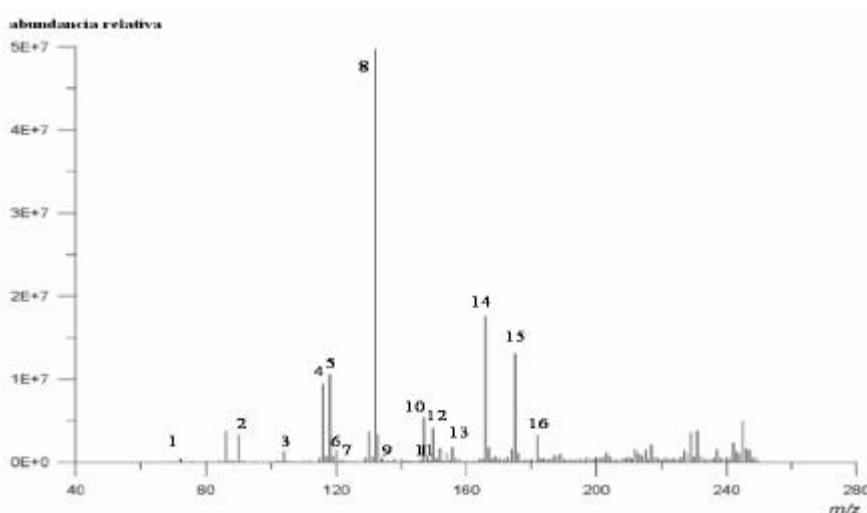
los potenciales del capilar y de las máscaras fue realizada de forma automática por el instrumento a partir del análisis de la mezcla de ácidos grasos obtenidos por hidrólisis de una muestra procedente de aceite de adormidera patrón envejecido térmicamente (expuesto en el apartado 3.2 del Capítulo IV).

El barrido del detector seleccionado fue de 100 a 400  $m/z$ , el cual cubre ampliamente el intervalo de masas moleculares de ácidos grasos, y se deja un margen superior para detectar posibles productos secundarios. El detector se enfoca a 255  $m/z$ , correspondiente a ion palmitato, debido a que se suele tomar como referencia en la caracterización de aceites secantes [163,165].

#### 4.4 Estudio analítico de las muestras patrón

##### 4.4.1 Análisis de proteínas

La metodología analítica se aplicó al estudio de una muestra procedente de patrones de los aglutinantes proteicos más extendidos en decoración de témperas y temples: gelatina porcina y bovina, caseína, proteína de huevo y albúmina (descritas en el apartado 1.2 del Capítulo IV). La señal obtenida se promedia durante un minuto, para reducir la influencia de las posibles oscilaciones de caudal durante la detección. El espectro de masas resultante del análisis de albúmina se representa en la Figura 31.



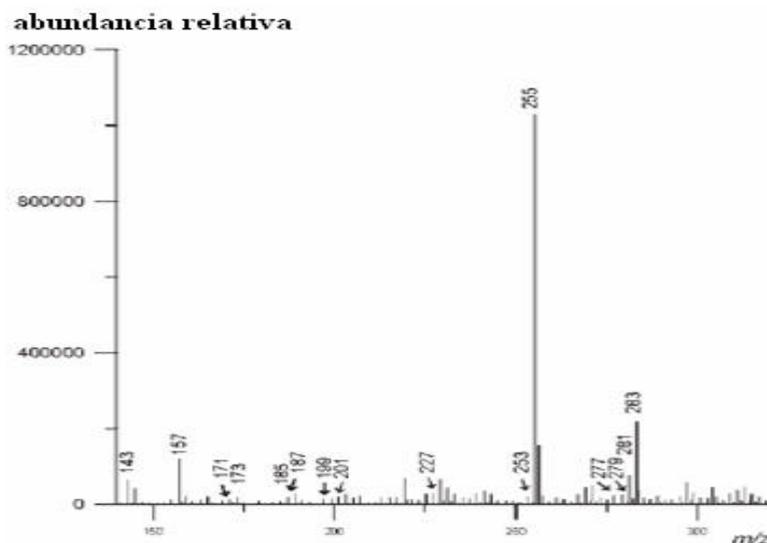
**Figura 31.** Espectro de masas obtenido a partir del análisis de la mezcla de aminoácidos extraídos por hidrólisis de una muestra patrón de albúmina. Condiciones instrumentales: temperatura de trabajo 200°C, presión del nebulizador 25 psi y caudal del gas 5 L.min<sup>-1</sup>, ionización por ESI. Aminoácidos indicados como en la Tabla 20.

Los resultados muestran que cada aminoácido se detecta sin solapamiento con el resto (excepto para el caso de leucina e isoleucina), ni hay interferencias con otras sustancias de la matriz, pese a no haber etapa previa de separación. Tampoco se encontraron restos de péptidos u oligómeros no hidrolizados de proteínas. La sensibilidad proporcionada también se consideró adecuada para esta clase de muestras.

#### 4.4.2 Análisis de aceites secantes

El método analítico sugerido se aplicó a muestras procedentes de muestras de patrones de los aglutinantes más habituales en pinturas al óleo: aceites de linaza, nuez y adormidera, envejecidas naturalmente durante 5 años, así como por tratamiento acelerado térmicamente y por radiación UV (descritas en el apartado 3.2 del Capítulo IV). El espectro de masas resultante del análisis de aceite de adormidera envejecido térmicamente se muestra en la Figura 32.

Debido a la elevada resolución del espectrómetro de masas, los iones correspondientes a los ácidos grasos aparecen sin solapamiento entre ellos, incluso aquellos que se diferencian tan sólo en un doble enlace. Asimismo, no se observan interferencias con otras sustancias de la matriz, ni la presencia de iones de masa elevada con una abundancia relativa significativa, correspondientes a triglicéridos parcialmente hidrolizados.



**Figura 32.** Espectro de masas obtenido a partir del análisis de aceite de adormidera envejecida térmicamente. Condiciones instrumentales: temperatura de trabajo 200°C, presión del nebulizador 25 psi, caudal del gas secante 5 L.min<sup>-1</sup>, ionización mediante ESI. Los ácidos grasos se indican a través de sus masas moleculares (Tabla 21).

## 4.5 Caracterización de patrones de aglutinantes

### 4.5.1 Diferenciación entre aglutinantes proteicos

La caracterización de las proteínas se basa en un tratamiento estadístico mediante Análisis Discriminante Lineal, que proporciona una clasificación quimiométrica.

Las categorías definidas para el LDA son las 5 clases de proteínas, (caseína, albúmina, huevo, gelatina bovina y gelatina porcina). El conjunto de entrenamiento está constituido por los objetos correspondientes a las muestras y cada una de sus réplicas. Por lo tanto, se dispone de 83 objetos estadísticos, repartidos en las 5 categorías siguientes: albúmina, caseína, huevo, gelatina bovina y gelatina porcina, tomando 23; 14; 12; 22 y 7 objetos, respectivamente. Por su parte, las variables consideradas son los iones correspondientes a los 16 aminoácidos estudiados (Tabla 20). La matriz de datos resultante es de 83x16.

Para reducir la influencia de la masa de muestra inicial tomada, se optó por normalizar las variables mediante dos procedimientos: A) en el primero los valores de abundancia relativa para cada aminoácido ( $Ab(AA)$ ) se divide por la suma de los valores de abundancia relativa de todos los aminoácidos, y B) en el segundo la abundancia relativa de cada analito se corrige calculando su cociente con la masa molecular del correspondiente aminoácido  $MW(AA)$ , y posteriormente cada valor  $Ab(AA)/MW(AA)$  obtenido se divide por la suma de las abundancias relativas corregidas de cada ion.

$$A) \quad Ab(AA)_{NA} = \frac{Ab(AA)}{\sum_{i=1}^{16} Ab(AA)_i}$$

$$B) \quad Ab(AA)_{NB} = \frac{\frac{Ab(AA)}{MW(AA)}}{\sum_{i=1}^{16} \frac{Ab(AA)_i}{MW(AA)_i}}$$

En primer lugar, se construyó un modelo mediante LDA utilizando las variables normalizadas mediante el primer procedimiento de normalización (A). El gráfico de las puntuaciones de las dos primeras funciones discriminantes muestra una separación suficiente entre los objetos correspondientes a cada categoría, excepto en el caso de las gelatinas de vaca y de cerdo que aparecen mezclados. Debido a ello, se reconstruye un nuevo

modelo, reuniendo los objetos de las gelatinas en una nueva categoría denominada “gelatina animal” (Modelo I), en este caso los 4 grupos aparecen correctamente separados. La fase de selección excluye las variables treonina, isoleucina+leucina, ácido glutámico, ácido glutámico, fenilalanina y arginina, por lo que el modelo se construye a partir de las abundancias relativas normalizadas de los iones correspondientes a los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, serina, prolina, valina, cisteína, ácido aspártico, lisina, metionina, histidina y tirosina. Los valores de los coeficientes estandarizados para las tres primeras funciones discriminantes y las coordenadas del centroide de cada uno de las categorías se expresan en las Tablas 22 y 23, respectivamente. El gráfico de puntuaciones de las dos primeras funciones discriminantes construidas para este modelo exhibe una correcta resolución de la nube de objetos estadísticos en función de las cuatro categorías. (En este caso, no se representa el gráfico obtenido, porque se continúa la optimización del modelo).

**Tabla 22.** Coeficientes estandarizados de cada aminoácido para cada función discriminante obtenidos en la construcción del Modelo I por LDA, para la caracterización de los aglutinantes proteicos utilizando las variables normalizadas por el procedimiento A.

aminoácido	función discriminante		
	1	2	3
gly	0,807	0,315	0,257
ala	-0,380	0,16	-1,632
ser	2,07	1,219	-0,100
pro	1,054	-0,418	0,852
val	-0,965	-0,150	0,686
thr		excluida	
cys	-0,115	0,578	0,314
ile+leu		excluida	
asp	0,768	-0,404	-0,173
lys	0,037	-0,123	0,645
glu		excluida	
met	-0,210	-0,745	-0,191
his	-0,988	-0,239	0,159
phe		excluida	
arg		excluida	
tyr	-0,160	0,686	0,965

**Tabla 23.** Puntuaciones de los centroides de cada categoría (proteína) para el Modelo I.

categoría	función discriminante		
	1	2	3
albúmina	-7,066	-1,743	-1,797
caseína	-2,09	-1,315	3,020
gelatina animal	8,417	-0,699	-0,519
huevo	-2,174	7,122	-0,083

En segundo lugar, se construye un nuevo modelo de LDA utilizando las variables normalizadas por el segundo procedimiento (B), y las cuatro categorías definidas anteriormente (albúmina, caseína, proteína de huevo y gelatina animal) (Modelo II). El proceso de selección de variables originales excluye las abundancias relativas correspondientes a los mismos aminoácidos que el Modelo I. El gráfico de puntuaciones de las dos primeras funciones discriminantes se muestra una separación entre las diversas categorías que supera la obtenida en el caso del Modelo I, aumentando ligeramente la distancia entre los centroides. Los valores obtenidos para los coeficientes estandarizados y de las coordenadas de los centroides se detallan en la Tabla 24 y 25, respectivamente.

**Tabla 24.** Coeficientes estandarizados para cada variable original, obtenidos a partir de la construcción del Modelo II por LDA, para la caracterización de proteínas utilizando las variables normalizadas por el procedimiento B.

aminoácido	función discriminante		
	1	2	3
gly	0,801	0,355	0,229
ala	-0,355	-0,126	-0,512
ser	0,221	1,227	-0,062
pro	0,961	-0,325	0,878
val	-0,902	-0,027	0,714
thr		excluida	
cys	-0,073	0,576	0,310
ile+leu		excluida	
asp	0,812	-0,0384	-0,121
lys	0,000	-0,037	0,675
glu		excluida	
met	-0,212	-0,785	-0,148
his	-1,029	-0,246	0,144
phe		excluida	
arg		excluida	
tyr	0,002	0,775	0,928

**Tabla 25.** Puntuaciones de los centroides de cada categoría (proteína) para el Modelo II.

categoría	función discriminante		
	1	2	3
albúmina	-7,170	-1,848	-1,722
caseína	8,391	-0,782	-0,517
gelatina animal	-2,851	-1,092	3,305
huevo	-2,020	7,160	-0,255

Finalmente, se construye un nuevo modelo matemático empleando como variables originales las abundancias relativas de los iones correspondientes a los aminoácidos seleccionados para el Modelo II. Para minimizar el aporte de información errónea, se repite la normalización

llevada a cabo mediante el procedimiento B), pero considerando únicamente las abundancias relativas corregidas de los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, serina, prolina, valina, cisteína, ácido aspártico, lisina, metionina, histidina y tirosina, por lo que la matriz de datos tiene como dimensiones 83x11 (Modelo III). El modelo estadístico finalmente obtenido proporciona una adecuada separación entre los objetos pertenecientes a diferentes categorías y centroides, mucho mayor que la obtenida en los dos Modelos anteriores. Los valores de coeficientes estandarizados de las variables originales sobre las tres primeras funciones discriminantes y las coordenadas de los centroides de las cuatro categorías se muestran en las Tablas 26 y 27, respectivamente. El gráfico de puntuaciones de los objetos estadísticos en el espacio de las dos primeras funciones discriminantes se representa en la Figura 33.

**Tabla 26.** Coeficientes estandarizados para cada variable original para las tres primeras funciones discriminantes, obtenidos a partir de la construcción del Modelo III por LDA, para la caracterización de proteínas utilizando las variables normalizadas por el procedimiento B.

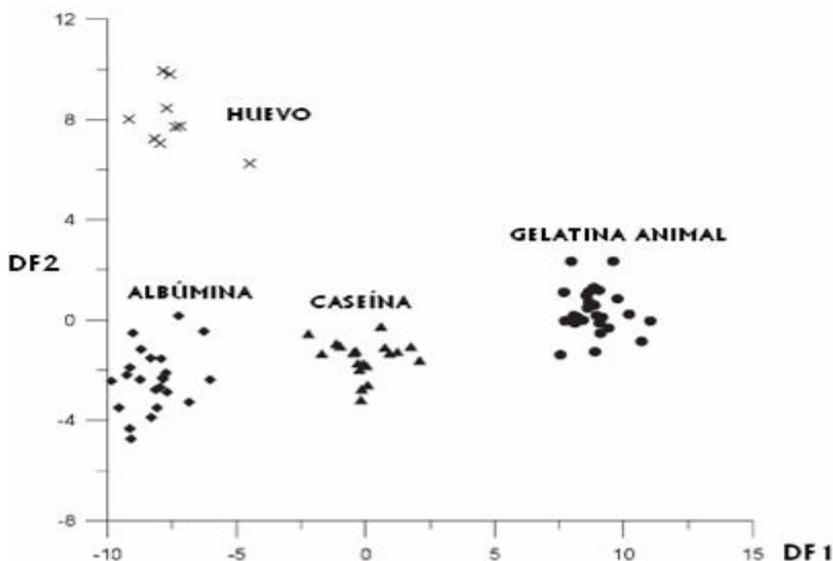
aminoácido	función discriminante		
	1	2	3
gly	0,984	0,607	0,158
ala	0,184	-0,118	0,834
ser	-0,963	1,050	0,063
pro	2,178	-0,096	0,230
val		excluida	
cys	0,930	0,433	-0,154
asp	1,801	-0,298	0,466
lys	1,469	0,011	0,018
met	0,212	-0,745	0,413
his		excluida	
tyr	0,576	0,720	-0,638

**Tabla 27.** Puntuaciones de los centroides de cada categoría (proteína) para el Modelo II.

categoría	función discriminante		
	1	2	3
albúmina	-8,207	-2,366	1,087
caseína	8,852	0,371	0,738
gelatina animal	-0,023	-1,508	-2,339
huevo	-7,501	8,035	-0,218

La diferenciación entre las gelatinas de vaca y de cerdo se llevó a cabo mediante la construcción de un modelo quimiométrico, tomando como muestras las réplicas de las gelatinas bovina y porcina, considerando únicamente estas dos categorías, y como variables originales las abundancias relativas correspondientes a los iones de los 16 aminoácidos estudiados normalizados mediante el procedimiento B (Modelo IV). En este caso el

proceso de selección de variables por pasos incluye para el modelo los siguientes aminoácidos: glicina, alanina, treonina, isoleucina+leucina, ácido glutámico, histidina y arginina. El modelo por LDA proporciona una única función discriminante, a lo largo de la cual se sitúan los objetos estadísticos, claramente separados por categorías (Figura 34). Los valores de los coeficientes estandarizados de cada variable original para la función discriminante y las coordenadas de los centroides de las categorías correspondientes a las gelatinas se muestran en la Tabla 28.



**Figura 33.** Gráfico de puntuaciones para los DF1 y DF2 obtenidos aplicando un LDA a los resultados obtenidos a partir del análisis por espectrometría de masas directa de albúmina, caseína, proteína de huevo y gelatina animal.



**Figura 34.** Gráfico de puntuaciones unidimensional para la función discriminante proporcionada por el modelo LDA a partir de los datos de abundancia relativa de los iones correspondientes a los aminoácidos a partir del análisis por espectrometría de masas directa de gelatina de cerdo y de vaca.

**Tabla 28.** Coeficientes estandarizados para cada variable y puntuaciones los centroides de las dos categorías consideradas.

aminoácido	coeficientes estandarizados	puntuaciones del centroide	
		categoría	DF
gly	-1,028	gelatina bovina	5,617
ala	3,761	gelatina porcina	-1.787
thr	1,754		
ile+leu	1,438		
glu	1,765		
his	-4,065		
arg	5,072		

#### 4.5.2 Diferenciación entre aglutinantes oleosos

La caracterización de los aglutinantes que se propone, consiste en la construcción de un modelo quimiométrico mediante LDA a partir del análisis de los perfiles de aceites secantes obtenidos mediante espectrometría de masas.

Los objetos estadísticos considerados para el conjunto de entrenamiento, con los que se construye el modelo quimiométrico, son las réplicas analizadas para cada clase de aceite secante patrón y de envejecimiento, en total 82, distribuidos tal y como se indica en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Número de muestras patrón para cada aglutinante lipídico patrón y clase de envejecimiento.

aceite secante	envejecimiento			nº de objetos
	natural (5 años)	acelerado térmicamente	acelerado por irradiación UV	
linaza	15	8	9	32
adormidera	4	12	12	28
nuez	7	8	7	22
nº de objetos	26	28	28	

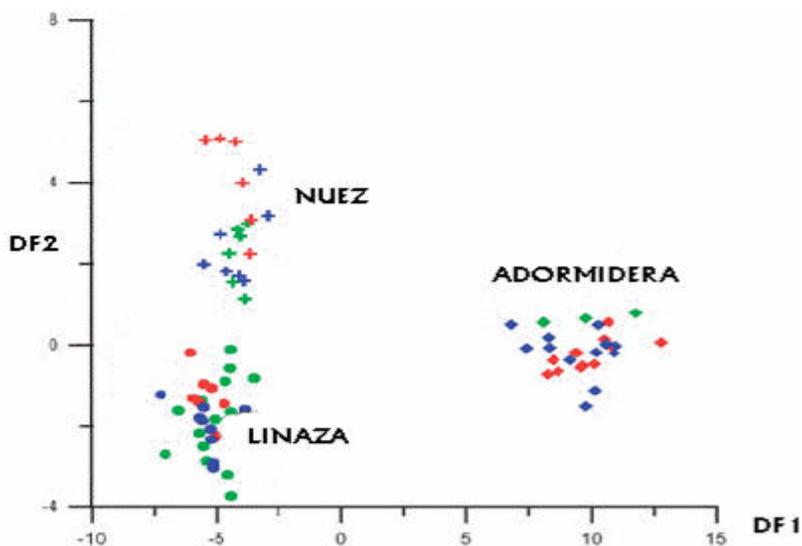
nº total de objetos=82

La clasificación de las muestras se realizó de acuerdo a su origen independientemente del envejecimiento experimentado. Las variables originales a partir de las cuales se clasifican las muestras son las abundancias relativas de los iones correspondientes a los 15 ácidos grasos estudiados, cuyos valores de  $m/z$  ( $[M-H]^+$ ) se exponen en la Tabla 21.

Con el objetivo de evitar que la diferencia de cantidad de muestra tomada en dos réplicas influya en el resultado, se propone la normalización de las variables mediante tres procedimientos: C) las abundancias relativas para cada carboxilato se dividen por la suma de las abundancias relativas de todos los ácidos grasos, D) los valores de abundancia relativa se dividen por la suma de las abundancias relativas de los ácidos grasos saturados

(caprílico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico), ya que debido a su estabilidad, se considera que la variabilidad será menor, y E) los valores de abundancia relativa de cada ácido graso se dividen por las abundancias relativas de cada uno de los demás ácidos grasos y, para cada par de iones, se toma únicamente un cociente, para eliminar variables correlacionadas. Así pues, a partir de los 15 ácidos grasos se obtienen 105 cocientes.

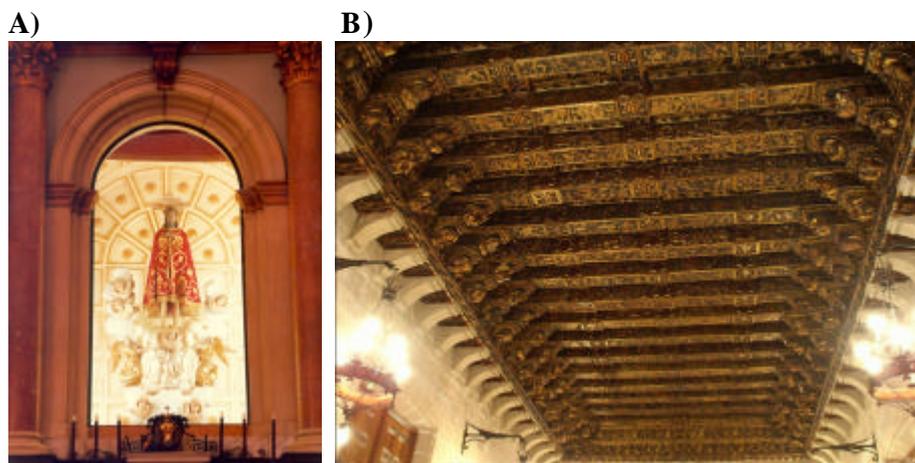
A partir de los datos obtenidos se construyeron tres modelos quimiométricos por LDA, tomando como variables los valores normalizados por los tres procedimientos anteriormente descritos. La matriz de datos fue 82x15 para las normalizaciones C) y D), mientras que para la E) fue de 82x105. En todos los casos el modelo construido proporcionó dos funciones discriminantes. El último modelo fue el que resolvió más adecuadamente la nube de puntos estadísticos, diferenciando correctamente cada objeto estadístico en función de la clase de aceite secante (linaza, nuez y adormidera), con una  $\bar{\epsilon}_w=0,201$  (Figura 35). Los valores de los coeficientes estandarizados para las 12 variables originales que influyen más sobre las funciones discriminantes se muestran en la Tabla 30.



**Figura 35.** Gráfico de puntuaciones de las dos funciones discriminantes calculadas por el modelo construido por LDA, a partir de los resultados obtenidos del análisis de muestras de (o) linaza, (+) nuez, ( ) adormidera, mediante espectrometría de masas directa.

La función discriminante 1 diferencia el aceite de adormidera de los otros aglutinantes oleosos, y está influenciado principalmente por los siguientes cocientes de abundancias relativas: palmítico/cáprico, palmitoleico/ subérico, esteárico/subérico y oleico/linoleico. Por su parte, la función discriminante 2 discrimina entre el aceite de linaza y de nuez, y

depende esencialmente de los cocientes palmitoleico/azelaico, sebácico/azelaico, linolénico/pelargónico y palmítico/cáprico.



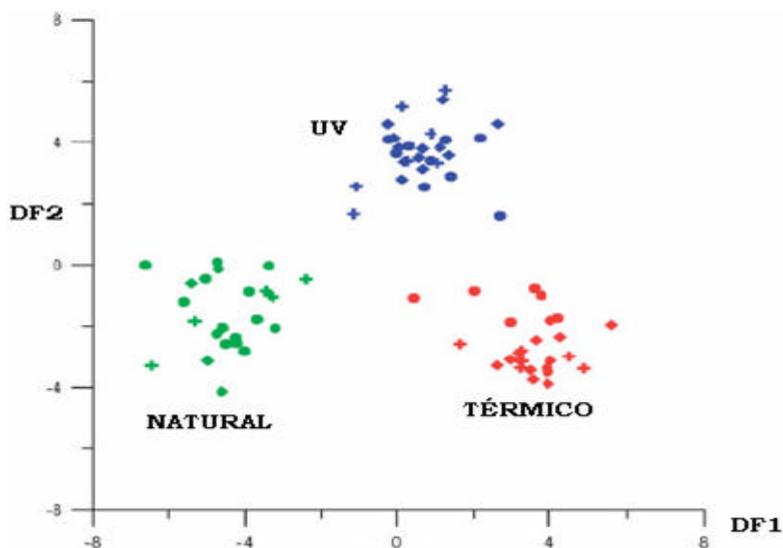
**Figura 36.** A) Imagen de la Capilla del Ecce Homo (Pego, Comunidad Valenciana), B) Techo policromado del Salón Dorado de la Lonja de Valencia.

**Tabla 30.** Coeficientes estandarizados de los cocientes de abundancias relativas más importantes para el modelo construido por LDA, para la diferenciación entre las clases de aceite secante, considerando los ácidos grasos expuestos en la Tabla 20 y normalización de la abundancia relativa por el procedimiento E).

cocientes entre los ácidos grasos	función discriminante	
	1	2
diC8/C9	-0,629	-0,425
C18:3/C9	0,141	0,763
C14/C10	-1,358	-0,002
C16/C10	4,275	0,712
C16:1/diC8	-3,176	-0,593
C16/diC8	1,956	-0,078
C18/diC8	-2,430	-0,588
diC8/diC9	-0,442	-1,473
C18:2/diC9	0,135	1,522
diC10/C12	1,473	0,273
C16/diC10	-1,084	-0,489
C18:1/C18:2	3,05	0,677

Con el objetivo de estudiar la influencia del deterioro en los aceites secantes se construyó un nuevo modelo de LDA, utilizando las variables normalizadas por el procedimiento E), y considerando como categorías, el tratamiento de envejecimiento aplicado (natural, acelerado térmicamente y degradado por irradiación UV), sin tener en cuenta el origen vegetal. Así pues, la matriz de datos tendrá una dimensión de 82x105.

El modelo estadístico por LDA calcula dos funciones discriminantes, las cuales permiten la separación de las tres categorías consideradas. Como se muestra en la Figura 37, los objetos estadísticos se encuentran adecuadamente agrupados por la clase de tratamiento de degradación experimentado.

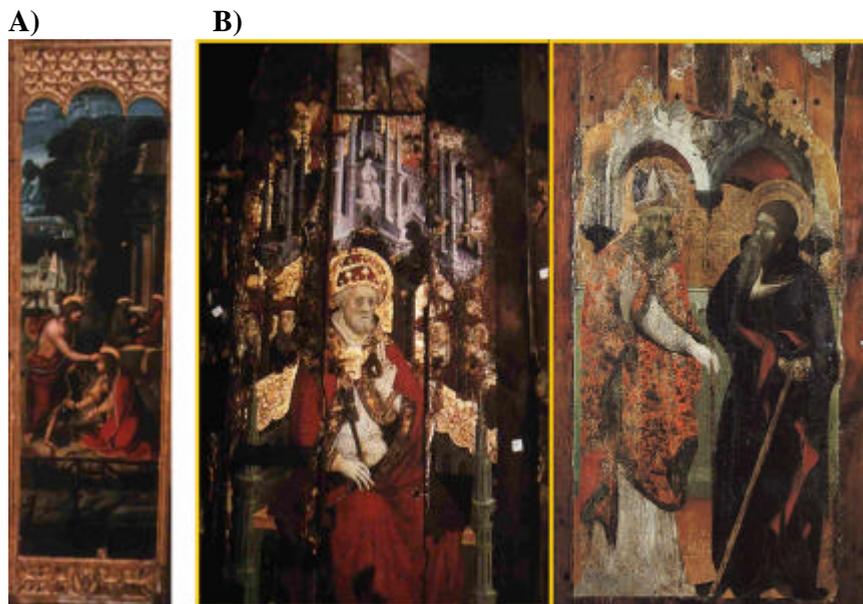


**Figura 37.** Gráfico de puntuaciones para las DF1 y DF2, calculadas a partir del estudio estadístico por LDA, de las muestras procedentes de aceites secantes patrón envejecidas (naturalmente, y acelerado térmicamente y por irradiación UV), analizadas por espectrometría de masas directa.

En el gráfico de puntuaciones trazado se aprecia que la función discriminante 1 permite diferenciar el envejecimiento natural de los tratamientos de deterioro acelerado, mientras que la función discriminante 2 distingue entre las muestras de aceites secantes patrón envejecidas mediante tratamiento por UV y las muestras degradadas mediante los otros dos procedimientos. Los valores de los coeficientes estandarizados para 14 cocientes seleccionados con más influencia sobre las funciones discriminantes se muestran en la Tabla 31.

Los resultados muestran que la función discriminante 1 está constituida principalmente por las proporciones oleico/linolénico,

oleico/subérico, subérico/caprílico y linolénico/pelargónico. Por otra parte, las variables originales con más peso sobre la segunda función discriminante son los cocientes palmitoleico/pelargónico, palmítico/pelargónico, linoleico/subérico y oleico/subérico.



**Figura 38.** Obras pictóricas realizadas en el siglo XVI: A) “Tríptico de la Magdalena” (Maestro de Alzira) y B) “Altar de Cintorres” (Bernat Serra).

**Tabla 31.** Coeficientes estandarizados de las 14 variables originales más importantes para el modelo construidos mediante tratamiento estadístico de los datos por LDA, para la diferenciación de los diversos tratamientos de envejecimiento experimentados por los aceites secantes patrón.

cocientes entre los ácidos grasos	función discriminante	
	1	2
C10/C8	-1,590	-0,720
diC8/C8	2,149	0,928
C12/C9	0,774	0,375
C16:1/C9	0,779	-2,732
C16/C9	-0,902	1,803
C18:3/C9	-1,505	0,491
C18:1/C9	1,396	0,588
C11/C10	-0,081	-0,762
diC9/C10	0,235	-0,754
C18:2/diC8	1,576	1,301
C18:1/diC8	-3,046	-1,087
C14/C12	-0,756	1,003
C18:2/C16:1	-0,038	-0,737
C18:1/C18:3	3,179	0,969

## **4.6 Aplicación de la metodología propuesta a muestras procedentes de obras pictóricas**

### 4.6.1 Témperas y temple

Con el propósito de comprobar la capacidad de la metodología sugerida para la caracterización de aglutinantes proteicos en muestras reales, se aplicó al estudio de las obras pictóricas decoradas en témpera o temple, analizadas mediante HPLC-Fluorescencia en el Capítulo 1 de la presente Memoria. La Figura 38 muestra dos de las obras pictóricas del siglo XVI a partir de las cuales se obtuvieron las muestras analizadas: “Tríptico de la Magdalena”, realizada por el Maestro de Alzira (Muestra 2) y “Altar de Cincorres”, por Bernat Serra (Muestra 3).

Los resultados obtenidos muestran que los aminoácidos aparecen en los espectros de masas con sensibilidad adecuada y sin interferencias con otras sustancias presentes en la matriz. Al aplicar los modelos constituidos sobre las muestras de obras pictóricas, sus correspondientes aglutinantes fueron clasificados como proteína de huevo, al igual que en los estudios anteriores expuestos en el apartado 1 del presente Capítulo.

### 4.6.2 Pinturas al óleo

El modelo de LDA construido para la identificación del aglutinante lipídico, se aplicó para la caracterización de aceites secantes en obras pictóricas decoradas al óleo, las cuales se indican en apartado 4.3 del Capítulo IV. La Figura 36 muestra dos de los elementos del Patrimonio Cultural a partir de los cuales se obtuvieron dos de las muestras analizadas, la Capilla del Ecce Homo (siglo XVIII, Pego, Comunidad Valenciana) (Muestra 18) y el techo policromado del Salón Dorado de la Lonja de Valencia (siglo XV) (Muestra 19).

En todos los casos se identificó el aglutinante oleoso empleado como aceite de linaza. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el apartado 3.4.2 del presente Capítulo, aplicando las técnicas de HPLC-UV-Visible y HPLC-Fluorescencia. La espectrometría de masas permitió aumentar la rapidez de la metodología y reducir la incertidumbre de los valores obtenidos debido a la simplificación del tratamiento de muestra, principalmente la exclusión de etapas de derivatización y de resolución, sin que ello conllevara una disminución de la sensibilidad. Se empleó una menor cantidad de reactivos tóxicos que en el caso de la HPLC, disminuyendo el impacto medioambiental.

## **5. Caracterización de los constituyentes de barnices de violines y laúdes italianos de la época renacentista mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas**

El barniz en las obras de arte desempeña generalmente una función de protección de la superficie. En el caso de los instrumentos musicales, la capa filmógena forma parte del objeto artístico, ya que ejerce una gran influencia sobre su apariencia y propiedades sonoras. Sin embargo, el barniz experimenta procesos de degradación, generalmente asociados a la oxidación progresiva de las sustancias que lo componen y que están causadas, principalmente, por agentes medioambientales externos, lo que conduce a la necesidad de su restauración. En estos casos, resulta esencial modificar lo menos posible la composición química de la capa filmógena original [5].

El conocimiento acerca de los barnices que recubren la superficie de los instrumentos musicales de cuerda de la época renacentista, como los ingredientes aplicados en su elaboración, la estructura y la estratigrafía de las capas, permite alcanzar una mayor información acerca de las técnicas antiguas de barnizaje, para poder adaptar las condiciones de conservación, exposición y evaluar su eventual fragilidad en el caso de volver a ser reutilizados por un músico. Asimismo, un conocimiento más extenso acerca de la naturaleza del barniz puede resultar útil para proponer tratamientos de restauración/conservación adecuados, y que sean lo más respetuoso posible con la composición química de la capa filmógena original [5].

El estudio analítico propuesto consiste en la identificación de las sustancias presentes en una serie de materiales de referencia (aceites esenciales y secantes, resinas terpénicas, bálsamos, goma laca, y material resinoso de origen animal), principalmente ácidos grasos e hidroxicarboxílicos y compuestos terpénicos y aromáticos, así como alcoholes, aldehidos y cetonas. Consecuentemente se establece la identificación de tales componentes en las muestras procedentes de barnices de instrumentos de cuerda de la época renacentista.

El método de análisis de estas sustancias, que se propone por GC/MS, está basado en una etapa inicial la transesterificación y metilación de los grupos carboxílicos, mediante la adición de un reactivo de amonio cuaternario ((*m*-trifluorometilfenil) trimetilamonio), seguido de una segunda etapa de silylación por adición de N,O-bis[trimetilsilil]trifluoroacetamida + trimetilclorosilano (99/1 v/v) (BSTFA+TMCS) para bloquear los grupos hidroxilo. Después de cada etapa se introdujo una alícuota en el sistema cromatográfico para la separación e identificación de sus compuestos a partir de los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos, mediante comparación con datos bibliográficos y bibliotecas generales de espectros.

Los espectros de masas de los picos cromatográficos más intensos, obtenidos a partir del análisis de cada material de referencia se introducen en una biblioteca de espectros, junto a otras características como el tiempo de retención, el nombre (si ha sido posible la identificación), el ingrediente del que proviene y la intensidad relativa en orden decreciente. Los picos cromatográficos de las muestras reales se compararon con los almacenados en la biblioteca de espectros, con el objetivo de identificar el máximo número posible de sustancias en los barnices. Cuando se detectan varias sustancias de un ingrediente, se sugiere que éste fue utilizado en la elaboración de la correspondiente capa filmógena.

Las limitaciones del método radican principalmente en la variabilidad natural de la composición química de los materiales de referencia y las posibles diferencias con los ingredientes del barniz, que depende de factores diversos como la localización geográfica, la época de la cosecha y de los tratamientos experimentados durante la elaboración del propio barniz (calentamiento, disolución, purificación e interacción con otros ingredientes). El envejecimiento de las muestras modificará la estructura de las moléculas presentes, aumentando su grado de oxidación y polimerización.

### **5.1 Optimización del método de análisis de los materiales de referencia**

Los materiales de referencia están compuestos por sustancias con grupos carboxílicos no volátiles y en algunos casos en forma de polímeros, por lo que no son directamente analizables por GC/MS. Así pues, la fase de transesterificación introducida produce la ruptura de los enlaces intermoleculares y la metilación de los ácidos carboxílicos. El uso de un transesterificante como el *N*-trifluorometilfenil)trimetilamonio en metanol, permite obtener los derivados con una única etapa [77].

La optimización de las condiciones de la derivatización se llevó a cabo mediante el estudio de la influencia de la temperatura y tiempo de reacción, mediante análisis a varios valores, manteniendo los demás parámetros inalterados (Tabla 32 y 33, respectivamente). Como referencia se toma el área del pico cromatográfico correspondiente al ácido deshidroabiético (DHA) en la resina de colofonia, en la muestras con mayor grado de envejecimiento.

Los resultados obtenidos muestran que la temperatura óptima de trabajo de 80°C, mientras que un tiempo de reacción de 18 h fue considerado para la reacción.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

**Tabla 32.** Áreas del pico cromatográfico equivalente al derivado metilado del ácido deshidroabiético para la resina de colofonia más envejecida a varias temperaturas.

T (°C)	60	70	80	90	100
Área del pico ME-DHA (unidades arbitrarias)	80±8	93±5	100±3	98±4	95±6

V= 0,2 ml y tiempo de reacción 36 h.

Desviación estándar para tres medidas independiente.

**Tabla 33.** Áreas del pico cromatográfico del derivado metilado del ácido DHA para la resina de colofonia más envejecida a varios tiempos de reacción.

Tiempo (h)	6	12	15	18	36
Área de pico ME-DHA (unidades arbitrarias)	70±10	85±9	97±4	99±2	100±3

V= 0,2 ml y T=80°C

Desviación estándar para tres medidas independientes.

La segunda derivatización propuesta consiste en bloquear los hidroxilos por sililación por adición de un grupo trimetilsilano (TMS,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). Esta modificación altera la polaridad, la volatilidad y la masa molecular de la molécula, e incrementa la resolución en la columna capilar seleccionada para el estudio analítico. Por otra parte, la modificación de las propiedades provoca un cambio en el tiempo de reacción. Así pues, las moléculas con uno o más grupos alcohol serán fácilmente discernibles mediante la comparación de los cromatogramas anterior y posterior a la sililación. Por otro lado, los alcoholes proporcionan espectros de masas complejos, y habitualmente sin el pico molecular, ya que pueden perder fácilmente agua y forman aductos con otras sustancias polares. La molécula sililada presenta dos picos característicos a M-15 y M-90, cuya detección permiten el cálculo de la masa molecular de forma inmediata. Asimismo, el bloqueo de los grupos hidroxilos evita las reorganizaciones de los iones y generación de aductos características de los alcoholes.

La evaporación se desarrolla en condiciones suaves, atmósfera de nitrógeno y a 40°C, para evitar que las sustancias se oxiden o se volatilicen y sean arrastradas por la corriente de gas secante. El disolvente seleccionado fue el diclorometano, ya que su polaridad intermedia permite solubilizar los derivados involucrados en el estudio analítico.

La idoneidad del volumen de disolvente utilizado (200  $\mu\text{L}$  de cloroformo), se estudio mediante un análisis previo de las muestras patrón por GC/FID. En todos los casos se obtuvieron sensibilidades adecuadas sin saturar al detector.

## 5.2 Caracterización de los compuestos en esencias y resinas naturales patrón

El análisis de las muestras procedentes de los patrones, a través del procedimiento mediante GC/MS expuesto anteriormente, proporciona el cromatograma para cada uno de ellos, junto a los espectros de masas de los picos cromatográficos más importantes. Así pues, los resultados obtenidos para cada uno de los materiales patrón se almacenaron en forma de biblioteca de espectros.

En primer lugar, los estudios cromatográficos de cada resina se realizaron tras el protocolo de metilación y posteriormente la misma alícuota metilada se sometió al procedimiento de sililación y se analizó por GC/MS. Los resultados obtenidos permitieron establecer las características más importantes de los diferentes cromatogramas para cada tipo de resina. Se tomaron los espectros de masas correspondientes a los picos cromatográficos más intensos de cada resina analizada, los cuales se almacenan en la biblioteca de datos, incluyendo la totalidad de la información disponible acerca del correspondiente compuesto a través del siguiente protocolo: nombre de la molécula (si se ha identificado), tiempo de retención, orden decreciente de intensidad y material objeto de análisis. Estas características, que se incluyen en la Tabla 34, facilitan la identificación de los ingredientes estudiados, tanto en las muestras reales procedentes de barnices de instrumentos de cuerda, como para ulteriores análisis de los mismos materiales en otras clases de muestra.

Los estudios analíticos realizados por GC/MS para cada una de las resinas patrón proporcionan asimismo información satisfactoria sobre la composición química de las mismas. A continuación se exponen, para cada material, los compuestos detectados que se han identificado inequívocamente a partir de su tiempo de retención y espectro de masas. Las sustancias obtenidas coinciden con los constituyentes descritos para cada material estándar, expuestos en el Capítulo III, apartados 1.5.4 y 1.5.5. En principio, los resultados obtenidos proporcionan suficientes datos para la caracterización de resina natural (Tabla 34).

Los aceites esenciales (esencia de trementina y aceite de lavanda), presentan una gran cantidad de moléculas volátiles (monoterpenos, alcoholes monoterpénicos y sesquiterpenos) y, en menor medida, moléculas más pesadas, probablemente polímeros formados a partir de los anteriores. Los compuestos más ligeros no estarán presentes en las muestras envejecidas, debido a su evaporación, por lo que únicamente las sustancias más pesadas podrán atestiguar el uso de estos materiales. En la esencia de trementina se identificaron los siguientes compuestos:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, valenceno, cariofileno, cariofileno oxidado, neocloveno, 3-(6,6-dimetil-2-

metilenciclohex-3-enilideno)-1-metil butil acetato, mientras que en la esencia de lavanda se identificaron las siguientes sustancias:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, linalol, borneol, acetato de linalilo, valenceno, cariofileno, cariofileno oxidado, neocloveno, 3-(6,6-dimetil-2-metilenciclohex-3-enilideno)-1-metil butil acetato y metil sandaracopimarato.

El alcanfor contiene una mezcla de compuestos ligeros con núcleos aromáticos, los cuales se evaporarán durante el envejecimiento.

El bálsamo de benjuí es una mezcla de sustancias ligeras con núcleos aromáticos, las cuales posiblemente se evaporen sin dejar indicios de su presencia. No obstante se detectó un compuesto de mayor masa molecular ( $336 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) el cual es lo suficientemente pesado como para permanecer tras el envejecimiento.

Los compuestos identificados en la colofonia fueron: los ácidos pimárico, sandaracopimárico, palústrico, isopimárico, DHA, abiético, neoabiético, y los derivados oxidados 7-oxo-DHA, 15-hidroxi-7-oxo-DHA, así como otros diterpenoides hidroxilados. La composición relativa de la resina depende de la clase de colofonia y de su grado de deterioro. Así pues, en las muestras más envejecidas abundarán más los hidroxi- y oxoderivados del DHA, mientras que la concentración de abiético disminuye.

La trementina de Venecia está constituida por los siguientes compuestos:  $\alpha$ -terpineol, careno, i-elemeno, epimanol, pimaral, ácidos palústrico, isopimárico, 6-deshidrodeshidroabiético, abiético y neoabiético, así como larixol y acetato de larixilo. Se trata de la única resina que contiene estos dos últimos compuestos, por lo que la detección de estos compuestos en una muestra, indicará directamente la presencia de trementina de Venecia. Comparte una elevada cantidad de sustancias con la resina de colofonia, por lo que su distinción puede resultar en ocasiones confusa.

La sandaraca está constituida por diterpenoides labdanos (ácidos y alcoholes). Los compuestos más característicos son los ácidos agático y comúnico, y además contienen los ácidos sandaracopimárico y 7-oxo-DHA. La composición química relativa varía en función del origen de la resina.

El copal de Manila está constituido igualmente por ácidos y alcoholes diterpenoides labdanos, principalmente ácido comúnico, agático y sus análogos. Asimismo se identificaron los ácidos sandaracopimárico, abiético y 7-oxo-DHA. La cantidad relativa de cada compuestos está muy influenciada por la clase de copal estudiado.

En las muestras procedentes de goma laca se detectó ácido deshidroabiético, abiético ácido jalárico y una gran cantidad de otros ácidos grasos y sesquiterpenos hidroxilados de compuestos de estructura semejante, junto a sus correspondientes isómeros. Casi todas las moléculas poseen grupos hidroxilo que dificultan su separación y la obtención de los correspondientes espectros de masas. La composición química de la goma

laca depende en gran medida de su grado de purificación.

En la muestras de mastic se identificó una fracción diterpénica compuesta por ácido comúnic, ácido 6-deshidrodeshidroabiético, ácido deshidroabiético, abiético, 7-oxo-DHA, así como una mezcla de triterpenoides ácidos y neutros como á -amirina, ácido oleanónico, aldehido oleanónico, isomasticadienoico, masticadienoico y morónico. Este último es específico del la resina de mastic y se toma como compuesto característico.

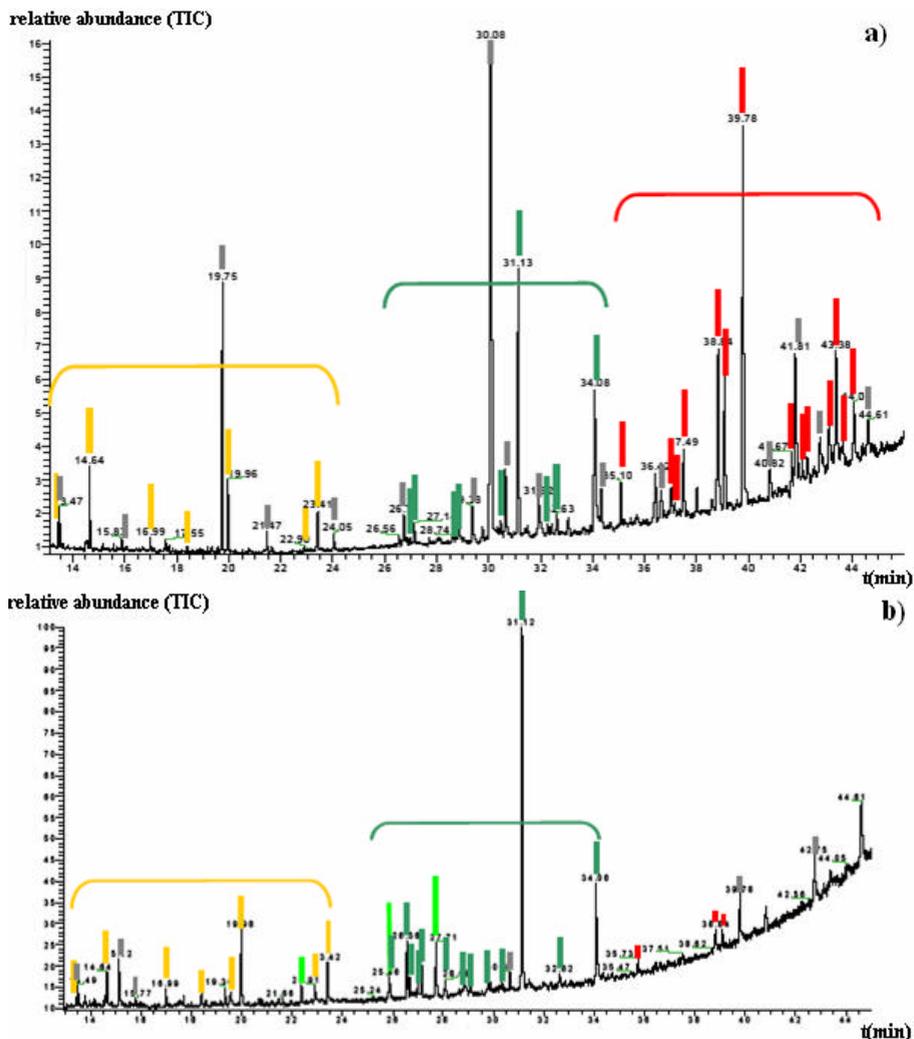
La muestra de dammar contiene una mezcla de triterpenoides ácidos y neutros, de los cuales se identificaron los siguientes: dammaradienona, dammaradienol, ácido dammarenólico, hidroxidammarenona, aldehido oleanónico, ácido ursónico y aldehido ursónico.

### **5.3 Caracterización de los materiales en barnices de instrumentos musicales de cuerda de la época renacentista**

El estudio minucioso de los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras procedentes de instrumentos musicales permitió confirmar la presencia de sustancias correspondientes a los ingredientes analizados, así como otras procedentes de resinas no consideradas en el presente trabajo, aditivos y materiales introducidos por contaminaciones modernas.

Los cromatogramas (TIC) resultantes de la muestra procedentes del laúd de Maler y el violín de Stradivarius se muestran en la Figura 39. El cromatograma resultante del análisis de la tiorba de Venere presenta gran semejanza con el obtenido del Stradivarius.

En los tres casos, se encuentran ácidos grasos que eluyen entre 23-24 minutos, y diterpenoides entre 24 y 36 minutos. Además, en el caso del laúd de Maler, aparecen picos cromatográficos correspondientes a triterpenoides a partir de 37 minutos. La relación entre la cantidad de de ácidos grasos y la de terpenoides es inferior en el laúd de “Maler” que en la tiorba de Venere y el violín de Stradivarius.



**Figura 39.** Cromatogramas (TIC) obtenidos a partir del análisis de la fracción orgánica del barniz procedente de un laúd de Maler (parte superior) y de un violín de Stradivarius (parte inferior). Los compuestos característicos de los aceites secantes se indican en amarillo, los diterpenoides en verde y los triterpenoides en rojo. Las sustancias señaladas en gris corresponden a contaminantes modernos.

### 5.3.1 Aceites secantes

Los ácidos grasos y los productos de degradación (ácidos dicarboxílicos) procedentes de aceites secantes se identificaron en las tres muestras reales estudiadas. Por otra parte, la presencia de ceras se rechazó, debido a la ausencia de otros de sus constituyentes como los hidrocarburos. De ahí se establece que el material graso detectado proviene íntegramente

del aglutinante lipídico sin interferencias. El cociente palmítico/esteárico calculado para las muestras reales fue de 1,40 y 1,57 para el Maler y el Stradivarius, por lo que se deduce la presencia de aceite de linaza en el barniz. En la muestra del Venere la proporción obtenida fue de 1,98, en este caso se supone que contiene también aceite de linaza, aunque con menor seguridad [7].

Los resultados indican que el disolvente empleado en la elaboración del barniz en los tres casos fue aceite de linaza, lo que implica que el barnizaje de la superficie de los instrumentos de cuerda estudiados incluyó una larga etapa de secado, dando lugar a una capa muy fina.

### 5.3.2 Resinas terpénicas

Los parámetros analíticos de la biblioteca de espectros, tales como el tiempo de retención, iones más importantes del espectro de masas y su identificación se incluyen en la Tabla 34, mientras que su presencia en los diferentes materiales de referencia y muestra procedente del barniz de los instrumentos musicales estudiados se discute en la Tabla 35.

Los tres barnices analizados presentan una amplia variedad de diterpenoides, con tiempos de retención entre 23 y 35 minutos. Las muestras reales tienen en común los picos cromatográficos más intensos de este grupo, correspondientes a los ésteres metílicos de los ácidos 7-oxo-DHA y 15-OH-7-oxo-DHA, (compuestos nº 59 y 60 de la Tabla 34), así como otros derivados de los anteriores (compuestos nº 62; 63; 67 y 68 en la Tabla 34) [77,94]. Los dos primeros son característicos de resinas de *Pinaceae* muy oxidadas [64,84], categoría a la que pertenecen la colofonia y la trementina de Venecia. Otras sustancias de tipo pimarano y abietano también pudieron ser caracterizadas, a pesar de la baja intensidad de sus correspondientes picos cromatográficos, debido a su desaparición progresiva causada por el envejecimiento natural

#### 5.3.2.1 Muestra procedente del barniz de un laúd de Maler

El análisis de la muestra reveló la presencia de derivados oxidados de los compuestos característicos de resinas de *Pinaceae*. Los picos cromatográficos correspondientes a los labdanoides, larixol y acetato de larixilo, específicos de la trementina de Venecia. No obstante, debido al avanzado grado de envejecimiento, no se puede establecer si estas sustancias estaban presentes en el barniz original y se oxidaron completamente, o si nunca formaron parte de la capa filmógena. Por ello, se deduce que para la elaboración del barniz se utilizó una resina diterpénica proveniente de *Pinaceae*, sin especificar si se trata de colofonia o trementina de Venecia.

El análisis de la muestra reveló la presencia de una abundante fracción triterpénica, con once sustancias detectadas que no coinciden con las identificadas en el dammar y mastic patrón.

El estudio de los espectros de masas de los cuatro compuestos más importantes de la fracción triterpénica (n° 74; 75; 83 y 86 de la Tabla 34), muestra un pico intenso a 218  $m/z$ , seguido de uno menos intenso a 203  $m/z$ . Estos fragmentos son característicos de una ruptura primaria de un triterpenoide pentacíclico, con un doble enlace en la posición 12 (series 12-urseno y 12-oleaneno), a través de un mecanismo retro-Diels-Alder, seguido de la pérdida de un grupo metilo [178,295]. Dos de los compuestos considerados (n° 83 y 86 de la Tabla 34), identificados como *â*- y *á*-amirenona, respectivamente, se encuentran presentes en el elemi de Manila (*Canarium luzonimicum* o *C. commune*), copal mexicano (*Bursera cuneata*) [85] y en franquinciense eritreo (*Boswellia* sp.) [178], perteneciente a la familia *Burseraceae*. Por su parte, los compuestos n° 74 y 75 (Tabla 34), se identificaron como 24-noroleana-3,12-dieno y 24-norursa-3,12-dieno, respectivamente, a partir de sus espectros de masas y orden de elución, las cuales se han detectado en las resinas *Boswellia carterii*, *B. serrata* y *B. rivae* [295], así como en muestras arqueológicas resinosas, caracterizadas como olíbano, encontradas en tumbas egipcias fechadas en 1897-1844 A.C. [178].

Los compuestos n° 72 y 73 (Tabla 34) (de masa molecular 392) están relacionados con los n° 74 y 75 (Tabla 34) (de masa molecular 394). La comparación entre los espectros de masas sugiere que sus estructuras se diferencian en una insaturación, por lo que se identifican como el 24-noroleana-3,9(11),12-trieno y 24-norursa-3,9(11),12-trieno, respectivamente [295], los cuales no han sido anteriormente detectadas en muestras procedentes de objetos históricos. La aparición de estas sustancias se debe probablemente a modificaciones experimentadas por los compuestos iniciales de la capa filmógena, debido al envejecimiento natural (desde el siglo XVI), degradación térmica durante la preparación del barniz o durante la misma inyección de la muestra en el sistema cromatográfico.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la fracción triterpénica del barniz proviene de una resina o goma resina de la especie *Burseraceae*, y posiblemente del género *Boswellia*. No es posible una caracterización más precisa acerca del origen botánico de esta resina triterpénica, debido a la ausencia de biomarcadores de las resinas frescas de *Burseraceae*, y a la falta de información sobre los productos de degradación de esta clase de material.

La presencia de resinas triterpénicas en el barniz de un laúd de Maler de 1529-1555, puede relacionarse con los ingredientes “elemi” e “incienso”, citados en recetas de barnices de los siglos XIV-XVII. Aunque en la actualidad, la denominación “elemi” se utiliza generalmente para el elemi de

Manila (*C. luzinicum*), en textos antiguos la misma palabra se empleaba para referirse, entre otros, a resinas procedentes de árboles pertenecientes al género *Icica*, así como al elemi africano (o franquinciense africano), proveniente del *Boswellia frereana* [296].

#### 5.3.2.2 Muestra procedente del barniz de un violín de Stradivarius

El análisis de la fracción orgánica del barniz del violín de Stradivarius permitió la identificación de los labdanoides acetato de larixilo (nº35), larixol (nº29) y el sesquiterpenoide epimanol (nº18) (en la Tabla 34), específicos de la trementina de Venecia, además de otros diterpenoides característicos de las resinas procedentes de *Pinaceae*. Estos resultados muestran que la trementina de Venecia es uno de los constituyentes del barniz. Sin embargo, no se puede establecer si además está mezclada con colofonia, u otras resinas de pino [84,297].

Se detectaron asimismo una serie de triterpenoides (nº73; 74 y 75 en la Tabla 34), cuyos correspondientes picos cromatográficos presentan una intensidad muy baja, los cuales provienen probablemente de una contaminación. Por ello, no es posible asegurar ni tampoco rechazar la presencia de una fracción triterpénica.

#### 5.3.2.3 Muestra procedente de la capa filmógena de la tiorba de Venere

Los resultados obtenidos a partir del análisis por GC/MS de la muestra procedente de la tiorba de Venere son semejantes a los del Stradivarius. La detección de acetato de larixilo muestra asimismo que la trementina de Venecia forma parte del barniz, sin que se pueda excluir la presencia de otras resinas de tipo *Pinaceae*. La comparación de la intensidad de los picos cromatográficos de los pimaranos y abietanos correspondientes a los ácidos 7-oxo-DHA y 15-OH-7-oxo-DHA, muestra que la resina diterpénica de la tiorba está en un estado de oxidación más avanzado que en el caso del Stradivarius. Esta observación es coherente con el hecho que la tiorba de Venere fue elaborada 120 años antes que el violín de Stradivarius.

Los triterpenoides detectados cuyos picos cromatográficos presentan baja intensidad (nº73;74 y 75 en la Tabla 34) provienen probablemente de una contaminación, por lo que, al igual que en el caso del barniz del Stradivarius, no se puede llegar a una conclusión definitiva acerca de la presencia de una fracción triterpénica en la capa filmógena.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

**Tabla 34.** Parámetros analíticos almacenados en la biblioteca de espectros acerca de las sustancias encontradas en los materiales de referencia y en las muestras reales, a partir de su análisis por GC/MS a través de la metodología propuesta (numeradas en orden creciente de tiempo de retención a partir de 7,50 minutos).

n°	T.R. (min)	nombre (propuesto)	masa molecular	iones más abundantes ( <i>m/z</i> ) (proporción relativa (%))
1	7,84	mirceno [67]	136	136(10); 121(20); 107(20) 93(75); 91(90); 67(100)
2	8,76	no identificado	176	176(10); 174 (100); 156(10); 127 (20)
3	8,80	linalool [69]	154	137 (15); 121 (20); 105 (15); 93 (80); 91(100)
4	10,19	á-terpentinol	154	136 (55); 121 (55); 107 (10); 93 (100); 91 (80)
5	10,38	careno	136	316 (60); 121 (70); 93 (100); 91 (95); 77 (60)
6	10,89	no identificado	204	203 (80); 184 (10); 174 (100)
7	11,10	acetato de linalilo [69]	196	137 (10); 121 (20); 105 (15); 93 (70); 91(100)
8	12,49	no identificado	264	-----
9	13,44	valenceno o semejante	204	204(40);189(50);161(100); 133(55);119(55);105(70);91(95)
10	13,55	cariofileno o semejante	204	204(10);189(20);161(25);133(45) 119(35);105(60); 91(100)
11	13,63	â-elemento	204	204(10);189(20);161(30);121(60) 105 (65); 91 (100)
12	14,40	no identificado	180	-----
13	15,44	cariofileno oxidado	220	121 (20); 105 (45); 91 (100)
14	15,56	neocloveno o semejante	236	236 (30); 204 (30); 176 (100); 161 (95);105 (60)
15	16,80	no identificado	208	208 (100); 177 (75); 146 (20)
16	17,51	no identificado	250	250 (30), 235 (35), 190 (55) 175 (100); 119 (50)
17	17,56	3-(6,6-dimetil-2- metilenciclohex-3- enilideno)-1-metilbutil acetato	248	248 (10); 188 (50); 173 (100)
18	22,35	epimanol [74]	290	272(20);257(80);244(30);229(20) 202(30);190(30);175(30);161(30)
19	23,65	no identificado	270	270 (100); 242 (20); 227 (55); 199 (95);185 (30)
20	24,86	diterpenoide no identificado	310	298(80);283(30);241(35);227(40) 216 (100);213 (30)
21	25,02	diterpenoide no identificado	316	316 (5);300(95);285(100); 203 (40);189 (30)
22	25,20	diterpenoide no identificado	316	316(10);286(70);271(35);257(60) 253(50);243(30);239(30);201(30); 187 (30)
23	25,25	metil cis-comunato [82]	316	316(70);301(40);241(85);12 (75) 105 (80); 91 (100)
24	25,33	diterpenoide no identificado, sin -OH	304	304 (5); 289 (100); 257 (30) 230 (30); 215 (25); 207 (20)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

n°	R.T. (min)	nombre (propuesto)	masa molecular	iones más abundantes (m/z) (proporción relativa (%))
25	25,38	pimaral o semejante	286	286(90); 291(100); 253(30); 241(90)
26	25,57	metil pimarato [74]	316	316(30);301(30);257(40);241(20) 180 (20); 121 (100)
27	25,77	metil trans-comunato [84]	316	316(50);301(60);256(50);241(80) 175 (70); 105 (75); 91 (100)
28	25,85	metil sandaracopimarato [74,82]	316	316(40);301(50);287(25);257(30) 241 (35);121 (100)
29	25,86	larixol [74]	306	301(10);288(20);273(30);275(60) 121 (50); 105(60);91(95);79 (100)
30	26,55	diterpeno no identificado	316	316(10);301(25);287(30);256(35) 241 (40); 188 (30); 121 (100)
31	26,56	metil palustrato [74]	316	316(30);301(15);287(15);256(70) 241 (100); 227 (10); 187 (10)
32	26,69	metil isopimarato [74]	316	316(45);301(95);257(15); 241(100);185 (25)
33	27,00	metil 6-deshidro-DHA	312	312(50);237(100);197(85); 195(70)
34	27,14	metil DHA [74]	316	314 (10); 299 (20); 239 (100)
35	27,71	acetato de larixilo [74]	348	288(10);270(30);255(100);242(40) 227 (30); 200 (40); 185 (70)
36	27,75	no identificado	316	316(10);274(40);256(25);161 (25) 121 (100)
37	28,10	metil abietato [74,82]	316	316(40);273(10);256(100);241(50) 213 (30); 185 (30)
38	28,31	no identificado, sin -OH	336	336(10);289(20);255(25);227(30) 211(30);204(100);189(95);119(60)
39	28,33	no identificado, sin -OH	-	305(10);302(15);287(40);255 (80) 227 (90); 211 (100)
40	28,80	no identificado	336	335 (100); 266 (45); 202 (25)
41	28,83	no identificado, sin -OH	320	320(5);302(30);287(85); 227 (100)
42	28,84	no identificado, sin-OH	300	300(50);287(15);268(25);240 (20) 225 (100)
43	28,88	diterpenoide no identificado	312	312 (10); 297 (20); 237 (100)
44	29,02	diterpenoide no identificado	342	342 (100); 185 (60)
45	29,09	metil neoabietato [74]	316	316(95);30 (10);257(20);241 (20) 187(20);181(40);148(60);135(100) 362(10);247(35);330(10);315 (30)
46	29,19	no identificado, sin OH	362	303(75);288(100);261(90);201(60) 175 (60); 121 (95)
47	29,20	no identificado	336	336 (10); 276 (65); 121 (100)
48	29,36	no identificado	364	364(15);304(95);161(40);121(100)
49	29,69	no identificado, sin OH	362	362(5);347(35);330(25);315 (20) 302 (70); 189 (70); 121 (100)
50	29,71	no identificado	319	319(20);301(20);274(30);256 (40) 241 (70); 189 (40); 121 (100)
51	29,74	no identificado	344	344 (20);299(25);262(30);225 (80) 91 (95); 77 (100)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

n°	R.T. (min)	nombre (propuesto)	masa molecular	iones más abundantes (m/z) (proporción relativa (%))
52	29,87	no identificado, con OH	312	312 (25); 237 (100); 195 (25)
53	30,07	diterpenoide no identificado	314	314(70);299(100);257(35);177(25)
54	30,12	diterpenoide no identificado	314	314(40);254(100);239(40);197(10), 183 (20)
55	30,20	no identificado, con OH	332	332(5);317(10);303 (55); 289 (70) 258 (90); 201 (75); 91 (100)
56	30,34	metil 15-OH-DHA	330	330(10);315(70);255(100);237 (20)
57	30,46	diterpenoide no identificado	314	314 (20); 299 (45); 262 (100)
58	30,82	dimetil agatato [82]	362	362(5);347 (35);330(20);315 (30) 302(65);271(45);189(60); 121(100) 328(30);296(15);268(15); 253(100);241(20)
59	31,12	metil 7-oxo-DHA [74]	328	319 (20); 303 (95); 289 (60); 271(50);243 (60);107 (65);91(100)
60	31,88	no identificado, sin OH	-	271(50);243 (60);107 (65);91(100)
61	32,26	metil 15-metoxi-DHA	344	344 (70), 329 (100), 269 (40)
62	32,41	posible metilación de n° 59 y 65 [94]	326	326(30);215(70);204 (95);109(100)
63	32,65	posible metilación de n° 59 y 65 [94]	326	326(50);294(20);251 (100);185(30)
64	33,07	no identificado	-	370(30);340(70);325(50);173(70); 91(100)
65	34,03	metil 15-OH-7-oxo-DHA	344	329 (100); 269 (15); 187 (15)
66	34,13	diterpenoide no identificado	328	328 (60), 253 (100)
67	35,10	posible metilación de n° 59 y 65 [94]	356	356 (5); 245 (60);205 (100)
68	36,35	posible metilación de n° 59 y 65 [94]	372	372 (80); 165 (40); 152 (100); 112(50)
69	36,42	no identificado	-	-----
70	37,03	no identificado	362	362 (60);347 (100); 225 (20); 209(40)
71	37,49	no identificado	410	358(90);315(80);205(70);95(95); 79(100)
72	38,01	posiblemente 24-nor oleana-3,9(11),12-trieno [295]	392	392 (100); 377 (40); 185 (30); 174(40); 157 (40)
73	38,84	posiblemente 24-norursa- 3,9(11),12-trieno [295]	392	392(100);377(20);255 (20);225(30)
74	39,08	posiblemente 24- noroleana-3,12-dieno [178,295]	94	394 (10);379 (5);218 (100);203(60) 189 (30)
75	39,78	posiblemente 24-norursa- 3,12-dieno [178,295]	394	394(10);379 (5); 218 (100);203(20) 189 (20)
76	41,67	triterpenoide no identificado	454	-----
77	42,10	triterpenoide no identificado	422	-----

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

n°	R.T. (min)	nombre (propuesto)	masa molecular	iones más abundantes (m/z) (proporción relativa (%))
78	42,21	triterpenoide no identificado	424	424(40);409(100);298 (20);257(50)
79	42,61	triterpenoide no identificado	426	426(30);411(100);393 (70);259(40)
80	43,10	semejante a lupenona	424	424 (100), 313 (60), 205 (90)
81	43,33	triterpenoide no identificado	426	426(30); 411(100); 393(70); 259(50)
82	43,38	posiblemente 24-norursa- 3,12-dien-11-ona [295]	408	408 (60); 393 (30); 232 (100)
83	43,42	á-amirenona [53,85]	424	424 (20); 218 (100)
84	43,49	dammaradienona [53]	424	424(90);409(10);381(15); 313(70) 205 (100); 189 (70)
85	43,89	dammaradienol [53]	426	426 (40); 408 (15); 315 (30) 207(80); 189 (100)
86	44,06	á-amirenona [53]	424	424 (20);409 (10); 218 (100) 203(30);189 (25)
87	44,25	á-amirina [53]	426	426(10);408(30);393(25);218(100); 203 (70); 189 (40)
88	45,13	metil dammarenolato [53]	472	454(45); 411(20); 385(100); 343(20)
89	46,38	metil moronato [53]	468	468 (20); 409 (10); 262 (30), 248(50); 203 (30); 189 (100)
90	46,67	metil oleanonato [53]	468	468 (20); 262 (60); 203 (100)
91	46,70	hidroxidammarenona [53]	442	424 (80);409 (10);355 (85); 311(70); 298 (55); 205 (100)
92	46,92	aldehido olenanónico [53]	438	438(10);409(10);232(25); 203(100)
93	47,46	metil ursonato [53]	468	468 (10); 409 (5); 262 (100); 203(75); 133 (50)
94	47,63	aldehido ursónico [53]	468	438 (10);232(20);203(100);133(70)
95	47,76	metil isomasticadienonato [53]	468	468 (10);453(100);435 (10); 421(50);393 (10);257 (20)
96	48,24	triterpenoide no identificado	422	422(5);410(10);391(5);203(100)
97	48,80	metil masticadienonato [53]	468	468 (10); 453 (100); 435 (10); 421(40); 393 (10); 257 (100)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

**Tabla 35.** Información almacenada en la biblioteca de espectros acerca de la presencia las sustancias encontradas en cada muestra real y material de referencia\* (numerados como en la Tabla 34).

\*materiales de referencia: 1=esencia de trementina, 2=esencia de lavanda, 3=benjuí, 4=colofonia, 5=trementina de Venecia, 6=sandaraca 7=copal de Manila, 8=mastic, 9=dammar. Para mayor claridad, los resultados obtenidos del análisis del alcanfor y la goma laca no se incluyen, ya que no se encontraron en las muestras procedentes de los barnices.

n°	Maler	Strad	Venere	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1				X	X							
2						X						
3					X							
4								X				
5								X				
6						X						
7					X							
8						X						
9				X	X							
10				X	X							
11								X				
12						X						
13				X	X							
14	X		X	X	X							
15						X						
16	X			X	X							
17	X			X	X							
18		X						X				
19					X							
20									X			
21									X			
22								X				
23										X		
24										X		
25								X				
26							X					
27								X	X			X
28		X	X		X	X	X	X	X	X		
29		X						X				
30										X		
31	X	X	X				X	X				
32		X	X				X	X				
33	X	X	X								X	
34	X	X	X				X	X			X	
35		X	X					X				
36									X			
37		X					X	X		X	X	
38										X		
39										X		
40						X						
41										X		
42	X		X							X		
43	X	X	X					X				
44			X									
45		X					X	X				
46										X		
47									X			
48									X			
49										X		
50									X			

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. BARNICES DE INSTRUMENTOS DE CUERDA

n°	Maler	Strad	Venere	1	2	3	4	5	6	7	8	9
51	X											
52		X					X					
53									X			
54							X	X				
55										X		
56		X	X				X					
57	X							X				
58									X	X		
59	X	X	X				X	X	X		X	
60										X		
61	X	X	X									
62	X											
63	X	X	X				X				X	
64	X											
65	X	X	X				X					
66	X	X	X									
67	X											
68	X											
69	X											
70	X											
72	X											
73	X	X	X									
74	X	X	X									
75	X	X	X									
76	X											
77	X											
78											X	
79											X	
80	X											
81											X	
82	X											
83	X											
84												X
85												X
86	X											
87											X	
88												X
89											X	
90											X	
91												X
92											X	X
93												X
94												X
95											X	
96											X	
97											X	

## **6. Caracterización de resinas sintéticas utilizadas en obras de arte modernas mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas con pirólisis previa**

Las resinas sintéticas son una amplia categoría de materiales modernos con una extensa gama de propiedades, ampliamente utilizados desde el siglo XIX en la elaboración de obras de arte pictóricas, así como en tratamientos de restauración y conservación de obras artísticas más antiguas, por lo que están presentes en numerosos objetos de interés artístico/histórico. La diferenciación entre los diversos materiales poliméricos utilizados por el artista o el restaurador resulta de gran importancia para la propuesta de tratamientos de conservación/restauración adecuados [6].

La metodología analítica propuesta para el análisis de los polímeros sintéticos está basada en la pirólisis directa de la muestra sólida sin tratamiento previo ni adición de reactivo derivatizante, seguido de la separación de los fragmentos por cromatografía gaseosa y su identificación a partir de sus correspondiente espectros de masas. En primer lugar se analiza una amplia colección de diversas resinas sintéticas utilizadas con propósitos artísticos (descritas en el apartado 1.6 del Capítulo III y expuestas en la Tabla 5 en el apartado 6.1 del Capítulo IV), almacenando la información acerca de los fragmentos característicos en cada caso, así como de otras sustancias minoritarias detectadas.

Las condiciones instrumentales aplicadas fueron previamente optimizadas en un estudio anterior para la caracterización de pigmentos sintéticos en obras pictóricas, debido a que en muestras reales ambas clases de materiales se estudian conjuntamente. No obstante, se estableció la temperatura ideal para la pirólisis para cada una de las resinas poliméricas consideradas. Finalmente el método analítico sugerido se utilizó para la caracterización de las resinas sintéticas en las muestras procedentes de pinturas artísticas, mediante la comparación de los fragmentos encontrados con los característicos de los patrones. Asimismo se identificaron otros materiales orgánicos, como aceites secantes, ceras y plastificantes.

### **6.1 Estudio de resinas sintéticas patrón**

El análisis de las muestras procedentes de los patrones, a través del procedimiento mediante Py-GC/MS expuesto con anterioridad, proporciona el pirograma de cada uno de ellos, junto con los espectros de masas de los picos cromatográficos más importantes.

La influencia de la temperatura sobre la ruptura térmica se estudió mediante la comparación, para cada resina sintética (Tabla 5 del apartado 6.1 del Capítulo IV), de los pirogramas obtenidos a tres temperaturas (590; 650 y 794°C). Para las resinas de poliestireno (Kraton G), resina de

hidrocarburos saturada (Arkon P90), resina de indeno-benzofurano (resina de cumarona), acetatos de polivinilo (Mowilith, PVAc, Palmer Cement), butiral de polivinilo (Mowital B20H), polímero cetónico (AW2, Laropal A81), resinas fenólicas y poliácroleínas, no se encontraron diferencias significativas entre los fragmentos proporcionados por la pirólisis a las temperaturas consideradas. No obstante, para los polímeros de base de pigmento acrílico, Paraloid y Keton N, se aprecian diferencias en los compuestos detectados.

Los fragmentos obtenidos permiten obtener información útil para evaluar la estructura de cada polímero, la presencia de posibles contaminantes y la caracterización de la correspondiente resina sintética en muestras. Así pues, los fragmentos denominados característicos equivalen a los monómeros de la correspondiente resina sintética, y resultan los más útiles para su caracterización. Otras sustancias detectadas corresponden a derivados de unidades mayores o resultado de reorganizaciones de los productos formados tras la pirólisis.

La relación de los fragmentos detectados en el ámbito de este amplio estudio, junto a su presencia en cada una de las muestras (patrones y reales) se expone en las Tablas 36 y 37, respectivamente.

#### 6.1.1 Polímeros de vinilo

Las resinas polivinílicas estudiados fueron las siguientes: un polímero de estireno-etileno/butileno-estireno (SEBS) (dos versiones comerciales: Kraton G1650 y Kraton G1657), una resina de hidrocarburos saturada (nombre comercial Arkon P90), una resina de indeno-benzofurano (cumarona), acetato de polivinilo (tres versiones comerciales: Mowilith, PVAc y Palmer Cement), butiral de polivinilo (Mowital B20H) y resinas acrílicas (Paraloid y una pigmento blanco de titanio con base acrílica). Las resinas se exponen en la Tabla 5 del apartado 6.1 del Capítulo IV de la presente memoria.

Ambos derivados comerciales de polímero de SEBS muestran una elevada cantidad del estireno, considerado como el fragmento característico, y tolueno. Los demás monómeros (etileno y butileno), no aparecen debido a su baja masa molecular y elevada volatilidad. En la muestra de Kraton G1657 se encuentran además trazas de hidrocarburos, probablemente provenientes del tamizado utilizado en la purificación.

Los fragmentos característicos del Arkon P90 son alquilociclohexanos saturados como el metilciclohexano, etilciclohexano, 1-etil-3-metilciclohexano, (1-metiletil)ciclohexano y 1-etil-4-metilciclohexano, procedentes de la estructura policíclica saturada de la resina. Otros fragmentos identificados fueron alquilociclohexeno, indeno y decahidronaftaleno.

Los compuestos identificativos de la resina de cumarona detectados a

través del análisis por Py-GC/MS fueron: benzofurano, indeno, metilbenzofurano y metilindeno, las unidades monoméricas de las resinas. Otras moléculas encontradas fueron compuestos con anillos aromáticos.

Los productos pirolíticos de los acetatos de polivinilo son el ácido acético, procedente del polímero y el benceno, producto de reorganización de fragmentos menores. Otras sustancias identificadas en los pirogramas fueron naftaleno, metilnaftaleno, bi-fenilo y un amplio grupo de alquilbencenos. En el Palmer Cement se encuentran asimismo benzaldehído y acetofenona, procedentes probablemente el disolvente del polímero. Las tres clases de acetato de polivinilo serían indistinguibles en una muestra real.

El pirograma del derivado del butiral de polivinilo Mowital B20H, presenta como fragmentos característicos el butanal, obtenido a partir de la descomposición del polímero, y el benceno resultado de reorganizaciones de fragmentos análogos a los producidos en el acetato de polivinilo. Otras sustancias detectadas fueron: ácido butanoico, benzaldehído, 3-penten-2-ona y una serie de alquil derivados del benceno.

El estudio de una pintura de titanio de base acrílica se llevó a cabo con el objetivo de ampliar la información acerca del comportamiento de los poliacrílicos en la pirólisis. Los fragmentos característicos fueron los siguientes monómeros acrílicos: metil acrilato, metil metacrilato, etil metacrilato, isobutil acrilato, butil acrilato, isobutil metacrilato, butil metacrilato. Asimismo se detectó el antioxidante butil hidroxitolueno. La temperatura de pirólisis influye de forma considerable sobre el resultado. A 590°C, se producen una gran cantidad de compuestos con núcleos aromáticos como etilbencenos y naftaleno, así como ciclohexadienonas polisustituídos y otras moléculas de elevado peso molecular no identificadas. Sin embargo a 650°C la cantidad de compuestos detectados es mucho menor, mientras que a 764° se produce una situación intermedia.

El polímero de Paraloid se estudió para su identificación y establecer a que clasificación pertenece. Los productos de pirólisis característicos fueron los siguientes: metil acrilato, metil metacrilato, etil metacrilato y ácido metacrílico. No obstante, los compuestos más abundantes fueron etil metacrilato y metil acrilato, por lo que se propone que se trata de Paraloid B72. Asimismo se encuentran alquilbencenos, probablemente procedentes del disolvente o de reorganizaciones durante la pirólisis. Por otro lado el perfil de los pirogramas depende de la temperatura de ruptura térmica aplicada. A 590 y 764°C se forman 1-(4-etilfenil)etanona y diversas sustancias de alto peso molecular, así como indicios de plastificante. A 650°C no se detectaron estos compuestos. De forma general, para los polímeros acrílicos la pirólisis a 590°C proporciona un número mayor de fragmentos.

### 6.1.2 Polímeros de condensación

Para el presente estudio se analizaron los siguientes polímeros de condensación: resina alquídica, resinas cetónicas (cuatro productos comerciales: AW2 en polvo con número de inventario 90.34.13; AW2 en forma compacta, n° de inventario 90.34.14; Keton N y Laropal A81), resinas de fenol formaldehído (dos versiones comerciales, con número de inventario 90.39.4 y 90.39.6) y acroleína (Akroid). Las resinas y números de inventario corresponden a los expuestos en la Tabla 5 del apartado 6.1 del Capítulo IV.

En la resina alquídica se detectó gran cantidad de ácido ftálico, junto a compuestos fenólicos, probablemente derivados de este último, restos de ácido oleico, ácidos carboxílicos cortos y derivados con carbonilo. El ácido ftálico se considera como el fragmento característico.

Los pirogramas obtenidos en los análisis de la muestra de AW2 en polvo (n° 90.34.13) muestran los siguientes de fragmentos característicos, que resultan claramente procedentes de un polímero cetónico: ciclohexanol, ciclohexanona y diversos correspondientes alquilderivados. Además se detectaron ciclohexenos, santeno, octahidropentalenos y otros hidrocarburos policíclicos saturados.

En la muestra procedente de la resina de AW2 en forma compacta (n° 90.34.14), se identificó una serie de monómeros acrílicos (isobutil metacrilato, 2metilpropil metacrilato, 2etilhexil metacrilato) y derivados alquilbencénicos, mientras que no se detectaron fragmentos característicos de resinas cetónicas. Probablemente se trate de un material acrílico erróneamente etiquetado.

Los fragmentos característicos detectados en Keton N fueron los mismos a los encontrados en la AW2: ciclohexanol, ciclohexanona y alquilociclohexanonas. Asimismo se encontraron moléculas de santeno, octahidropentaleno, triciclododecenos y otras sustancias no identificadas de elevado peso molecular. En este caso, se detecta un mayor número de fragmentos característicos tras pirólisis a 764°C.

La resina de Laropal A81 contiene una mezcla de sustancias, de las cuales se identificaron únicamente Z-1-1(butenil)azirina, 2,2-dimetil-1S-propandiol, 3-hidroxi-2,2-dimetilpropanal, metil 2,2-dimetil-3-hidroxi propanato, benzonitrilo y una considerable cantidad de sustancias no identificadas. Los fragmentos considerados como característicos son los más intensos, el metil 2,2-dimetil-3-hidroxipropanato, dos picos a t=10,214 y t=13,92 min, y cuyo pico molecular aparece a 187 y 287, respectivamente. El benzonitrilo no se puede utilizar como característico, ya que aunque contiene un nitrógeno, se encuentra en numerosos pigmentos sintéticos.

Las sustancias características de la resina fenólica n° 90.39.4 fueron una amplia variedad de alquilfenoles. Otros fragmentos detectados fueron alquilociclohexenos, alquilbenzaldehído y gran cantidad de alquilbencenos, así como naftalenos y metanoazulenos de elevado peso molecular. Por su

parte la otra resina fenólica estudiada (n° 90.39.6) contiene una elevada cantidad de alquilfenoles (fragmentos característicos), así como hidroxibenzaldehidos y alquilbencenos.

La resina poliacroleína (Akroid) está compuesta por una compleja mezcla de diversas sustancias como alquilbencenos, alquilfenoles, metoxibencenos, metoxifenoles, benzaldehidos y otros derivados cetónicos. La unidad monomérica acroleína es muy volátil y tiene un bajo peso molecular, por lo que no se detectó en el pirograma. En este caso no se considera ningún fragmento característico.

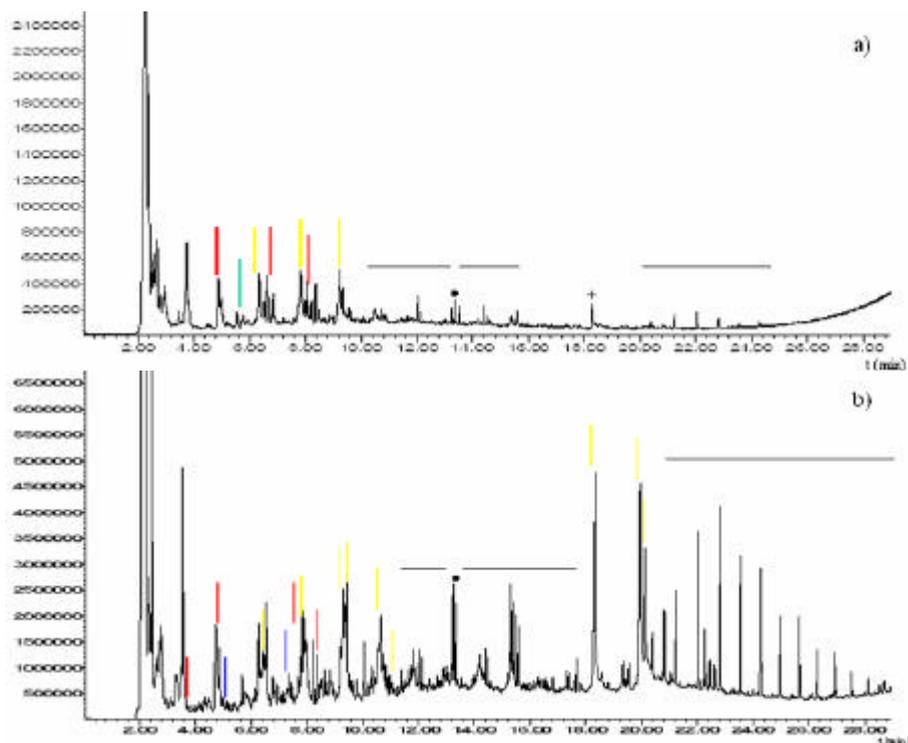
## 6.2 Estudio de muestras procedentes de una obra pictórica moderna

La información proporcionada por el análisis de los polímeros patrón de resinas sintéticas se utilizó para la caracterización de la resina presente en una obra pictórica del artista alemán contemporáneo Georg Baselitz (“Senta 1992/1993), representada en la Figura 40. El autor, nacido el 1937 en Deutschbaselitz (Sajonia, Alemania) se considera como uno de los máximos exponentes de la pintura contemporánea en Alemania. Las muestras se obtuvieron de una zona de color azul y otra de color negro. En ambos casos se presupone que el artista empleó un poliacrílico, por ser el material frecuentemente utilizado por el autor.



**Figura 40.** Imagen de la obra pictórica moderna: “Georg Baselitz, Senta”, 1992/1993, pintura sobre lienzo, 100,5 x 71 cm, Bayerische Staatsgemäldesammlungen, número de inventario 1785.

El estudio meticuloso de los pirogramas obtenidos a partir del análisis de las muestras artísticas permitió confirmar la presencia de compuestos correspondientes a las resinas sintéticas patrón, así como aditivos y otros materiales utilizados en pintura artística. Los pirogramas resultantes del estudio de la muestra coloreada de azul (a 590°C) y la de pigmento negro (a 764°C) se representan en la Figura 41.



**Figura 41.** Pirogramas (TIC) resultantes del análisis de muestras procedente de una pintura de Baselitz, (“Senta”, 1992/1993), en el primer caso de un área con pigmento azul (a) y otro con coloración negra (b). Los compuestos característicos se indican con rectángulos de la siguiente manera: aceites secantes en amarillo, resinas cetónicas en rojo, acrílicas en verde y fenólicas en azul. Las regiones con una distribución continua de hidrocarburos se muestran con una línea horizontal. Asimismo se indican los siguientes aditivos: el antioxidante butil hidroxitolueno ( ) y el plastificante éster ftálico (+).

En ambos casos se detectó una amplia cantidad de hidrocarburos. Se encontró una serie de alcanos lineales de número par e impar de átomos de carbono, por lo que se excluye que provengan de la cera de abeja. La distribución de hidrocarburos indica que probablemente sean restos de parafina. Asimismo se detectó en ambas muestras el aditivo antioxidante butil hidroxitolueno y los monoterpenos canfeno y á-canfolenal.

Los compuestos alquilbencénicos detectados en los pirogramas de todos los polímeros estudiados y en las muestras artísticas son

probablemente el resultado de reorganizaciones de fragmentos menores, por lo que su presencia no aporta información significativa para la caracterización de las resinas sintéticas.

#### 6.2.1 Área pigmentada de azul

La detección de ácidos grasos de cadena corta y aldehidos no permite establecer por sí sola la presencia de material oleoso, ya que no se encuentran ácidos carboxílicos más largos. Asimismo se encontró éster ftalílico, ampliamente utilizado como aditivo plastificante.

La detección de una serie de compuestos característicos de las resinas cetónicas (ciclohexanona, 2-metilciclohexanona y 2-etilciclohexanona) indica la presencia de resinas cetónicas de tipo AW2 o de Keton N. Por otra parte, la detección de metil propil metacrilato no resulta criterio suficiente para establecer la presencia de una resina poliacrílica.

#### 6.2.2 Área pigmentada de negro

La detección de ácidos esteárico, oleico, palmítico y sus productos de degradación como ácidos grasos de cadena corta, aldehidos y cetonas, permiten deducir la presencia de material oleoso en la muestra analizada.

La muestra analizada contiene los siguientes fragmentos característicos de polímeros cetónicos: ciclohexanona, 2-metilciclohexanona, 4-metilciclohexanona y 2-etilciclohexanona. La presencia de estos compuestos permite proponer el uso de resinas cetónicas como AW2 o Keton N para la decoración de la superficie de la obra pictórica. Asimismo se detectaron compuestos fenólicos, pero como los anillos aromáticos pueden formarse posteriormente mediante reorganizaciones, no se puede establecer la presencia de una resina de fenol-formaldehído.

**Tabla 36.** Parámetros analíticos de los fragmentos obtenidos a partir del análisis de las muestras patrón y procedentes de obra pictórica moderna mediante Py-GC-MS. Se indican los siguientes datos: orden y tiempo de elución bajo las condiciones de separación cromatográfica aplicadas; denominación (si se ha identificado) o relación carga masa ( $m/z$ ) del ion molecular (IM); iones más intensos en el espectro de masas.

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( $m/z$ )	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( $m/z$ )
1	2,503	acetona	43; 58; 44	26	4,038	ácido metacrílico	86; 69; 45
2	2,509	metil acrilato	55; 42; 43	27	4,038	etilciclohexano	83;55;112
3	2,523	2-butanona	42; 72; 71	28	4,197	3-metilenciclohepteno	93; 79; 91
4	2,672	butanal	43;44;72	29	4,205	2-hexenal	55; 49; 83
5	2,863	ácido acético	43;44;60	30	4,217	etilbenceno	91;106;77
6	2,932	1-hepteno	43;55; 54	31	4,540	1,3-dimetilbenceno	91;106;77
7	2,939	benceno	78;51;50	32	4,600	no identificado	95; 82;67
8	2,991	3-penten-2-ona	43; 69; 84	33	4,710	2-heptanona	43; 58; 71
9	3,043	metil-metacrilato	69;100;99	34	4,72	ciclohexanol	57; 82; 67
10	3,218	metilciclohexano	83;55;96	35	4,758	butil acrilato	55; 56; 73
11	3,315	Z-1-1(butenil)azirina	97; 82; 47	36	4,863	1-etil-3-metilciclohexano	97;55;126
12	3,340	4-metilciclohexeno	81; 67; 96	37	4,868	estireno	104; 78; 51
13	3,517	1-metilciclohexeno	81; 73;96	38	4,900	ciclohexanona	55; 42; 98
14	3,538	tolueno	91;92; 65	39	4,918	xileno	91; 106; 104
15	3,560	no identificado - IM=138	81;97;67	40	4,920	n-heptanal	70; 43; 42
16	3,598	etil metacrilato	69 99 86	41	4,931	no identificado - IM=125	85; 55; 125
17	3,603	n-hexanal	44 56 43	42	5,048	1-etil-4-metilciclohexano	97; 55; 69
18	3,632	1-metil-4-propilbenceno	105; 134; 91	43	5,102	metil 2,2-dimetil-3-hidroxi-propanato	102; 87; 73
19	3,671	1,3-ciclohexadieno	79; 78; 94	44	5,277	(1-metiletil)ciclohexano	82;83;55
20	3,725	1-octeno	70; 55; 56	45	5,310	(1-metiletil)benceno	105; 96; 110
21	3,798	2,2-dimetilpropanal	56; 55; 43	46	5,340	no identificado - IM=126	55;83;97
22	3,851	isobutil acrilato	43;56;73	47	5,425	2,2-dimetil-1 S-propanodiol	56, 55; 73
23	3,873	ácido butanoico	60; 74; 43	48	5,430	no identificado	67; 83; 82
24	3,926	3-hidroxi-2,2-dimetilpropanal	56 57 54	49	5,446	no identificado - IM=150	83;55;65
25	3,980	1,3-dimetil-1-ciclohexeno	95; 67; 116	50	5,478	isobutil metacrilato	69;56; 87

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )
51	5,544	2-metilpropil metacrilato	69; 56; 87	79	6,441	2,6-dimetilciclohexanona	69; 57; 126
52	5,604	2,6-dimetil-2,4-heptadieno	107; 93; 91	80	6,486	ácido hexánico	60; 43; 73
53	5,606	3-metilciclohexanol	71; 81; 57	81	6,600	spiro[5,6]decano	67; 83; 96
54	5,679	2-metilciclohexanona	69; 68; 112	82	6,619	no identificado - IM=169	67; 83; 95
55	5,680	2-propenilbenceno	117;118;91	83	6,627	1-metil-4-propilbenceno	105; 134; 83
56	5,709	3-metilciclohexanona	69, 56; 112	84	6,636	no identificado - IM=148	122; 94; 54
57	5,799	trans-octahidro-1H-indeno	67; 96; 81	85	6,760	1,4-dimetilbenzeno	119; 105; 134
58	5,802	4-metilciclohexanona	55; 112; 56	86	6,778	(2-metilprop-1-enil)ciclohexa-1,5-dieno	91; 119; 77
59	5,808	propilbenceno	91;120;92	87	6,789	1-metoxi-4- metilbenceno	122; 121; 77
60	5,808	isopropilbenceno	105; 77; 106	88	6,795	4-etil-1,2-dimetilbenceno	119; 105; 134
61	5,822	cis-biciclo[4.3.0]noneno	79;80;65	89	6,807	2-metil-cis-octahidropentaleno	81; 96; 55
62	5,849	benzaldehido	104;105;77	90	6,836	1-metil-2-(1-metiletil)benceno	119; 134; 91
63	5,979	1-metil-3-etilbenceno	105;120;77	91	6,89	1-etenil-2-metilbenceno	117;118;116
64	6,017	1,2,3-trimetilbenceno	105;120;91	92	6,911	canfeno	93; 67; 91
65	6,086	no identificado - IM=125	89; 57; 115	93	6,917	biciclo[3.3.1]nonano	81; 96; 54
66	6,107	cis-octahidropentaleno	67; 54; 82	94	6,971	no identificado - IM=142	102; 55; 98
67	6,114	â-pineno	93; 69; 91	95	7,004	indano	117;91;63
68	6,120	fenol	94; 66; 65	96	7,020	1-propenilbenceno	117;118;116
69	6,142	butil metacrilato	69; 87; 56	97	7,086	octahidro-5-methylindeno	81;98;65
70	6,169	no identificado - IM=118	104; 94; 76	98	7,114	2-hidroxibenzaldehido	122;65;93
71	6,173	[1H]-3a,4,5,6,7,7a-hexahidroindeno	79;80;93	99	7,136	indeno	115;116;89
72	6,185	etilmetilbenceno	105; 121; 69	100	7,150	1-propinilbenceno	115;116;91
73	6,185	benzoniitrilo	69; 57; 56	101	7,190	3-etenil-ciclohexanona	81; 67; 96
74	6,191	á-metilestireno	118;117;103	102	7,196	1,3-dietilbenceno	119;105;134
75	6,313	cis-octahidro-1H-indeno	81;67;80	103	7,234	no identificado - IM=156	57; 72; 156
76	6,333	2-pentilfurano	81; 60; 138	104	7,306	no identificado - IM=122	79; 94; 122
77	6,391	1,2,4-trimetilbenceno	105; 120; 77	105	7,318	2-metilfenol	108; 107; 77
78	6,406	benzofurano	118; 89; 63	106	7,319	trans-decahidronaftaleno	138; 67; 95

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes (m/z)	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes (m/z)
107	7,327	1,4-dietilbenceno	119; 105; 134	132	8,165	2,6-dimetil-2,5-ciclohexadieno	65; 136; 105
108	7,415	octahidro-4,7-metano-1H-indeno	95;67;79	133	8,171	2-metilpropenil)ciclohexa-1,5-dieno	81; 119; 134
109	7,417	1,2-dietilbenceno	105; 119; 134	134	8,247	2-etilciclohexanona	55; 98; 42
110	7,485	1-butilciclohexeno o octahidro-5-metilindeno	81;96;67	135	8,260	hidrocarburo no identificado	57;70;55
111	7,498	acetofenona	105;77;120	136	8,347	santeno	93; 91; 77
112	7,529	cis-2-metilenbisciclo[5.2.1.0(2,6)]nonano	79;95;121	137	8,377	á-camfenal	103; 93; 67
113	7,618	4-metilfenol	107; 108; 77	138	8,467	2-hidroxi-4-metilbenzaldehido	136;135;77
114	7,774	1-etenil-3-etilbenceno	117; 132; 115	139	8,502	no identificado - IM=144	73; 89; 101
115	7,823	2-metoxifenol	109; 124; 81	140	8,607	3-metil-2-butenilbenceno o (1,1-dimetil-2-propenil)benceno	131; 146; 91
116	7,830	no identificado - IM=150	81;121;67	141	8,700	no identificado - IM=186	59; 115; 72
117	7,833	o-isopropeniltolueno	132; 117; 115	142	8,703	2,4-dimetilfenol	107; 122; 121
118	7,835	2-nonanona	58; 55;	143	8,712	1,4-dihidronaftaleno	130;115;129
119	7,864	ácido heptánico	43; 55; 57	144	8,717	2-metilindeno	130;115;129
120	7,887	endo-triciclo[5.2.1.0(2,6)]decano	95; 67; 79	145	8,743	4-metiltriciclo[5.2.1.0(2,6)]decano	81;65;79
121	7,941	no identificado - IM=150	81;121;65	146	8,764	1-etenil-4-metoxibenceno	134; 91; 121
122	7,966	7-metilbenzofurano	131;130;103	147	8,809	1-hidroxi-4-metilbenzaldehido	136; 135; 107
123	7,968	2-metilprop-1-enil)ciclohexa-1,3-dieno	91; 134; 119	148	8,827	1,2-dihidronaftaleno	128;129;130
124	7,983	cis-decahidronaftaleno	67;81;97	149	8,972	no identificado -IM=143	71; 53; 89
125	8,001	n-C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	57; 43;71	150	8,973	etilfenol	107; 122; 77
126	8,042	2-metilbenzofurano	131;132;104	151	9,149	2,3-dimetilfenol	122; 107; 77
127	8,047	nonanal	57; 43; 56	152	9,200	naftaleno	128;127;126
128	8,078	2,6-dimetilfenol	122; 107; 77	153	9,217	no identificado - IM=160	128; 121; 91
129	8,096	feniletanona	81; 109; 43	154	9,235	ácido caprílico	60; 73; 43
130	8,125	1-metilbiciclo[3.2.1.0]octan-6-ona	93; 108; 92	155	9,248	3-metilenundecano	70;55;83
131	8,162	no identificado - IM=158	72; 43; 56	156	9,280	1-fenil-2-propin-1-ona	130;102;76

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes (m/z)	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes (m/z)
157	9,327	ácido graso no identificado	43; 58; 60	181	10,920	2-metilnaftaleno	142,141,115
158	9,330	1-dodeceno	55; 44; 65	182	11,034	1-metoxi-2- metilfenol	150; 143; 77
159	9,344	2-decanona	43; 58; 56	183	11,058	ácido ftálico	104; 76; 50
160	9,359	3,4-dimetilfenol	107; 122; 121	184	11,238	1-(3-metoxifenil)etanona	135; 150; 77
161	9,499	2,3,5-trimetilfenol	121; 136; 135	185	11,413	no identificado - IM=217	56; 99; 145
162	9,729	4-vinil-fenol	120; 91; 119	186	11,422	no identificado - IM=148	84; 55; 43
163	9,762	3-isopropilbenzaldehido	133; 148; 105	187	11,499	no identificado - IM=217	56; 99; 145
164	9,862	2-etilhexil metacrilato	55; 70; 57	188	11,566	2-(1,1-dimetiletil)-4- metilfenol	149 121 164
165	9,863	1,3-dihidro-2H-inden-2-ona	104;132;103	189	11,604	4-(1,1-dimetiletil)-2- metilfenol	149; 158; 121
166	9,908	3-etil-5- metilfenol	121; 136; 91	190	11,714	4-etenil-1,2-dimetoxibenceno (1,3,4,5,6,7-hexahidro-1,1,S,S- tetrametil-2S)-2H-2-4a- metanonaftaleno	164; 91; 149
167	9,908	2-cumaranona	78;134;106	191	11,818	ácido cáprico	148; 133; 77
168	10,059	2-hidroxi-4,6-dimetilbenzaldehido	150; 149; 121	192	11,830	1,1'-bifenil	73; 60; 56
169	10,059	4-oxononanal	43; 85; 71	193	11,873	metil 3-fenil-2-propenato	154,153;152
170	10,227	no identificado -IM=187	115; 69; 57	194	11,929	tetradeceno [IM=196]	131; 103; 162
171	10,354	1-(4-etilfenil)etanona	133; 148; 105	195	12,022	tetradecano [IM=198]	55; 43; 69
172	10,399	trimetilfenol	121 136 135	196	12,152	[1S-(1 á, 3aâ,4á, 8áâ)]decahidro-4,8,9- trimetil-9-metilen-1,4- metanoazuleno	55; 43; 57
173	10,448	3-fenil-3-propenal	131; 132; 103	197	12,283	no identificado - IM=185	91; 109; 81
174	10,582	2,3-dihidro-2H-inden-1-ona	132;104;78	198	12,546	ácido 3-fenil-2-propenoico	143; 129; 115
175	10,586	no identificado - IM=200	126; 67; 95	199	12,730	no identificado - IM=196	147; 148; 103
176	10,663	ácido pelargónico	60; 73; 57	200	12,920	no identificado - IM=257	112; 67; 95
177	10,721	1-trideceno	55; 43; 69	201	12,957	bis(1,1-dimetiletil)-2,5-ciclohexadien- 1,4-diona	56; 85; 131
178	10,770	1-metilnaftaleno	142,141,115	202	12,993	3,4-dimetoxibenzaldehido	117; 220; 135
179	10,777	2-metil-5-(1-metiletil)fenol	135; 148; 91	203	13,131		166; 165; 77
180	10,831	tridecano	57; 43; 71				

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )
204	13,144	2,6-ditercbutil-4-metilen-2,5-ciclohexadien-1-ona	161; 203; 185	228	15,040	benz[cd]indol-2(1H)-ona	169; 114; 141
205	13,230	[7R-trans-cyn-cis-triciclo[7.3.0.0(2,6)]-dodecanal	79; 78; 133	229	15,169	dibutil pentadienato	115, 171; 87
206	13,260	1-pentadeceno	55; 43; 57	230	15,245	no identificado - IM=228	134; 79; 194
207	13,354	pentadecano [IM=212]	57; 71; 43	231	15,291	1-heptadecino [IM=236]	55; 81; 67
208	13,404	no identificado - IM=192	111; 192; 67	232	15,372	8-heptadeceno [IM=238]	55; 43; 83
209	13,471	no identificado - IM=217	56; 87; 71	233	15,507	no identificado - IM=212	114; 56; 131
210	13,490	no identificado - IM=208	79; 149; 97	234	15,529	1-heptadeceno[IM=238]	55; 43; 57
211	13,493	no identificado - IM=180	79; 81; 162	235	15,569	no identificado - IM=287	56; 115; 131
212	13,495	no identificado - IM=192	79; 81; 94	236	15,611	heptadecano [IM=240]	57; 71; 43
213	13,531	(1á, 3aá, 7á, 8aá)octahidro-1,9,9-trimetil-4-metilen-1H-3a, 7-metanoazuleno	105; 118; 87	237	15,678	no identificado - IM=201	127; 126; 98
214	13,542	butil hidroxitolueno	205; 220; 57	238	15,786	no identificado - IM=255	93; 152; 151
215	13,692	no identificado - IM=122	111; 122; 67	239	16,052	no identificado - IM=255	93; 152; 151
216	13,735	no identificado - IM=259	56; 85; 157	240	16,343	3,5-di-tercbutil-4-hidroxibenzaldehido	219; 234; 191
217	13,898	no identificado - IM=192	111; 192; 67	241	16,505	fenantreno	178; 55; 43
218	13,912	no identificado - IM=192	111; 192; 67	242	16,534	no identificado - IM=255	200; 149; 121
219	13,928	no identificado - IM=287	115; 56; 132	243	16,626	no identificado - IM=212	98; 67; 83; 81
220	13,969	no identificado - IM=287	56; 115; 132	244	16,773	no identificado - IM=245	115; 56; 58
221	14,345	1-metil-7-(1-metiletil)naftaleno	169; 184; 154	245	17,256	no identificado - IM=210	98; 95; 94
222	14,426	hidrocarburo no identificado	55; 43; 83	246	17,339	9-heptadecanona	57; 43; 71
223	14,464	no identificado - IM=226	113,56,141	247	17,612	2-heptadecanona	58; 43; 59
224	14,507	hexadecano [IM=226]	57; 43; 71	248	18,286	plastificante (ftalato)	149; 73; 43
225	14,554	no identificado - IM=206	111; 206; 81	249	18,334	ácido palmítico	73; 60; 43
226	14,925	no identificado - IM=210	98; 67; 131	250	18,459	no identificado - IM=268	225; 42; 114
227	14,927	no identificado - IM=192	98; 131; 67	251	19,516	heneicosano	57; 43; 71

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. RESINAS SINTÉTICAS

n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )	n°	T.R. (min)	nombre	iones más abundantes ( <i>m/z</i> )
252	19,560	2-nonadecanona	43; 58; 59	266	22,545	no identificado - IM=304	94, 111; 79
253	19,596	no identificado - IM=325	195; 194; 93	267	22,812	pentacosano [IM=352]	57; 43; 71
254	19,835	no identificado - IM=325	195; 194; 250	268	22,957	no identificado - IM=425	355, 115; 59
255	19,901	ácido oleico	55; 69; 83	269	23,224	2-etilhexil ftalato	149, 57; 167
256	20,129	ácido esteárico	43; 55; 73	270	23,561	hexacosano [IM=366]	57; 44; 43
257	20,390	docosano [IM=310]	57; 43; 71	271	23,823	no identificado - IM=425	115, 355; 242
258	20,644	no identificado - IM=324	228; 149; 148	272	24,281	heptacosano [IM=380]	44; 53; 71
259	20,825	hidrocarburo no identificado	43; 55; 98	273	24,978	octacosano [IM=394]	57; 71; 43
260	21,226	tricosano [IM=324]	57; 71; 43	274	25,649	nonacosano [IM=408]	57; 71; 43
261	21,453	no identificado - IM=146	109; 43; 123	275	26,296	triacontano [IM=422]	57; 71; 43
262	21,781	no identificado - IM=311	181; 134; 236	276	26,926	heneitriacontano [IM=436]	57; 71; 43
263	22,036	tetracosano [IM=338]	57; 71; 43	277	27,539	hidrocarburo no identificado	57; 71; 43
264	22,045	no identificado - IM=295	325; 65; 42	278	28,137	hidrocarburo no identificado	57; 71; 43
265	22,387	no identificado - IM=304	94; 111; 79				

**Tabla 37.** Fragmentos detectados a partir del análisis mediante Py-GC-MS en cada una de las muestras procedentes de resinas sintéticas patrón\* y de la obra pictórica moderna\*\*. (La numeración de los fragmentos se corresponde con la de la Tabla 36). Los compuestos indicados con ( ) son los característicos de cada tipo de resina, mientras que los marcados con (X) son otros compuestos detectados en el análisis.

\*Materiales de referencia (denominación comercial): 1=Kraton G1650; 2=Kraton G1657; 3=Arkon P90; 4=resina de cumarona; 5=Mowilith; 6 =PVAc; 7=Palmer Cement; 8=Mowital B20H; 9=Pigmento Acrílico; 10=Paraloid; 11=AW2 (90.39.14); 12=AW2 (90.39.13); 13=Keton N; 14=Laropal A81; 15=Resina fenólica (90.39.4); 16=Resina fenólica (90.39.36); 17=Alkyd y 18=Akoid.

\*\*Muestras procedente de la obra pictórica de Baselitz de las áreas de coloración 19=azul y 20=negro.

n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																		X			26																				
2																					27																				
3									X	X	X						X	X	X	X	28																				
4																					29																				
5											X						X				30				X	X	X	X									X		X		
6																			X		31				X	X		X									X				
7											X						X	X	X		32			X																	
8								X													33																				
9																					34																				
10																					35																				
11														X							36																				
12			X									X									37			X	X	X	X	X	X							X			X		
13			X										X								38																				
14	X	X			X	X	X	X			X	X			X	X	X	X	X	X	39					X	X								X	X			X		
15			X																		40																				
16																					41																				
17																		X		X	42																				
18											X										43																				
19												X									44																				
20		X																			45																				
21														X							46			X																	
22																					47																				
23								X	X												48			X																	
24														X							49			X																	
25															X						50								X												



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. RESINAS SINTÉTICAS

n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
117																			X	X	150																X		X			
118																				X	151																					
119																				X	152					X	X	X		X											X	
120			X																		153																					
121			X																		154																					
122																					155	X																				
123																				X	156			X																		
124			X																		157																				X	
125	X								X												158	X																				
126																					159																				X	
127																			X	X	160																				X	
128																			X		161																				X	
129																					162																				X	
130													X								163																				X	
131														X							164																					
132															X						165			X																		
133																				X	166																					
134																					167			X																		
135	X																				168																					
136												X									169																					X
137																			X	X	170																					
138																X					171								X													
139														X							172																				X	
140															X						173																					X
141														X							174			X																		
142																X					175																					
143					X																176																					X
144																					177																				X	X
145			X																		178				X	X	X															
146																				X	179																					
147																X					180																					X
148				X	X	X	X														181				X	X																
149															X						182																					X



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. RESINAS SINTÉTICAS

n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
249																				X	264											X									
250														X							265										X										
251																				X	266										X										
252																				X	267																		X	X	
253									X												268												X								
254									X												269																X				
255															X					X	270																		X	X	
256																				X	271												X								
257																			X	X	272																		X	X	
258									X												273																				X
259																				X	274																				X
260																			X	X	275																				X
261																		X			276																				X
262									X												277																				X
263																			X	X	278																				X

## ***VI. CONCLUSIONES***

La investigación realizada ha permitido el desarrollo de diversas metodologías analíticas para la caracterización de una amplia colección de materiales orgánicos empleados en la elaboración de capas pictóricas y barnices de obras de arte: proteínas, ceras naturales, aceites secantes, resinas terpénicas y polímeros sintéticos, de acuerdo de los objetivos propuestos. En dichas metodologías se utilizan las siguientes técnicas analíticas: HPLC-UV-Visible, HPLC-Fluorescencia, GC/FID, GC/MS y Py-GC/MS, así como espectrometría de masas directa. Las metodologías propuestas se aplicaron con éxito para la identificación de los materiales estudiados en muestras reales procedentes de obras pictóricas. Como conclusiones derivadas de este extenso estudio se puede destacar:

**1.** La cromatografía líquida con detector de fluorescencia permite la diferenciación entre proteínas utilizadas como aglutinantes proteicos, tales como gelatina bovina, gelatina porcina, albúmina, caseína y huevo.

1.1 La reacción de los aminoácidos con el o-ftalaldehído proporciona derivados fluorescentes con sensibilidad, límite de detección e intervalo lineal adecuados para la detección de dichos analitos procedentes de los patrones de proteínas y extraídos de muestras procedentes de obras pictóricas.

1.2 Se establecieron las condiciones instrumentales del cromatógrafo líquido (composición de las fases eluyentes, programa de gradiente, fase estacionaria, flujo y temperatura), que permitieron la separación de los derivados de los aminoácidos, sin interferencias con otros compuestos de la matriz.

1.3 La caracterización de las proteínas se realizó satisfactoriamente a partir de la cantidad relativa de aminoácidos, calculados a partir del área del pico cromatográfico del OPA-derivado de cada uno de ellos frente al OPA-derivado de la leucina.

1.4 La metodología propuesta se ha evaluado mediante su aplicación a una serie de muestras procedente de obras pictóricas decoradas en ténpera, donde se caracterizó proteína de huevo.

**2.** Se ha desarrollado un método cromatográfico para caracterizar ceras naturales, como cera de abeja, carnauba y cerasina, de forma inequívoca, tomando como parámetros identificativos las cantidades relativas de hidrocarburos y de ácidos grasos totales de los mismos.

2.1 Los ácidos carboxílicos precisaron una derivatización con etilcloroformiato para obtener los correspondientes derivados volátiles. Se

logró asimismo fijar las condiciones cromatográficas para separar correctamente los hidrocarburos y los derivados etílicos de los ácidos grasos.

2.2 Se estableció una metodología de hidrólisis ácida y extracción con un disolvente orgánico para la separación de los analitos del resto de los compuestos de la matriz.

2.3 La caracterización de las ceras se fundamenta en el cálculo de los cocientes de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los hidrocarburos entre C<sub>20</sub>H-C<sub>36</sub>H respecto al n-heptacosano, y los cocientes de las áreas cromatográficas correspondientes a los etilderivados de los ácidos mirístico, oleico, esteárico y araquídico respecto al etilderivado del ácido palmítico. El tratamiento quimiométrico de los valores calculados, mediante Análisis por Componentes Principales, proporciona una discriminación adecuada entre cera de abeja, la cera de carnauba y cerasina. Así pues, en el correspondiente gráfico de puntuaciones las muestras analizadas aparecen agrupadas por la clase de cera.

2.4 Un nuevo tratamiento estadístico por PCA se llevó a cabo para diferenciar las ceras naturales en presencia de otros materiales con ácidos grasos. Así pues, se seleccionaron como variables estadísticas únicamente los hidrocarburos, alcanzando una adecuada diferenciación entre los patrones de ceras naturales estudiados.

2.5 El método analítico propuesto se aplicó con éxito a la caracterización de cera natural en muestras procedentes de una oleoresina sobre tabla.

**3.** Se ha propuesto con éxito una metodología para la caracterización de aceites secantes mediante HPLC utilizando detectores de absorción UV-Visible y de fluorescencia. Se seleccionaron muestras procedentes de patrones de aceites secantes frescos y envejecidos para evaluar la influencia del deterioro en la identificación de los aglutinantes oleosos.

3.1 El procedimiento establecido para liberar y separar los ácidos de la matriz fue una hidrólisis ácida de los triglicéridos seguido de una extracción líquido/líquido con hexano. El empleo de este disolvente apolar mejora el procedimiento, ya que permite evitar la entrada de interferentes polares en el sistema cromatográfico y proporciona cromatogramas menos complejos.

3.2 Se llevó a cabo la optimización de los parámetros de la reacción de derivatización de los ácidos grasos con 2-nitrofenilhidrazina (uso de horno de microondas, potencia y tiempo de reacción) para la detección UV-Visible y con 4-bromometil-7-metoxicumarina para la detección por fluorescencia. En ambos casos, se obtuvieron límites de detección, sensibilidades e intervalos lineales satisfactorios para la detección de los analitos en los aceites secantes patrón y en las muestras de origen artístico. La metodología que utiliza la detección de fluorescencia proporciona una

sensibilidad superior a la metodología fundamentada en absorción UV-Visible.

3.3 Se fijaron los parámetros cromatográficos tales como: fase estacionaria, fase móvil (composición, programa de gradiente, flujo), temperatura y longitudes de onda de trabajo del detector. En ambos casos, se obtuvo una separación satisfactoria de los derivados de los ácidos grasos, sin interferir entre ellos o con otros compuestos de la matriz, en un tiempo inferior a quince minutos.

3.4 La diferenciación de los aceites de linaza, nuez y adormidera se realizó a través del cociente entre las áreas de los picos cromatográficos correspondientes del derivado de los ácidos esteárico y palmítico, el cual permanece prácticamente independiente del grado de envejecimiento del aglutinante oleoso, y varía en función de la clase de aceite secante.

3.5 Las metodologías optimizadas propuestas permitieron la caracterización de aceite de linaza y de nuez en muestras procedentes de diversas pinturas al óleo de la época renacentista.

**4.** El empleo de la espectrometría de masas directa permitió el desarrollo de metodologías analíticas sin derivatización ni separación previas para la diferenciación de aglutinantes proteicos y oleosos.

4.1 Se estableció un procedimiento para la obtención de ácidos grasos de los aceites secantes, basado en la saponificación de la muestra, seguido de acidificación y separación de los ácidos grasos de la matriz a través de una extracción líquido/líquido con hexano. Este procedimiento experimental permite obtener los ácidos grasos en un tiempo significativamente menor (5 minutos), al que se precisa en la hidrólisis ácida (un día).

4.2 Se optimizaron las siguientes condiciones instrumentales del espectrómetro de masas: potencial del capilar y de las máscaras de la trampa iónica, polaridad, masa enfocada, intervalo de barrido, presión y temperatura de nebulización y caudal de la corriente del gas secante. Las condiciones establecidas proporcionaron elevadas sensibilidad y reproducibilidad en la detección de los aminoácidos y ácidos grasos.

4.3 La caracterización de los aglutinantes proteicos y oleosos se realizó a través de un tratamiento quimiométrico mediante Análisis Discriminante Lineal efectuado sobre las cantidades de aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente, como variables estadísticas. En ambos casos, las diferentes categorías de proteínas y aceites secantes se diferencian de forma significativa, e incluso se logró discriminar entre las diferentes clases de envejecimiento experimentado por los aceites secantes patrón.

4.4 Las metodologías sugeridas se aplicaron sobre muestras procedentes de obras pictóricas decoradas en ténpera y óleos, donde se caracterizó para cada caso el correspondiente aglutinante utilizado. Estos resultados coincidieron con los encontrados en los estudios analíticos

realizados por HPLC (Conclusiones 1.4 y 3.5).

**5.** El estudio de la fracción orgánica de barnices de instrumentos musicales ha sido realizada utilizando la cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas, mediante la comparación entre los compuestos detectados en materiales patrón y las sustancias encontradas en las muestras reales.

5.1 Se seleccionaron como patrones un amplio grupo de materiales descritos como ingredientes en recetas de barnices para objetos renacentistas de madera, principalmente resinas terpénicas y aceites esenciales.

5.2 Se optimizaron las condiciones (temperatura y tiempo de reacción) de derivatización por trimetilación de los compuestos con grupos carboxílicos, para la obtención de los ésteres volátiles analizables por GC. Asimismo se estableció un procedimiento experimental de silylación de grupos hidroxilo, que mejoró la resolución de los alcoholes y su detección en el espectrómetro de masas.

5.3 Las condiciones instrumentales fijadas para el cromatógrafo de gases, como la columna capilar y el programa de temperaturas permitieron la separación de todos los compuestos de interés presentes en los patrones y las muestras reales, un total de 97 compuestos en 11 patrones y varias muestras procedentes de 3 instrumentos musicales, en un tiempo inferior a 60 minutos. La inyección sin división de flujo permitió incrementar la sensibilidad del método, parámetro crucial debido a la reducida cantidad de muestra disponible, a causa del elevado valor artístico de los instrumentos musicales de cuerda estudiados.

5.4 La metodología propuesta permitió la identificación de una gran variedad de compuestos en los materiales patrón, así como el almacenamiento de la información obtenida sobre las sustancias detectadas (espectro de masas, tiempo de retención, identificación, material del que provienen y orden decreciente de intensidad) en una base de datos con forma de biblioteca de espectros.

5.5 Las muestras procedentes del barniz de una colección de instrumentos de cuerda italianos de la época renacentista se analizaron satisfactoriamente con el procedimiento desarrollado. La identificación de los picos cromatográficos se realizó correctamente con la ayuda de la biblioteca de espectros, que resultó de especial utilidad para los picos cromatográficos con intensidades a nivel del ruido.

5.6 La información obtenida mediante la metodología analítica propuesta permitió caracterizar una resina de *Pinaceae* y aceite de linaza en los barnices de la tiorba de Venere y en el violín de Stradivarius, además de una fracción triterpénica en el barniz del laúd de Maler.

**6.** El estudio analítico de resinas sintéticas se llevó a cabo siguiendo una

metodología basada en la pirólisis-GC/MS, sin la adición de derivatizante ni tratamiento de la muestra.

6.1 Se realizó la optimización de la temperatura de pirólisis entre las temperaturas 590; 650 y 764°C. En el caso de los polímeros acrílicos, a 590°C se obtuvieron pirogramas con un mayor número de fragmentos mientras que para la resina cetónica Keton N, se detectó un mayor número de compuestos característicos a 764°C. Para las demás resinas poliméricas estudiadas (poliestireno, resina de hidrocarburos saturada, resina de indeno-benzofurano, acetato de polivinilo, butiral de polivinilo, polímero cetónico, resina de fenol-formaldehído y poliacroleína) no se encontraron diferencias significativas en función de la temperatura.

6.2 Las condiciones instrumentales establecidas para el cromatógrafo y el espectrómetro de masas resultan adecuadas para la resolución e identificación de los 278 fragmentos detectados tras la ruptura térmica de las 18 clases de polímeros sintéticos y las muestras pictóricas estudiadas, en 29 minutos. Los fragmentos característicos detectados en los pirogramas son sustancias cuya estructura es similar a la de la unidad monomérica de la resina, por lo que proporcionan mayor fiabilidad para la caracterización del polímero sintético.

6.3 La metodología analítica propuesta se aplicó al análisis de muestras procedentes de una obra pictórica moderna elaborada por el pintor alemán Baselitz (“Senta” 1992/1993). El estudio minucioso de los pirogramas obtenidos reveló la presencia de fragmentos característicos de las resinas cetónica, así como de parafina, aceite secante y plastificante.

***PART B***  
***FOR DOCTOR EUROPEUS MENTION***  
***ANALYTICAL STUDY OF MATERIALS USED IN***  
***VARNISHES, BINDING MEDIA AND***  
***CONSOLIDANTS IN ARTWORKS BY***  
***CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROMETRIC***  
***METHODS***

## ***VII. SUMMARY***

## 1. Introduction

Artworks are made of a wide variety of materials. They must be carefully chosen, handled and applied by the artist in order to establish the aesthetical properties. Later, they can provide useful information to art researchers about the artistic technique and period of the artist [7]. However, these materials are degraded through the time by complex processes, due to external conditions as moisture, temperature, environmental chemicals and incorrect preservation conditions, as well as to interactions between the own compounds of the pictorial artwork [8,37]. An adequate restoration and preservation treatment must be applied to avoid the deterioration processes and allow the conservation of the artwork. For these reason, a complet analytical study of the artistic object in order to obtain a maximum of knowledge about the materials originally used by the artist is strongly useful [165]. However, this study is difficult because of the effect of the deterioration, the small quantity of sample available, their complexity and their low purity [32,162].

The organic materials traditionally used in the field of art are proteins, waxes, drying oils and terpenic resins, obtained from natural species, due to their acccebility and plenty. However, during the XIX Century synthetic materials as polymeric resins were also incorporated to the field of art [7].

Proteins are biopolymers made of aminoacids linked by peptide bonds [14]. They are among the first natural materials employed for ornamental purposes and they can be found in a wide variety of historical and artistic objects. They were employed as binding media, consolidants and covering materials in pictorial artworks since the antiquity, in the specific pictorial techniques *tempera* (with egg protein) and *temple* (gelatin) [1].

Waxes are organic materials made of a mixture of hydrocarbons, esters (mono-, di- and tri-), alcohols, free fatty acids, aldehydes, ketones and triterpenoids, all of them with high molecular mass [7]. They have been widely used since the antiquity as binding media, consolidant and covering material for pigment, in *encaustic*-make pictorial artworks. Likewise, due to their high hydrophobicity, they have been employed as sealing and waterproof materials, therefore they can be found in several archaeological objects, as pottery, graves and building materials [23,26].

Drying oils are complex mixtures of triglycerides, which are triesters of glycerine with medium sized fatty acids, mainly unsaturated acids, which are for the most part lost during ageing (linolenic, linoleic and oleic) and saturated acids (palmitic, stearic and myristic) [7,14]. They are widely used in oil painting technique as binding media, consolidant and covering, because of their drying properties: the fresh drying oil is a liquid where the

pigment can be solved, and after applying over the surface of the artwork, it polymerizes and becomes a rigid net where the pigments are agglutinated and protected [4].

Terpenic resins are made of mixtures of natural substances formed by hydrocarbons formed by polymerization of isoprene, as well as their partial oxidized derivatives, which shows alcohol, carbonyl or carboxylic groups (terpenoids) [7]. These materials have been widely used as varnishes applied as film coat over paintings or wood objects, as string musical instruments. Its main function lies in to isolate the object from the environment and to avoid the degradation of the internal layers. They can also be used to modify the aesthetical properties by means of the addition of pigments. In the case of string instruments, the varnish also provides mechanical protection, and can also influence their sonority. Moreover, on the contrary that in paintings, the varnish in string instruments is considered as a part of the artwork and can not be removed [5].

Synthetic resins are materials obtained by industrial polymerization of low-molecular weight molecules, mainly by radical or chemical condensation pathway reactions, and were firstly synthesized during the Industrial Revolution [6,7]. The most usual synthetic resins are polyolefines, acetate polyvinyls, polyacrylics, alkyd, ketonic, phenol-formaldehyde, polyacroleins, cellulose nitrate and polysiloxanes. Many of these polymeric resins are widely used in artworks as binders, agglutinants, adhesives, consolidants, covering material, varnishes and filler for missing parts in restoration works. However, they can only be found in artworks elaborated or restored after the 19<sup>th</sup> Century [6].

The analytical methodologies used in these studies are based on techniques with high sensitivity, selectivity, versatility which allow to work with small samples [7]. Then an extense variety of analytical techniques have been used in order to characterize the organic materials in artworks.

The vibrational spectroscopic techniques, such as FTIR [138] and Raman [149], allows the analysis of a small quantity of sample without previous treatment and the possibility to simultaneously identify a wide assortment of materials. On the other hand, separation techniques, coupled with some sort of detection system, are used to obtain information of the material in the sample by means of the compounds, due to its selectivity, low sensitivity and reproducibility. Their identification provides the kind of material, and the characterization is usually made by the relative amount of the compounds [165] or the presence of several marker-molecules [162]. The methodology of analysis usually includes a derivatization step treatment to improve the sensibility of the analysis [165,212]. The most used resolute techniques are electrophoresis [197], size exclusion chromatography [209], gas

chromatography (GC) coupled with flame injector detector [163] or mass spectrometry [96], pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry [22,187] and liquid chromatography (HPLC) with UV-Visible [138], fluorescence [212] and mass spectrometry [53] detection. However, mass spectrometry is also able to provide by itself qualitative and quantitative information about the compounds in the sample. For these reason, it can also be used as analytical technique [275,290].

## **2. Aims**

The general aim of this Doctoral Thesis was to develop methodologies to characterize several organic materials used in the manufacturing, restoration and/or preservation of artworks, as proteins, waxes, drying oils, synthetic polymers and terpenic resins in historical varnishes of string musical instruments. The selected analytical techniques were liquid chromatography, gas chromatography and mass spectrometry. The specific purposes for each study are detailed as follows:

- 1. Proposal of a methodology to analyze proteins by HPLC-Fluorescence.**
  - Optimization of the derivatization reaction to improve the fluorescent properties of the aminoacids.
  - To establish the adequate instrumental conditions for the chromatographic separation of the analytes.
  - Identification of each standard aminoacid and determination of the analytical parameters of the method.
  - Characterization of the proteins by means of the relative proportion of aminoacids.
  - Chemometric treatment of the obtained data by Principal Component Analysis (PCA), in order to improve the reliability of the discrimination between the proteins.
  - Application of the suggested methodology to pictorial artworks.
  
- 2. Analytical study of natural waxes in artistic and archaeological objects by gas chromatography (GC).**
  - Study of the derivatization reaction to increase the volatility of the fatty acids.
  - Identification of the fatty acids and hydrocarbons in the natural waxes by GC/FID.
  - Characterization of the waxes by means of the relative amount of fatty acids and alkanes.

- Selection of the reference compounds for the fatty acids and hydrocarbons, in order to obtain their relative amount.
- Chemometric study of the information obtained by PCA, in order to improve the reliability in the differentiation of the natural waxes.
- To verify the analytical procedure, the suggested methodology was applied to artistic samples.

**3.** Proposal of methodologies using HPLC-UV-Visible and HPLC-Fluorescence as analytical techniques to characterize drying oils employed as binding media in pictorial artworks.

- Optimization of the experimental procedure to release and extract the fatty acids
- Choice of the adequate derivatization reagents to improve the absorptivity or fluorescence of the fatty acids and optimization of the reaction conditions.
- Establish the parameters of the chromatographic resolution and detection of the fatty acids derivatives.
- Identification of the carboxylic acids and comparison of the analytical parameters of both methods.
- Characterization of the drying oils by means of the relative amount of fatty acids.
- Application of the suggested method to oil painting samples.

**4.** Optimization of analytical methods to identify protein and oil binding media without derivatization or separation step by direct mass spectrometry.

- To propose a treatment of hydrolysis of the samples and extraction of aminoacids and fatty acids.
- Optimization of the instrumental conditions of the mass spectrometer to identify the aminoacids and fatty acids.
- Differentiation of protein and oil binding media from the relative amount of aminoacids and fatty acids, respectively, by means of a chemometric treatment of the obtained data by Linear Discriminant Analysis.
- Application of the methodology of samples from artworks.

**5.** Analytical study of the organic fraction of varnishes of string instruments by GC/MS.

- Choosing of reference materials included in recipe to elaborate varnishes during the Renacentist period.
- Optimization of derivatization method and instrumental conditions of the GC/MS.
- Identification of the substances present in the standard materials.
- Construction of a mass spectra database for this kind of compounds.
- Characterization of the molecules included in the real samples.

- Application of the proposed method to samples from varnishes of historical string instruments, including a unit of Stradivarius.

**6.** Analytical study of polymeric resins present in pictorial artworks by pyrolysis-GC-MS.

- Study of the instrumental conditions of the thermic breakage of the analytes.

- Identification of the fragments obtained by means of the analysis of the standards of the synthetic polymers.

- Identification of the compounds detected in samples from samples from a modern painting.

- Characterization of synthetic resins and organic additives in the samples from pictorial artworks.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1 Characterization of proteins in pictorial artworks through their aminoacids relative amount by liquid chromatography with fluorescence detection**

The developed analytical procedure proposes an identification of the proteins based on the relative amount of aminoacids, which were analyzed by liquid chromatography with a fluorescence detector.

The first step in the decomposition of the protein biopolymer by hydrolysis with concentrated hydrochloric acid at 110°C for 16 h, followed by the extraction of the obtained aminoacids with a polar acidic solvent, as 0.1 mol.L<sup>-1</sup> aqueous HCl. The hydrolysis step produced an alteration of the aminoacids content, so that asparagine and glutamine were turned to their corresponding acids, aspartic and glutamic, respectively. This last can also undergo a cyclation, turning into pyroglutamic acid. Moreover, the tryptophan decomposes in an extreme acidic medium. Then these aminoacids would not appear in the results [162].

Obtained aminoacids were derivatized at room temperature with o-phthalaldehyde (OPA) as fluorescent reagent in basic borate buffer, using 2-mercaptoethanol as catalyst. This reagent reacts with primary amines to provide high sensitive fluorescent adduct, with short time derivatization times and no needing of heating. However, cysteine and secondary aminoacids proline and 4-hydroxyproline can not be analyzed, be to the poor stability of their OPA-derivative [271].

The resolution of the OPA-aminoacids derivatives was performed by reverse phase liquid chromatography, using an injection loop of 20  $\mu$ L. The

stationary phase was a Zorbax XBD-C18 column, and mobile phase was a gradient programmed between these two eluents: 5% of tetrahydrofurane in water buffered at pH 5.8 with acetic acid/sodium acetate and methanol, running at 1 mL.min<sup>-1</sup> at 30°C. Under these conditions, an adequate resolution, without interfering substances, was obtained in 45 minutes. The the detection was performed at 340 and 450 nm as excitation and emission wavelengths, respectively [271].

The optimization of the derivatization parameters (reaction time, reagent concentration) and the chromatographic conditions (solvents, flow, gradient program, temperature) were optimized using a mixture 0.8 mmol.L<sup>-1</sup> of the following standard aminoacids (elution order): aspartic acid, histidine, glutamic acid, serine, lysine, arginine, glycine, threonine, alanine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine and leucine. Afterwards, the analytical parameters of the methodology were determined for all the aminoacids, using 0.1 μmol tryptophan as internal standard. A satisfactory sensitivity with a limit of detection of 0.08 nmol and an adequate linearity between 4-330 nmol was obtained for almost the analytes. The analytical parameters were found similar for all the studied aminoacids, however, 3-times-higher sensitivity was found for glycine and lysine.

The proteins selected for the study were those most used in tempera or temple pictorial artworks: albumin, casein, egg, beef gelatin and porcine gelatin [162]. The characterization was carried out by means of the relative amount of aminoacids, calculated as the quotient between the chromatographic peak area corresponding to each aminoacid and leucine (A(AA)/A(leu)). This last analyte was chosen as reference, due to the stability of its derivative. In order to improve the reliability of the differentiation, the obtained data were statistically treated with Principal Component Analysis. The score plot of the two first principal components shows the statistic objects grouped by their protein origin with high resolution. Finally, in order to evaluate the capability of prediction of the proposed methodology, it was applied to the characterization of samples from artworks belonging to the Valencian Cultural Heritage. Samples from four artistic paintings were analyzed and in all of them egg protein was clearly identified.

Otherwise, it is quite known that the metallic cations, usually coming from pigments, can complex aminoacids, preventing the derivatization [160]. This effect results in a variation of the relative amount of aminoacid determined by HPLC-fluorescence, and may be a serious trouble for the characterization. To avoid it, the analysis of the samples from artistic artworks was repeated adding a solution of ethylenediamino tetraacetic acid disodium at pH 9 in ammonia/ammonium chloride, in order to complex the

metallic cations. In this case, egg protein was also identified in the four studied artworks, and better resolution was found.

The developed analytical procedure shows the advantage of the detection of the arginine, which is not possible in gas chromatography with silica capillary column. Otherwise the main disadvantage is the no quantification of the secondary aminoacids and cystein. However, the characterization of the protein can be quite reliably performed with the 15 studied aminoacids by means of the chemometric treatment by Principal Components Analysis.

### **3.2 Characterization of waxes by means of their relative amount of linear alkanes and fatty acids in artworks by gas chromatography**

The developed analytical method proposes the characterization of natural waxes by analysis of their main constituents, linear alkanes (from 20 to 35 carbon atoms) and fatty acids (from 14 to 26 carbon atoms) using gas chromatography with flame ionization detector.

The first step includes a treatment of the solid sample with concentrated hydrochloric acid, at 110°C for 16h, in order to break the ester bond and release the fatty acids. Then these last compounds and the alkanes were separated from the matrix by a liquid/liquid extraction with chloroform/water, remaining in the organic phase. Furthermore, fatty acids were turned in to their ethyl derivatives in order to improve their volatility [163]. Alkanes are directly analyzable by gas chromatography and they do no need any modification. Furthermore the solvent was evaporated and the remaining solid was treated with ethyl chloroformate in ethanol/pyridine 4:1 v/v, a reagent widely employed to the ethylation of carboxylic and amine groups, because of the reaction runs at room temperature with adequate quantitivity and rapidity. Finally, the obtained mixture was extracted with chloroform, and an aliquot of 1.5  $\mu$ L was injected into the chromatographic system.

The separation by gas chromatography was performed in a capillary column (14% cyano-propyl-phenyl-siloxane) as stationary phase, and the carrier gas was helium running at 1.5 mL.min<sup>-1</sup> (constant flow). The injector was made with a split ratio of 1:20. The initial temperature of the oven was 100°C, and a gradient of 40°C.min<sup>-1</sup> was applied until 275°C (nearly 4.4 min) and this last temperature was maintained for 25 minutes. Under these conditions, the analytes were satisfactorily separated in 30 minutes without interferences between them and other compounds. The quantification was carried out by flame injection with hydrogen and synthetic atmosphere, at 300°C with adequate sensitivity [165].

Mixtures of standard hydrocarbons and fatty acids  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  were studied in order to obtain the retention time of each analyte. The following hydrocarbons were directly analyzed by gas chromatography: n-eicosane, n-heneicosane, n-docosane, n-tricosane, n-tetracosane, n-pentacosane, n-hexacosane, n-heptacosane, n-octacosane, n-nonacosane, n-triacontane, n-dotriacontane, n-hentriacontane, n-tritriacontane, n-tettratriacontane and n-pentatriacontane. On the other hand the considered fatty acids (myristic, palmitic, oleic, stearic, arachidic, behenic, lignoceric and cerotic) were derivatized with ethyl chloroformate prior to the analysis. In both cases, the analytes were detected without interferences in 30 minutes, with adequate sensitivity and resolution. Moreover, no interference was found between carboxylic acids and linear alkanes.

Studied natural waxes chosen were those most employed in encaustic pictorial technique, and from different origin, as beeswax (animal), carnauba (vegetal) and ceresin (mineral) [7]. A small sample of each one was analyzed, obtaining adequate sensitivity without interferences with other compounds in the matrix.

For the three standard waxes, the quotient between the chromatographic peak area of each linear alkane and n-heptacosane ( $A(H)/A(C27H)$ ), as well as the ratio between the chromatographic peak area of each ethyl carboxylate and ethyl palmitate ( $(FA)/A(C16)$ ). These compounds were chosen as reference because of their high amount in the three considered standard waxes. In order to enhance the reliability of the characterization, the obtained values were statistically treated with Principal Component Analysis. The score plot of the two first principal components shows the statistic objects clearly grouped by wax origin with high resolution. Finally, in order to evaluate the capability of prediction of the suggested analytical method, it was applied to the characterization of a sample from an oleoresin belonging to the Mexican Cultural Heritage, where beeswax was identified.

Waxes in pictorial artworks are often found mixed with other materials as oils, proteins, resins, polymers, pigments, etc. Especially, oils contain high amount of fatty acids, which are released during the acid hydrolysis and are analyzed together with those from the wax, changing the relative amount of carboxylic acids. In order to characterize the waxes in presence of oils, a new PCA model was made, taking only the  $A(H)/A(C27H)$ . The different waxes appear even now separated. In this case, beeswax was also characterized in the sample from the analyzed artistic sample.

This work introduces the use of ethyl chloroformate, which has not previously used in wax analysis. However, its main disadvantage is the lacking of information obtained about the structure of the triglycerides, which decompose during hydrolysis.

### 3.3 Characterization of drying oils by liquid chromatography coupled to UV-Visible and fluorescence detector

The developed methodologies propose the characterization of drying oils used in pictorial artworks by means of the relative amount of fatty acids determined by liquid chromatography with UV-Visible and fluorescence detector.

The first step lies in the breakage of the ester bond by hydrolysis with concentrated hydrochloric acid, heating at 110°C for 16 h [165]. The fatty acids were extracted via a three times liquid/liquid extraction with water and hexane (optimized parameters), remaining in the hydrophobic phase. Then the analytes were derivatized with a chromogen (2-nitrophenylhydrazine) [220] or a fluorescent reagent (4-bromomethyl-7-methoxycoumarine) [240]. The resolution of the fatty acids mixture was also performed with different condition, depending on the detector.

a) UV-Visible. The fatty acid mixture was derivatized with 2-nitrophenylhydrazine (2-NPH), using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide) hydrochloride as catalyst in acidic medium. The reaction was carried out by heating with microwave oven at 260 W for 6 min, then a KOH solution was added to stop the reaction, and the mixture was heated under the same conditions for 3 minutes to decompose the by-products. Furthermore, an aqueous solution of hydrochloride acid was added to acidify the sample and to avoid the introduction of a basic solution into the injector. Finally, the sample was filtered and was ready to the injection.

The chromatographic separation was performed using a hydrophobic column Zorbax XDB-C8 as stationary phase, and the mobile phase was a methanol/water/n-propanol/acetic acid 80/14/5/1 running under isocratic mode at 1.2 mL.min<sup>-1</sup>. Injection loop volume was 20  $\mu$ L and the wavelength detection was fixed at 400 nm.

The work was focused in the optimization of the reaction parameters (solvent, pH, concentration of reagent, use of microwave oven, time, power and post-derivatization treatment) and the chromatographic conditions (adequate solvent for elution, detection wavelength). The study was carried out using a 0.25 mmol.L<sup>-1</sup> solution of the more important fatty acids in aged oil samples, myristic, palmitic, oleic and stearic. Under the proposed conditions, the analytes provided gaussian shape chromatographic peaks, and they were adequately resolved with enough sensitivity in 14 minutes.

b) Fluorescence. The fatty acid solution was derivatized by reaction with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarine (Br-Mmc), using 18-crown-6 ether and KHCO<sub>3</sub> as catalyst in acetone/acetonitrile 25/10 v/v medium. The reaction was carried out by heating in a water bath at 55°C for 25 minutes

protected from light [240]. The mixture was then filtered and ready for injection.

The chromatographic resolution of the fatty acids-derivatives was performed using as stationary phase an apolar column Zorbax XDB-C8. The composition of the mobile phase changed following a gradient programmed from methanol/water 90/10 to 100/0 in 25 minutes, and run at  $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  at  $30^\circ\text{C}$ . Injection loop volume was 20  $\mu\text{L}$  and the excitation and emission wavelength were adjusted to 325 nm and 295 nm, respectively.

The parameters optimized were the concentration and volume of reagents, as well as the parameters of the mobile phase (gradient program, solvent, flow, temperature) and the emission wavelength. The optimization was performed using the same solution and analytes as for UV-Visible studies ( $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  of myristic, palmitic, oleic and stearic acids). In this case, gaussian shape chromatographic peaks were also obtained, with satisfactory sensitivity and without interferences.

For both methodologies, the analytical parameters were determined for each studied fatty acid, using arachidic acid as internal standard. Under UV-Visible detection, an ample linearity was found between 3 and 300 nmol, with a limit of detection of 1.5 nmol. Under fluorescence detection, the linearity interval was 0.1-180 nmol, and the detection limit was 0.06 nmol. As seen, the HPLC-fluorescence methodology provides 25-times sensitivity than with UV-visible detection. However, the analytes were better resolved under HPLC-UV-Visible conditions, especially palmitic and oleic, which appears close in HPLC-Fluorescence. Otherwise, the analytical parameters were found quite similar for the considered fatty acids.

The studied drying oils were those most usually used in oil paintings as binding media: linseed, walnut and poppy seed [165]. In order to evaluate the effect of the ageing in the chemical composition of the drying oils, the study was focused on the analysis of fresh liquid oils, as well as naturally aged for 5 years [289] and by two artificial accelerated ageing treatment (thermic [18] and UV irradiation [163]). The characterization of the drying oils was based on the relative amount of fatty acids, which were calculated as the quotient of the chromatographic peak area for each fatty acid and the palmitic acid. The fresh drying oils samples contain high amounts of unsaturated fatty acids, especially linolenic, linoleic and oleic acid, which are lost during the ageing. Only oleic acid was found in the aged samples, depending on the ageing treatment. Otherwise, myristic acid was found in all the studied samples in too low amount to be used as an identification parameter. On the other hand, the ratio stearic/palmitic remains roughly constant for each kind of drying oil, despite the ageing treatment, so this quotient was considered as characterizing parameter. Using both suggested

methodologies, the ratio (C18)/(C16) calculated for each standard was: linseed oil 0.6; walnut oil 0.3 and poppy seed oil 0.2.

The capability of prediction of both methodologies was established by applying them to the identification of the drying oil in samples from nine samples from oil paintings from the Valencian Cultural Heritage. In eight samples, linseed oil was characterized, whereas walnut oil was identified in one artwork.

### **3.4 Characterization of protein and oil binding media by direct infusion mass spectrometry**

The purpose of the work detailed below was to propose a methodology to characterize proteins and drying oils present in artworks as binding media by means of the content in amino acids and fatty acids, respectively. The detection was made through direct infusion mass spectrometry with electrospray ionization (ESI), avoiding the fragmentation of the analytes. The chosen standard agglutinants were the same as studied in section 1 (albumin, casein, egg, beef gelatin and porcine gelatin) and in section 3 (linseed, walnut, poppy seed, each one naturally and artificially aged via thermic and UV-irradiation treatment). Analytical procedure was depending on the kind of binding media:

a) Proteins. Samples were hydrolyzed with the procedure explained in section 1. The extracted aminoacids were solved in ethanol/aqueous HCl 0.1 mol.L<sup>-1</sup>, and then infused into the mass spectrometer at 0.3 mL.h<sup>-1</sup>.

The parameters of the mass spectrometer were adjusted by optimization with the following aminoacids, obtained after the hydrolysis of a sample from beef gelatin (ordered by molecular mass): glycine, alanine, serine, proline, valine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, lysine, glutamic acid, methionine, histidine, phenylalanine, arginine and tyrosine. The sensitivity was found higher under positive polarity, a target mass of 90 *m/z*, with a scan range of 50-300 *m/z*. The parameters of the nebulizer were optimized, by studying their influence over the sensitivity and reproducibility, to: temperature 250°C, gas pressure 25 psi and drying gas flow rate 8 mL.min<sup>-1</sup>. Under these conditions each aminoacid appeared as their [M+H<sup>+</sup>] ion without interferences, and the quantitative data was the abundance ion. Only leucine, isoleucine and 4-hydroxyproline appear at the same molecular mass (132 *m/z*). Then mass spectrometry-mass spectrometry (MS<sup>2</sup>) was applied to differentiate these three aminoacids. Leucine and isoleucine were not distinguished even by MS<sup>2</sup>, and 4-hydroxyproline was not found in protein standard, this 132 *m/z* ion was assigned to isoleucine and leucine mixture.

b) Drying oils. A saponification was proposed to release fatty acids from the triglycerides. Samples were hydrolyzed with potassium hydroxide  $240 \text{ mmol.L}^{-1}$  in n-propanol/methanol 85:15 v/v by heating with heating plate until solvent evaporation. Afterwards, the remaining solid was acidified with concentrated hydrochloric acid in order to obtain the carboxylic acids. Then they were extracted as described in section 3. Furthermore fatty acids mixture is solved in potassium hydroxide  $40 \text{ mmol.L}^{-1}$  in n-propanol/methanol 85:15 v/v, and then the mixture was infused into the mass spectrometer through a fused silica capillary by external pressure at 2 bars [290]. The solvent was less concentrated in order to avoid the introduction of salts in the mass spectrometer.

The instrumental parameters of the mass spectrometer were adjusted by optimization considering the following fatty acids, obtained after the hydrolysis of a sample from poppy seed oil aged by thermic treatment (ordered by molecular mass): caprylic, pelargonic, capric, suberic, undecanoic, azelaic, lauric, sebacic, myristic, palmitoleic, palmitic, linolenic, linoleic, oleic and stearic. As the analytes were deprotonable, they were introduced in a basic medium into the mass spectrometer and detected under negative polarity. Then fatty acids were identified as their  $[M-H]^{-}$  ion, with adequate resolution, as each fatty acid has a different molecular mass, and without interferences from other compounds in the matrix. The quantitative information was provided by the abundance ion. Target mass was  $255 \text{ m/z}$  corresponding to the ion of palmitate, and the scan range was  $100\text{-}400 \text{ m/z}$ . The parameters of the nebulizer were adjusted to: temperature  $200^{\circ}\text{C}$ , gas pressure 25 psi and drying gas flow  $5 \text{ mL.min}^{-1}$ .

The characterization of protein and oil binding media was made from the relative amount of aminoacids and fatty acids, respectively. After applying a normalization procedure, the obtained data were statistically treatment with a supervised classificatory chemometric tool, Linear Discriminant Analysis (LDA). Obtained results were:

a) Protein. The score plot of the two first discriminant functions shows adequate separation between albumin, casein, egg protein and animal gelatin. Therefore, another Principal Component Analysis was made considering only beef and porcine gelatin, which were then satisfactorily resolved.

b) Drying oils. The constructed model by LDA provided an adequate resolution between linseed, walnut and poppy seed oil, despite their different ageing.

The capability of the suggested methodologies to identify the agglutinant in complexes matrix was established by applying them to samples from pictorial artworks belonging to the Spanish Cultural Heritage.

The same four samples as in section 1 containing protein binding media were studied, where egg protein was also found in all of them. On the other hand, nine samples from oil paintings were studied, in one of them walnut oil was identified whereas linseed oil was characterized in the other eight artworks.

The main advantage of the developed methodologies was the suppression of the derivatization and the separation step. This simplification of the experimental procedure results in an improvement of the straightforwardness, reproducibility, speed and robustness. Moreover, as the analytes were separated by their molecular mass, a high resolution found.

### **3.5 Characterization of the compounds in varnishes of Italian string instruments by gas chromatography coupled to mass spectrometry**

The aim of the work was the characterization of the organic constituents of historical varnishes from ancient Italian string instruments, a Maler lute (1529/1552), Venere theorbo (1606) and Stradivari violin (1724), kept in the Musée de Musique in Paris, by gas chromatography-mass spectrometry. The work was performed in the laboratories of the Centre of Research and Restoration of the French Museums, Musée du Louvre, Paris, France.

The standards chosen for the analytical study were several materials traditionally used in the elaboration of wood-object varnishes: essential (turpentine and spike oil) and drying oils, additives (camphor and benzoin) diterpenic resins (colophony, Venice turpentine, sandarac and Manila copal), triterpenic resins (dammar and mastic) and animal resin (shellac). These materials are mainly made of fatty and polyhydroxycarboxylic, terpenic and aromatic acids, as well as alcohols, ketones and aldehydes [5,7].

The analytical procedure included a first step of methylation by transesterification in order to break down the intermolecular bond and improve the volatility of the analytes. The derivatization was carried out by reaction with a quaternary ammonium ((*m*-trifluoromethylphenyl) trimethylammonium) solved in methanol, at 80°C for 16 h. Then a second reaction was performed to block the alcohol groups by silylation. The methylated sample was treated with *N*-O-bis[trimethylsilyl] trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane, as catalyst, (99/1 v/v) by heating at 70°C for 15 minutes. After each derivatization, an aliquot of 1  $\mu$ L was injected into the gas chromatograph.

The chromatographic resolution was carried out in an apolar capillary column Varian CP-Sil 5 CB Low Bleed/MS. Carrier gas was helium running at a constant flow of 1.3 mL.min<sup>-1</sup>. Injector temperature was 300°C. Oven initial temperature was 40°C, maintained for 1.5 min during splitless

injection. Then a  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  gradient was applied until  $180^{\circ}\text{C}$ , and another gradient of  $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  was applied until  $325^{\circ}\text{C}$ , temperature that was maintained for 8 min. The mass spectrometry ionization was made under standard conditions at 70 eV, and the detector scanned from 50 to 850  $m/z$ .

Each standard and samples from string instrument varnishes were analyzed following the detailed procedure, and their corresponding compounds were identified by means of the retention time and the mass spectrum. Then, for each standard, the mass spectrum of the highest chromatographic peak was introduced in a database, together to other useful information as the retention time, the name, reference material and the relative intensity in decreasing order. Furthermore, the chromatographic peaks found in the samples from historical violins were compared with those stocked in the database, in order to identify them and propose hypothesis about the reference materials in the varnishes.

The obtained results points to the use of linseed oil as solvent for the varnishes. The hypothesis about the characterization of the resinic material can be summarized as follows:

a) Maler Lute. Traces of highly oxidized *Pinaceae* resin, probably Venice turpentine or colophony were found, as well as triterpenic compound, perhaps coming from elemi.

b) Venere theorbo. Venice turpentine was a constituent of the varnish, together or not with another *Pinaceae* resin. On the other hand, the sample showed a highly oxidized state.

c) Stradivari violin. A *Pinaceae* resin, probably Venice turpentine was characterized; however, the use of colophony can not be excluded.

### **3.6 Characterization of synthetic resins in modern artworks by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry**

The purpose of work was the characterization of a wide range of polymeric resins used in the elaboration of artworks from the 19<sup>th</sup> Century, or in conservation or/and restoration treatment of ancient artistic or archaeological objects. These materials were studied by an analytical procedure based on pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. Then the procedure was applied to samples from a modern pictorial artwork from the German artist Georg Baselitz (“Senta 1992/93”), from the Munich collection. The analytical study was carried out in the laboratories of the Doerner Institut, Bayerische Staatsgemäldesammlungen, Munich, Germany.

The selected synthetic materials were resins build by carbon-double radical polymerization (polystyrene, saturated hydrocarbon resin, indenbenzofuran polymer, polyvinyl acetate, butanal polyvinyl, and polyacrylate) and condensation polymers (ketonic resins, phenol-formaldehyde, alkyd and

polyacrolein) [6,7].

The solid sample from standard or pictorial artwork was introduced in a crucible and pyrolyzed by the Curie-point method at 590; 650 or 764°C, without previous treatment or derivatization. The fragments were then introduced in splitless mode in the chromatographic system. The injector temperature was 250°C. The separation was performed in a (5%-phenyl-methyl-polysiloxane) Low Bleed capillary column HP 5MS, and the gas carrier was helium running at a constant flow of 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. The initial oven temperature was 50°C, maintained for 2 min, and then a 10°C.min<sup>-1</sup> gradient was applied until 320°C (nearly 29 min). The mass spectrometry ionization was made under standard conditions at 70 eV, and the detector scanned from 42 to 550 *m/z*.

For each standard material, the compounds obtained by thermic breakage were identified by means of their corresponding mass spectrum. Furthermore, for each detected fragment, the information regarding on the retention time, mass spectrum, name and standard material was stocked. Special attention was paid over the fragments which structure is close to the monomer of the synthetic resin, and which would be more useful to its characterization in unknown samples. Furthermore, the chromatographic peaks found in samples from modern artworks were compared with those obtained by analysis of the standards, in order to propose hypothesis about the materials in its composition.

The results obtained in the analysis from Baselitz artwork points to the presence of ketonic resin. Some additives as drying oils, paraffin wax, an antioxidant and a plastifiant were also identified.

***VIII. ANALYTICAL STUDY OF  
SYNTHETIC POLYMERS IN  
ARTWORKS***

## **CHARACTERIZATION OF SYNTHETIC RESINS USED IN MODERN ARTWORKS BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY BY PREVIOUS PYROLYSIS**

### **1. Experimental**

The analytical methodology explained as follows was proposed to characterize synthetic resins by pyrolysis-GC-MS. The solid sample was directly introduced into the pyrolyzer without previous treatment or derivatization. Then the study of the pyrograms obtained by means of the analysis of the standards allows to determine the fragments, which characterize each synthetic polymer. Finally, the proposed method was applied to samples from a modern pictorial artwork. The corresponding pyrogram provided adequate information to characterize a polymeric resin and several additives.

#### **1.1 Standards**

Synthetic resins selected for the analytic study, together to their physical characteristics, supplier and inventory number, are exposed in the Table 38. These polymers belong to the collection of standard reference materials, stored in the Doerner Institut, Munich Paintings Collection (Bayerische Staatsgemäldesammlungen), the institution in charge of the restoration, conservation, care and maintenance of the artistic paintings deposited in the Art Galleries and Museums of the State of Bavaria.

#### **1.2 Description of the samples from artworks**

Samples from artworks were taken by scalpering from a painting by the German painter Georg Baselitz ("Senta", 1992/1993), stored in the restauratuion workshops of the Munich Paintings Collection (Bayerische Staatsgemäldesammlungen), and supposed to be carried out in acrylic resin. The two samples were taken from two zones on the surface, painted with blue and black pigment, respectively, near the frame.

**Table 38.** Origin and characteristics of the studied polymeric resins.

resin	shape	color	supplier (year)	inventory number
<b>polyvinyl</b>				
<b>polystyrene</b>				
Kraton G 1950	small pieces (gummy)	white	unknown (1996)	90.39.09
Kraton G 1957	small spheres (hard)	white	unknown (1998)	90.39.10
<b>saturated hydrocarbon resin</b>				
Arkon P90	small pieces	white	unknown (1998)	90.39.12
<b>indene-benzofurane resin</b>				
cumarone	pieces and powder (homogenous)	brown	unknown	90.39.3
<b>polyvinyl acetate</b>				
Mowilith 20	small pieces and powder	white	Fa (Hoest)	90.39.17.1
Mowilith 30	small pieces	white	unknown ( 1984)	90.39.17.2
Mowilith 40	small spheres (hard)	white	unknown ( 1984)	90.39.17.3
Mowilith 50	small spheres (hard)	white	Kremer Pigmente	90.39.17.4
PVAc AYAA	pieces	white	Constr. Mat. Ltd. (Brooklyn) (1988)	90.39.8.1
PVAc AYAF	small spheres	white	Constr. Mat. Ltd.	90.39.8.3
PVAc AYAT	small spheres	white	(1987)	90.39.8.4
PVAc AYA	pieces	white		90.39.8.2
Palmer Cement	compact	transparent colorless	unknown	90.39.19.1
<b>Polyvinyl butyral</b>				
Mowital B20H	powder	white	unknown ( 1980)	90.39.18.1
<b>Polyacrylic</b>				
Paraloid*	very viscous	red	Berkes	---
Acrylic-based Titanium pigment	in tube (doughy)	white	Golden Acrylics	18.11.1
<b>Condensation polymers</b>				
<b>Alkyd</b>				
Alkyd	solidified liquid	yellow	Kremer Pigmente	90.39.15
<b>Ketonic resin</b>				
AW2	powder	white	unknown	90.39.13
AW2	compact	red	unknown	90.39.14
Keton N	pastilles	light yellow	State Museum of Lower Saxony (Hannover)	90.39.16
Laropal A81	small spheres (hard)	white	unknown	90.39.11
<b>Phenol-formaldehyde</b>				
Phenol Resin	big pieces	black	unknown	90.39.6
Phenol Resin	crystals and powder	red-brown	unknown	90.39.4
<b>Polyacroleine</b>				
Akroid	pieces and powder (homogenous)	red	Bender and Hobein (München)	90.39.1

\*liquid resin, the other described standards are solid materials

### 1.3 Instrumentation

Analyses were performed using the following instrumentation: a Curie-point pyrolyzer Pyromat V.108 (GSG Meß- und Analysengeräte, Bruchsal, Germany), connected to a gas chromatograph 6890N (Agilent), coupled to a mass spectrometer MSD, 5975C Inert mass (Agilent). The chromatographic resolution was achieved through a capillary column HPM 5MS/Low Bleed (5%-phenyl)methylpolysiloxane, (length: 30 m, internal diameter: 250  $\mu\text{m}$ , film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ), and maximal temperature 325°C. Carrier gas was helium running at a constant flow of 0.5 mL.min<sup>-1</sup> (15 cm.s<sup>-1</sup>). Injector was under splitless conditions.

The chamber of the pyrolyzer was firstly at 200°C, and the pyrolysis was achieved at the selected temperature for 10 s. Injection temperature was adjusted to 250°C, producing an initial pressure over the column cap of 89 kPa. The initial temperature of the oven was 50°C, maintained for 2 min, then a 10°C.min<sup>-1</sup> gradient was applied to 320°C (29 min). Ionization was performed under standard conditions at 70 eV, with a voltage of 200 V. The temperature of the source was adjusted at 250°C, whereas the temperature of the quadrupole was 100°C. The mass spectrometer was scanned in the 42-550  $m/z$  range, with 2.87 cycle.s<sup>-1</sup>.

### 1.4 Experimental procedure

The sample was introduced in the crucible with a scalpel, adding as less amount as possible. Then the crucible was fitted into a hollow glass cylinder, which was set up in the pyrolyzer syringue.

Pyrolysis was achieved by Curie-point method. Crucibles for 590; 650 and 764°C were available to perform the analytical study.

After each pyrolysis, crucibles were treated with the following clean-up protocol: used crucibles were ultrasonicated in methanol (HPLC grade, Fischer) and then other time with tetrahydrofurane (HPLC grade, Fischer). Pyrolyzer syringue was cleaned following the same procedure.

Sampling was performed depending on the characteristics of the standard polymeric resin:

- Kraton G1650, Kraton G1657, Arkon P90, Mowilith 20, Mowilith 30, PVAc-AYAA, Palmer Cement, Acrylic Pigment, Alkyd, AW2 (90.39.14), Laropal A81. The aliquot was obtained cutting the synthetic resin with a scalpel.
- Coumarone resin, Mowital B20H, AW2 (90.39.13), Phenol Resin (90.34.4), Akroid. A grain of powder was directly taken.
- Mowilith 40, Mowilith 50, PVAc-AYAF, PVAc-AYAT, PVAc-AYA. The material was previously softened by drenching in ethanol, and then the aliquot was obtained by cutting with a scalpel.
- Paraloid. Sample was taken with a micropipette.

- Keton N, Phenol Resin (90.34.6): a piece was powdered with an agatha mortar, and a particle of the powder was taken.

## **2. Results and Discussion**

Synthetic resins are a wide category of modern material with an extensive variety of formulations and functionalities. These polymers have been employed in the field of art since the 19<sup>th</sup> Century, as base-materials in pictorial artworks, as well as in conservation/restoration treatment more ancient artistic artworks, so that they can be found in a wide number of objects with artistic or historical interest. The characterization of the several kinds of synthetic materials used by the artist or the conservator is of the utmost importance to propose adequate conservation and restoration treatments [6].

The proposed analytical methodology to analyze synthetic polymers is based on the direct pyrolysis of the solid sample, without previous treatment or derivatization adding, followed by the resolution of the obtained fragments mixture by gas chromatography and their individual identification by means of their corresponding mass spectrum. Firstly, a wide set of several synthetic resins used in artistic purpose (described in the section 1.6 of the Chapter III and exposed in Table 38, section 1 of this Chapter), storing the obtained information about the characteristic fragments of each material, as well as about other minority detected compounds.

The applied instrumental conditions were previously optimized in an earlier study to characterize synthetic pigments in artworks, because these materials are usually analyzed together in real samples. However, pyrolysis temperature was optimized for each studied synthetic resin. Finally, the suggested analytical methodology was applied to identify synthetic resin in samples from artworks, by means of the comparison of the detected fragments with those characteristic of each standard. Other organic materials, as drying oil, waxes and plasticizer were likewise identified.

### **2.1 Study of standard synthetic resins**

The analysis of samples from the standards, through the experimental procedure by Py-GC-MS described previously, provided the corresponding pyrogram, together with the mass spectrum of the most intense chromatographic peaks.

The influence of the temperature on the thermic breakage was studied by comparison, for each synthetic resin (Table 38 in section 1 of this Chapter), of the pyrograms obtained by pyrolysis at 590; 650 and 764°C. In the case of polystyrene (Kraton G), saturated hydrocarbon resin (Arkon P90), indene-benzofurane resin (coumarone resin), polyvinyl acetate

(Mowilith, PVAc, Palmer Cement), polyvinyl butyral (Mowital B20H), ketonic polymer (AW2, Laropal A81), phenol-formaldehyde resin and polyacroleine, no significant dissimilarities were found, in terms of fragments detected in the pyrograms, at the considered temperatures. However, the Acrylic-based Titanium pigment, Paraloid and Keton N pyrograms are clearly dependent on the temperature pyrolysis.

The obtained fragments provided useful information about the structure of each polymer, the presence of interferences or additives and the characterization of the synthetic resin in a complex matrix. Therefore, the fragments with a structure close to the monomer were considered as characteristic, and were most helpful for the characterization of the corresponding synthetic resin. Other detected fragments could be considered as oligomers or the result of reorganization of some products formed during the pyrolysis.

The list of the fragments detected in the scope of this wide study, is detailed in Table 36 (Chapter V, section 6, heading table at the end of this Chapter) indicating their retention time and most intense ion. The fragments detected in each standard and modern painting samples are indicated in Table 37 (Chapter V, section 6, heading table at the end of this Chapter).

### 2.1.1 Vinylpolymers

The following polyvinyl resins were studied: a styrene-ethylene/butylene-styrene (SEBS) polymer (Kraton G1650 and Kraton G1657 commercial version), a saturated hydrocarbon resin (commercial name Arkon P90), one indene-benzofurane polymer (coumarone resin), polyvinyl acetate (three commercial versions: Mowilith, PVAc and Palment Cement), polyvinyl butyral (Mowital B20H) and polyacrylic resins (Paraloid and a commercial acrylic-based Titanium pigment). These resins are exposed in Table 38 (section 1 of this Chapter).

Pyrograms from SEBS commercial polymer analysis showed a high amount of styrene, which was considered as the characteristic fragment, and toluene. The other monomers (ethylene and butylene) do not appear, due to their low molecular mass and high volatility. In the sample from Kraton G1657, hydrocarbons were also found, probably coming from the sieving for purification.

The characteristic fragments of Arkon P90 were saturated alkylcyclohexanes, as methylcyclohexane, ethylcyclohexane, 1-ethyl-3-methylcyclohexane, (1-methylethyl)cyclohexane and 1-ethyl-4-methylcyclohexane, which come from the saturated polycyclic structure of the resins. Other detected fragments were alkylcyclohexene, indene and decahydronaphthalene.

The following compounds of coumarone resin were detected by Py-GC-MS and considered as identifying: benzofurane, indene, methylbenzofurane and methylindene, the monomer of the resin. Several compounds with aromatic rings were also found.

The pyrolysis products of polyvinyl acetate were mainly acetic acid, from the polymer, and benzene, formed by reorganization of smaller fragments. Naphthalene, bi-phenyl and a wide group of alkylbenzenes were also detected. However, in the Palmer Cement, acetophenone and benzaldehyde, probably from the solvent of the polymer, could be as well identified. These three kinds of polyvinyl acetate would probably be by this way indistinguishable in a complex matrix.

The pyrogram of the polyvinyl butyral Mowital B20H shows as characteristic fragments the following compounds: butanal, obtained from the thermic breakage of the polymer, and benzene, formed from reorganizations of other fragment, by the same way as in polyvinyl acetate. On the other hand, butanoic acid, benzaldehyde, 3-penten-2-one and several alkylbenzenes were also identified.

The study of an Acrylic-based Titanium pigment was performed in order to enlarge the information about the behaviour of acrylic polymers during the pyrolysis. The characteristic fragments were the following acrylic monomers: methyl acrylate, methyl methacrylate, ethyl methacrylate, isobutyl acrylate, butyl acrylate, isobutyl methacrylate and butyl methacrylate. The antioxidant butylated hydroxytoluene was as well identified. The fragmentation was depending on the pyrolysis temperature. At 590°C, a wide amount of compound with aromatic rings, as ethylbenzene and naphthalene, as well as polysubstituted cyclohexadienones and other high-weighted molecules not identified. However, at 650°C a lower quantity of compound was detected in the pyrogram, whereas at 764°C there is an intermediate situation.

The Paraloid polymer was studied in order to identify and classify it. The pyrolysis fragments were: methyl acrylate, methyl methacrylate, ethyl methacrylate and methacrylic acid. Nevertheless, the main compounds were ethyl methacrylate and methyl acrylate, so that the sample was characterized as Paraloid B72 (EMA/MA). Several alkylbenzenes, probably from the solvent or by reorganizations during the pyrolysis, were also found. On the other hand, the shape of the pyrogram depended on the temperature of the pyrolysis. At 590°C and 764°C, 1-(4-ethylphenyl)ethanone, several high-weighted compounds and traces of plasticizer, which were not detected at 650°C. It can be assumed that acrylic polymers provided more fragments at 590°C.

### 2.1.2 Condensation polymers

The following condensation polymers were analyzed for this study: alkyd resin, ketonic resin (four commercial products: powdered AW2 with inventory number 90.34.13; compact AW2 with inventory number 90.34.14; Keton N and AW2), phenol-formaldehyde resin (two commercial products, inventory numbers 90.39.4 and 90.39.6) and polyacroleine (Akroid). These materials, together with their shape and inventory numbers are described in the Table 38 (section 1 of this Chapter).

In alkyd resin was detected a large amount of phthalic acid, together to phenolic compounds, which were probably formed from this last one, traces of oleic acid, short fatty acids, and carbonyl compounds. Phthalic acid was considered as characteristic fragment.

The pyrograms obtained by the analysis of the samples from powdered AW2 (n° 90.34.13), showed the following characteristic fragments: cyclohexanol, cyclohexanone and several alkylderivatives, which come clearly from a ketonic polymer. Moreover, cyclohexenes, santene, and other saturated polycyclic hydrocarbons were besides detected.

By analysis of the sample from compact AW2 (n° 90.34.14), several acrylic monomers (isobutyl methacrylate, 2-methylpropyl methacrylate and 2-ethylhexyl methacrylate) and alkylbenzenes were identified, whereas no characteristic fragments of a ketonic resin were found. Probably, the studied material was an acrylic polymer mistakenly labelled.

The characteristic fragments found in the Keton N polymer were the same as in AW2: cyclohexanol, cyclohexanone and alkylcyclohexanones. Other detected compounds were santene, octahydropentalene, tricyclododecene and other high-weighted unidentified molecules. In this case, more fragments were found after pyrolysis at 764°C.

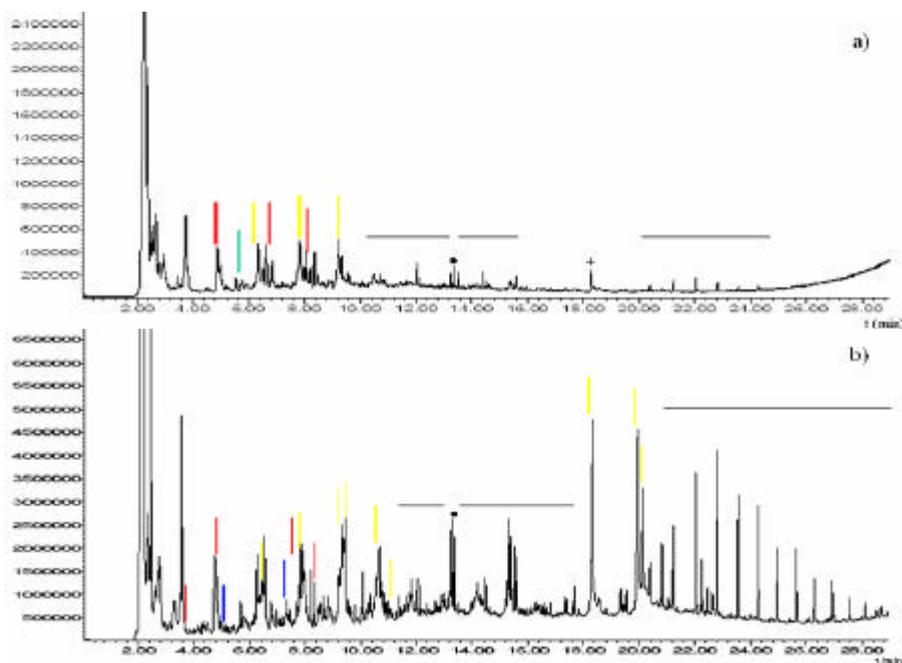
The following compounds were detected after Laropal A81 pyrolysis: Z-1-1(butenyl)azirine, 2,2-dimethyl-1S-propanediol, 3-hydroxy-2,2-dimethylpropanal, methyl 2,2-dimethyl-3-hydroxypropanate, benzonitrile and a large amount of unidentified substances. The fragments considered as characteristic were the most intense: methyl 2,2-dimethyl-3-hydroxypropionate and two peaks at  $t=10.214$  and  $t=13.92$ , which their molecular ions appears at 187 and 287, respectively. Benzonitrile might not used as characteristic, because it can be also found by pyrolysis of synthetic pigments.

The characteristic substances of Phenol Resin n° 90.39.4 were a wide variety of alkylphenols. Naphthalenes and high-weighted methanoazulenes were also detected. Otherwise the other studied Phenol Resin (n°90.39.6) provided by pyrolysis a large amount of alkylphenols (characteristic fragments), as well as hydroxybenzaldehydes and alkylbenzenes.

The following compounds were detected in the pyrogram from polyacroleine (Akroid) analysis: alkylbenzenes, alkylphenols, metoxybenzenes, metoxyphenols, benzaldehydes and other ketones. In this case, the monomeric unity of this polymeric resin (propenal) is very volatile and low weighted, so that it could not be detected. For this material no characteristic fragments were considered.

## 2.2 Study of samples from a pictorial modern artwork

The information provided by the analysis of the standard synthetic polymers was employed to characterize the resin in a modern painting from the contemporary German artist Georg Baselitz ("Senta", 1992/1993) (Figure 43). The author was born in 1937 in Deutschbaselitz (Saxony, Germany) and is considered as one of the greatest exponents in the modern artistic painting in Germany. The painting was supposed carried out in acrylic paint, because it is a material often used by the artist. The samples were obtained from two zones, stained in blue and black pigment, respectively.



**Figure 42.** Pyrograms (TIC), from the analysis of the blue (a) and (b) samples from a Baselitz painting ("Senta", 1992/1993). Characteristic compounds are indicated with coloured rectangles as follows: yellow for drying oil, red for ketonic polymer, green for polyacrylics and blue for phenol-formaldehyde resins. Time regions with a continuous series of hydrocarbons are marked with a horizontal straight line. The following additives are as well marked: butylated hydroxytoluene ( ) (antioxidant) and phthalic ester (+) (plasticizer).

The thorough study of the pyrograms obtained from the analysis of the artistic samples allow to establish the presence of compounds corresponding to the standard synthetic resins, as well as some additives and other materials in the painting. The pyrograms from the study of the blue dyed sample (at 590°C), and black pigmented sample (at 764°C), are shown in the Figure 42.

In both cases, a wide amount of hydrocarbons was detected. A series of linear alkanes, even and odd, were identified, so that they do not probably indicate the presence of beeswax. This n-alkane distribution indicated that they can be considered as traces of paraffin. The antioxidant butylated hydroxytoluene and the monoterpenes camphene and  $\alpha$ -canphenal were also detected.

The alkylbenzenes detected in the analysis of almost studied standards are probably the result of reorganizations of other small fragments. For this reason, they do not provide significant information for the characterization of the synthetic resins.



**Figure 43.** Modern pictorial artwork: “Georg Baselitz, Senta”, 1992/1993, painting on canvas, 100.5 x 71 cm, Bayerische Staatsgemäldesammlungen Inventory number 1785

### 2.2.1 Blue pigmented sample

The detection of short chain fatty acids and aldehydes is not enough to establish the presence of oil material, because long fatty acids, as palmitic, oleic or stearic acid have not been detected. Phthalic ester, a plasticizer additive, was as well identified.

The detection of several characteristic fragments of ketonic resin (cyclohexanone, 2-methylcyclohexanone and 2-ethylcyclohexanone) pointed to the use of a ketonic polymer as AW2 or Keton N. On the other hand, the detection of methylpropyl methacrylate is not sufficient to propose the use of a polyacrylic resin.

### 2.2.2 Black pigmented sample

The detection of stearic, oleic and stearic acid, together to their degradation products, as short fatty acids, aldehydes and ketones, so that a drying oil was probably used in the painting.

The following fragments were identified in the sample: cyclohexanone, 2-methylcyclohexanone and 2-ethylcyclohexanone, characteristic of ketonic polymers, as AW2 or Keton N. This kind of resin has been probably used to carry out the painting. Several phenol compounds were also found, but as the aromatic rings can be formed by reorganization, the presence of a phenol-formaldehyde resin can not be suggested.

**Table 36.** Analytical parameters of the obtained fragments by means of the study of the samples from standards and from a modern pictorial artwork by Py-GC-MS. The following information is indicated: order and elution time under the applied separation chromatographic conditions; name (if identified) or  $m/z$  of the molecular ion (IM); most intense ions in the mass spectrum.

**Table 37.** Detected fragments through the analysis by Py-GC-MS in each sample from standard synthetic resin\* and the modern painting\*\*. (The numeration of the fragments corresponds to that in Table 36). The compounds indicated with ( ) are those considered as characteristic of each resin, whereas those marked with (X) are other substances detected in the analysis.

\*Reference materials (commercial name): 1=Kraton G1650; 2=Kraton G1657; 3=Arkon P90; 4=coumarone resin; 5=Mowilith; 6 =PVAc; 7=Palmer Cement; 8=Mowital B20H; 9=Acrylic Pigment; 10=Paraloid; 11=AW2 (90.39.14); 12=AW2 (90.39.13); 13=Keton N; 14=Laropal A81; 15=Phenol Resin (90.39.4); 16=Phenol Resin (90.39.6); 17=Alkyd and 18=Akoid.

\*\*Samples from a modern painting by Baselitz, pigmented in 19=blue and 20=black.

## ***IX. CONCLUSIONS***

The performed research has allowed the development of several analytical methodologies to characterize a wide set of organic materials used in the making of pictorial layers and varnishes in artworks: proteins, natural waxes, drying oils, terpenic resins and synthetic polymers, according to the proposed aims. These methodologies are based on the following analytical techniques: HPLC-UV-Visible, HPLC-Fluorescence, GC/FID, GC/MS and Py-GC/MS, as well as direct mass spectrometry. The proposed methods were successfully applied to identify materials in real samples from pictorial artworks. As conclusions derived from this extense study, the following statements can be emphasized:

**1.** Liquid chromatography with fluorescence detector allows the differentiation between proteins used as binding media, as bovine gelatine, beef gelatine, albumin, casein and egg.

1.1 The reaction between the amino acids and o-phthalaldehyde provides fluorescent derivatives with adequate sensitivity, detection limit and linear interval, and useful to detect the analytes from the standard proteins and extracted from samples from pictorial artworks.

1.2 The instrumental conditions of the liquid chromatograph (eluent composition, gradient programm, stationary phase, flow and temperature) were established. These fixed parameters provided an adequate separation of the amino acid derivatives, without interferences with other compounds from the matrix.

1.3 The characterization of the proteins was satisfactorily performed by means of the relative amount of amino acids, calculated from the quotient between the chromatographic peak area of each OPA-amino acid derivative and the OPA-leucine.

1.4 The proposed methodology has been evaluated by means of its application to a set of samples from pictorial artworks made of tempera. In these cases, egg protein was clearly characterized.

**2.** A chromatographic method to characterize natural waxes, as beeswax, carnauba wax and ceresin has been developed. The unequivocal identification was carried out using the relative amount of hydrocarbons and fatty acid in each sample as characterizing parameters.

2.1 Carboxylic acids were derivatized with ethylchloroformate, in order to obtain the corresponding volatile derivative. The chromatographic conditions were also adjusted to adequately separate the linear alkanes and the ethyl carboxylates.

2.2 A methodology based on the acid hydrolysis of the sample

followed by an extraction with an organic solvent, in order to separate the analytes from the other compounds in the matrix, was performed.

2.3 The characterization of the natural waxes is based on the calculation of the quotients of the area of the chromatographic peaks corresponding to the linear alkanes from C<sub>20</sub>H-C<sub>35</sub>H by n-heptacosane, and the ratio of the area of the chromatographic peaks corresponding to each ethyl derivative of myristic, oleic, stearic and arachidic acids, by ethyl palmitate. The chemometric treatment of the obtained values, by means of Principal Component Analysis, provides an adequate discrimination between beeswax, carnauba wax and ceresin. Therefore, the analyzed samples appear in the score plot grouped by the kind of natural wax.

2.4 A second statistical treatment by PCA was performed to make a distinction between the natural waxes, when they are mixed with other materials containing fatty acids. Then, only the linear alkanes were chosen as statistical variables. The standard natural waxes were also differentiated with this chemometric model.

2.5 The proposed analytical method was successfully applied to the characterization of natural wax in samples from an oleoresin pictorial artwork.

**3.** A methodology to characterize drying oils using HPLC coupled to UV-Visible and Fluorescence detectors has been achieved. Aged and fresh standard drying oils from several origins (linseed, walnut and poppy seed) were selected in order to evaluate the influence of the damage in the identification of the oil binding media.

3.1 The proposed experimental procedure to release and separate the fatty acids from the matrix was an acid hydrolysis, followed by a liquid/liquid extraction with hexane. The use of this apolar solvent improves the procedure, because it reduces the incorporation of polar interferences in the chromatographic system, and provides less complex chromatograms.

3.2 The optimization of the parameters of the derivatization reaction of the fatty acids with 2-nitrophenylhydrazine (microwave oven, power and reaction time) for the UV-Visible detection and with 4-bromo-7-methylcoumarin for fluorescence detection, was carried out. In both cases, satisfactory values of limit of detection, sensitivity and linear interval, for the detection of the analytes in the standard drying oils and in the samples from artistic artworks were obtained. The fluorescence detection methodology provided higher sensitivity than that based on UV-Visible quantification.

3.3 Chromatographic parameters, as stationary phase, mobile phase (composition, gradient program, flow), temperature and detector wavelength. In both cases, an adequate separation of the fatty acid derivatives was obtained, without interferences between them or with other compounds in

the matrix, in less than 15 minutes.

3.4 The differentiation of linseed, walnut and poppy seed oils was carried out by means of the quotient between the area of the chromatographic peak corresponding to the derivatives of stearic and palmitic acids. This parameter remains roughly constant from the ageing of the oil binding media, and varies according to the kind of drying oil.

3.5 The optimized methodologies allow the characterization of linseed and walnut oil in samples from several oil paintings from the Renacentist period.

**4.** The use of direct mass spectrometry allows the development of analytical methodologies without derivatization or resolution steps, to characterize protein and oil paintings.

4.1 A procedure was established to release the fatty acids from the drying oils, based on the saponification of the triglycerides, followed by an acidification. The carboxylic acids were then separated from the matrix by a liquid/liquid extraction with hexane. This experimental procedure allows to obtain the fatty acids in a significantly smaller time (5 minutes) than under acid hydrolysis conditions (24 hours).

4.2 The following instrumental conditions of the mass spectrometer were optimized: capillary and skim of the ion trap voltage, polarity, target mass, scan interval, nebulizer pressure, dry gas and nebulizer temperature. The fixed conditions provided high sensitivity and reproducibility for the detection and aminoacids and fatty acids.

4.3 The characterization of protein and oil binding media was achieved by means of a chemometric treatment by Linear Discriminant Analysis applying the obtained amount of amino acids and fatty acids, as statistical variables. For both kinds of materials, the studied categories of protein and drying oils were clearly differentiated. In the case of the drying oils, a discrimination attending on the ageing treatment was even achieved.

4.4 The suggested methodology was applied to samples from tempera or oil paintings, in order to characterize the binding media used in each one. These results agreed with those obtained in the analytical studies carried out by liquid chromatography (Conclusions 1.4 and 3.5).

**5.** The study of the organic fraction in varnishes from music instruments has been achieved by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry. The comparison of the compounds detected in the standards and those found in the samples from string instruments allows the identification of the materials used in the elaboration of the varnishes.

5.1 A wide set of materials described in recipes of varnishes for Renacentist wood objects was selected as standard. These materials were mainly terpenic resins and essential oils.

5.2 A derivatization of the compounds with carboxylic groups, in order to improve their volatility and allowing them to be analyzable by GC. Then the reaction conditions, as temperature and reaction time were optimized. Moreover, an experimental procedure was established to silylate hydroxi groups, improving the chromatographic resolution and the mass spectrometric detection.

5.3 The instrumental conditions adjusted for the gas chromatograph, as the chosen capillary column and temperature program, allowed the separation of the compounds of interest detected: 97 compounds in 11 standards and several samples from 3 ancient musical instruments, in less than 60 minutes. The splitless injection allowed to reach a huge sensitivity, a decisive parameter, due to the low amount of sample available, because of the important artistic value of the studied string music instruments.

5.4 Proposed methodology could be used to detect an extense variety of compounds in the standart material. Then the obtained information about each one (mass spectrum, retention time, identification, material from it comes and decreasing intensity order) was stocked in a database.

5.5 Samples from varnishes of historical Italian string instruments were successfully analyzed following the developed procedure. The identification of the chomatographic peaks was carried out using the database, which was found useful to relate each peak with those from the standards. The stocked mass spectra were especially useful to detect the chromatographic peaks with low signal-to-noise ratio.

5.6 The obtained analytical methodology allowed to characterize a *Pinaceae* resin and linseed oil in the varnish of the Venere theorbe and the Stradivarius violin, and the same materials plus a triterpenic fraction were detected in the varnish from the Maler luth.

**6.** The analytical study of synthetic resins was carried out following a methodology based on the pyrolysis-GC-MS, without derivatizant to sample treatment.

6.1 The optimization of pyrolysis temperature was performed; by comparing the results applying 590; 650 and 764°C. For polyacrylic resins, the obtained pyrograms provided more fragments when the thermic breakage was at 590°C, whereas in the case of the ketonic polymer Keton N more chraracteristic fragments were detected under pyrolysis at 764°C. The analysis of the other synthetic polymers (polystyrene, saturated hydrocarbon resin, indene-benzofurane resin, polyvinyl acetate, polyvinyl butyral, ketyonic polymer, phenoł-formaldehyde resin and polyacroleine) provided similar results at the threes studied temperatures.

6.2 Instrumental conditions adjusted for the chromatograph and the mass spectrometer were found suitable for the resolution and detection of 278 fragments provided after pyrolysis of 18 standart synthetic polymers and

from the samples from a modern pictorial artwork, in nearly 29 minutes. The characteristic fragments detected in the pyrograms are compounds with a structure close that the monomer of the resin, reason why they allow the identification of the corresponding synthetic polymer with more reliability.

6.3 The proposed analytical methodology was applied to the analysis of samples from a modern pictorial artwork by the German painter Georg Baselitz ("Senta, 1992/1993), supposed to be carried out in acrylic paint. The thorough study of the obtained pyrograms revealed the presence of characteristic fragments of ketonic resin, paraffin, drying oil and plasticizer, instead of the expected acrylic markers.

**X.**  
***BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES***

- [1] D.V. Thompsin, *The Practice of Tempera Painting: Materials and Methods*, Dover Publications, Inc., New York, 1962
- [2] E. Doxiadis, *The Mysterious Fayum Portraits: Faces from Ancient Egypt*, first Ed, Thames & Hudson Ltd, London, 1995
- [3] R.J. Gettens, L.G. Stout, *Painting Materials*, A short encyclopaedia, Ed. D. Van Nostrand, New York, 1947
- [4] R. Mayer, *The Artist's Handbook of Materials and Techniques*, 5<sup>th</sup> Ed, Viking Adult, New York, 1991
- [5] J.P. Echard, *Art et Chimie : The varnish of musical instruments: concepts ans singularities*, Proceedings of the ART et CHIMIE: Les polymères Meetings, Paris (2002)
- [6] M.T. Doménech-Carbó, A. Doménech-Carbó, J.V. Gimeno Adelantado F. Bosch-Reig, *Applied Spectroscopy* 55(2001)1590
- [7] J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, 2<sup>nd</sup> Ed., Butterworths, Oxford, 1994
- [8] M. Matteini, A. Moles, *La química en la restauración. Materiales en el arte pictórico*, Ed. Nerea, Guipúzcoa, 2001
- [9] M.D. Petit, J.M. Maganto, *Talanta* 51(2000)727
- [10] A Otto, B.R.T. Simoneit, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 35(2001)3505
- [11] M.L. Gómez, *Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*, Ministerio de Cultura, Dirección general de bellas artes y archivos, Instituto de Conservación y Restauración de Bienes Culturales, Madrid, 1994
- [12] M.P. Colombini, F. Modungno, R. Fuoco, A. Togazzi, *Microchemical Journal* 73(2002)175
- [13] Z. Yu, G.R. Stewart, W.W. Mohn, *Applied and Environmental Microbiology* 66(2000)5148
- [14] E. Primo Yúfera, *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Tomo II, Ed. Reverté, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 1980
- [15] K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Química Orgánica*, 2<sup>a</sup> ed., Ed. Omega Barcelona, 1994
- [16] R. Lehninger, *Principios de Bioquímica*, Ed. Omega, Barcelona, 1984
- [17] A. Karpowicz, *Studies in Conservation* 26(1981)153
- [18] M.P. Colombini, F. Modugno, E. Menicagli, R. Fuoco, A. Giacomelli *Microchemical Journal* 67(2000)291
- [19] A. Nevin, S. Cather, D. Angalos, C. Fotakis, *Analytica Chimica Acta* 573-574(2006)341

- [20] E. Hare, *MASCA Newsletter* 10(1974)1
- [21] N. Garnier, C. Cren-Olive, C. Rolando, M. Regert, *Analytical Chemistry* 74(2002)4868
- [22] A. Asperger, W. Engewald, G. Fabian, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 50(1999)103
- [23] I. Bonaduce, M.P. Colombini, *Journal of Chromatography A* 1028(2004)297
- [24] P.E. Kolattukudy, *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*, 1<sup>st</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam, 1976
- [25] L. Kunst, L.A. Samuels, *Progress in Lipid Research* 42(2003)51
- [26] M. Regert, S. Colinart, L. Degrand, O. Decavallas, *Archaeometry* 43(2001)549
- [27] E. Ciliberto, G. Spoto, *Chemical Analysis* 155(2000)200
- [28] R. White, *Studies in Conservation* 23(1978)57
- [29] J.R. Gaborit, J. Ligot, *Sculptures en Cire de l'Ancien Egypte à l'Art Abstrait*, Ed. Reunion des Musées Nationaux, Paris, 1987
- [30] C. Heron, N. Nemceck, K.M. Bonfield, *Naturwissenschaften* 81(1994)266
- [31] M.P. Colombini, G. Giachi, F. Modugno, E. Ribechini, *Microchemical Journal* 79(2005)83
- [32] C. Marinach, M. C. Papillon, C. Pepe, *Journal of Cultural Heritage* 5(2004)231
- [33] H.G. Wiedermann, Bayer G., *Analytical Chemistry* 54(1982)619A
- [34] J. Loveridge, *The chemistry of bees*, University of Bristol Ed., Bristol, 2005
- [35] R.P. Evershed, S.N. Dudd, E.R. Gebhart, *Journal of Archaeological Science* 30(2003)1
- [36] E. Primo, *Química Agrícola III: Alimentos*. Ed. Alhambra, Madrid, 1972
- [37] J.D.J. van den Berg, K.J. van den Berg, J.J. Boon, *Journal of Chromatography A* 950(2002)195
- [38] J. Mallécol, J. Lemaire, J.L. Gardette, *Progress in Organic Coatings* 39(2000)107
- [39] J.D.J. Van den Berg, K.J. Van den Berg, J.J. Boon, *Progress in Organic Coatings* 41(2001)143
- [40] D. Erhardt, C.S. Tumosa, M.F. Mecklenburg, *Studies in Conservation* 50(2005)143
- [41] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59(2001)503
- [42] P. Fjällström, B. Andersson, C. Nilsson, K. Andersson, *Industrial Crops and Production* 16(2002)173
- [43] C. Sterberg, M. Svensson, M. Johansson, *Industrial Crops and Productions* 21(2005)263

- 
- [44] I. Mayumi, M. Koyano, *International Biodeterioration and Biodegradation* 28(1991)23
- [45] L. Osete-Cortina, Thesis: *Study of glass and archaeological glaze corrosion processes and characterization of film substances traditionally used in their restoration*, under the direction of M.T. Doménech-Carbó, Polytechnic University of Valencia, A. Doménech-Carbó and J.V. Gimeno-Adelantado, University of Valencia, 2006
- [46] J. B. Howard, *Crystalline Olefin Polymers*, R.A.V. Raff and K.W. Doak, Wiley-Interscience, New York, 1964
- [47] H. Zollinger, *Colour chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*, VCH, Weinheim, 1991
- [48] A.I. Scott, *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*, Vol. 7, Pergamon Press, Oxford, 1964
- [49] L.A. O'Neill, *Paint Technology* 27(1963)44
- [50] M. W. Formo, *Paints, varnishes and related products: discoloration in "Bailey's Industrial Oil and Fat Products"*, Ed. John Wiley, Chichester, UK, 1979
- [51] M. Lazzari, O. Chiantore, *Polymer Degradation Stability* 65(1999)303
- [52] J. Malléol, J. Lemaire, J.L. Gardette, *Studies in Conservation* 46(2001)121
- [53] G.A. Van der Doelen, Thesis: *Molecular Studies of fresh and aged triterpenoid varnishes*, under the direction of J.J. Boon, AMOLF, University of Amsterdam, 1999
- [54] E. R. De la Rie, *Studies in Conservation* 33(1988)53
- [55] J. Pérez-Castells, *Anales de la Real Sociedad Española de Química* 55(2005)
- [56] J. Nagyvary, B. Halford. *Chemical and Engineering News* 52(2007)Nov22
- [57] J. Nagyvary, J.M. Ehrman, *Naturwissenschaften* 75(1988)513
- [58] C.Y. Barlow, P.P. Edwards, R.G. Millward, R.A. Raphael, J.D. David, *Nature* 332(1988)313
- [59] J.P. Echard, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 59(2004)1663
- [60] A. von Bohlen, F. Meyer, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 52(1997)1053
- [61] A. von Bohlen, *Journal of Trace and Microprobe Techniques* 17(1999)177
- [62] A. von Bohlen, *Analytical Letters* 37(2004)487
- [63] C. Simmonet, V. Gibiat, J.L. Halary, *Physical and chemical properties and their vibrational consequences, oral communication*, Forum Acousticum, Sevilla, 2002
- [64] F. Meyer, *The Strad* 103(1992)250

- 
- [65] R. White, *An Examination of varnishes from three 18<sup>th</sup> Century Musical Instruments*, ICOM Committee for Conservation Report 78/16/1, 5<sup>th</sup> Triennial Meeting Proceedings, Zagreb(1978) 1
- [66] G.S. Fisher, *Chemical Industry* (1963)1761
- [67] J.J.W. Coppen, J.M. Robinson, L.J. Mullin, *Phytochemistry* 27(1988)1731
- [68] J.J.W. Coppen, J.M. Robinson, A.N. Kaushal, *Phytochemistry* 27(1988)2873
- [69] V. Kubelka, J. Mitera, P. Zachar, *Journal of Chromatography* 74(1972)195
- [70] E. Gildermeister, *Die Ätherische Öle*, 4<sup>th</sup> Ed., Ed. W. Treibs, Berlin, 1956
- [71] S. Hamm, J. Bleton, J. Connan, A. Tchaplá, *Phytochemistry* 66(2005)1499
- [72] A.F. Thomas, B. Willhalm, *Tetrahedron Letters* (1964)3177
- [73] G. Chiavari, *Chromatographia* 41(1995)273
- [74] L. Osete-Cortina, M.T. Doménech-Carbo, R. Mateo-Castro, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, *Journal of Chromatography A* 1024(2004)187
- [75] K.J. van den Berg, J.J. Boon, I. Pastorova, L.F.M. Spetter, *Journal of Mass Spectrometry* 35(2000)512
- [76] E. Kenndler, F. Mairinger, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 338(1990)635
- [77] S. Watts, E.R. de la Rie, *Studies in Conservation* 47 (2002) 257
- [78] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61(2002)345
- [79] J. S. Mills, R. White, *Studies in Conservation* 22(1977)12
- [80] L. Osete-Cortina, M.T. Doménech-Carbó, *Journal of Chromatography A* 1065(2005)265
- [81] G. Van der Doelen, K.J. Van den Berg, J.J. Boon., N. Shibayama, E.R. De la Rie, J.L. Genuit, *Journal of Chromatography A* 809(1998) 21
- [82] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 68-69(2003)115
- [83] K. J. van den Berg, I. Pastorova, L. Spetter, J.J. Boon, *State of oxidation of diterpenoid pinaceae resins in varnishes, wax lining material, 18<sup>th</sup> century resin oil paint, and a recent Koper resinat glaze*, in Proceedings of the 11<sup>th</sup> Triennial Meeting of ICOM, James & James Publishers, Edinburgh, 1996, p.930
- [84] D. Scalarone, M. Lazzari, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 64(2002)345
- [85] J. De la Cruz-Cañizares, María-Teresa Doménech-Carbó, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, F. Bosch-Reig, *Journal of Chromatography A* 1093(2005)177
-

- 
- [86] V.P. Papageorgiou, M.N. Bakola-Christanopoulou, K.K. Apazidou, E.E. Psaros, *Journal of Chromatography A* 769(1997)263
- [87] P. Vandenabeele, S. Bodé, A. Alonso, L. Moens, *Spectrochim. Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 61(2005)2349
- [88] H.G.M. Edward, L.F.C. de Oliveira, A. Quye, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Structure* 57(2001)2831
- [89] R. Singh, A. Jain, S. Panwar, D. Gupta, S.K. Khare, *Dyes and Pigments* 66(2005)99
- [90] D. Fabbri, G. Chiavari, H. Ling, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 56(2000)167
- [91] B.E. van Wyck, *Food Plants of the World*, 1<sup>st</sup> Ed, Timber Press, Inc., Portland, Oregon, USA, 2005
- [92] A. Doménech-Carbó, M.T. Doménech-Carbó, M.C. Saurí-Peris, *Talanta* 66(2005)769
- [93] G. D. Van der Doelen, K.J. van den Berg, J.J. Boon, *Studies in Conservation* 43 (1998) 249
- [94] I. Pastorova, K. J. Van den Berg, J.J. Boon, J.W. Verhoeven, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 43(1997)41
- [95] K.J. van den Berg, *Diterpenoid resins in varnishes* in MolArt Evaluation 98 Discussion papers, 1997, 9.97
- [96] M.P. Colombini, F. Modugno, S. Giannarelli, R. Fuoco, M. Matteini, *Microchemical Journal* 67(2000)385
- [97] S. Zumbühl, R. Knochenmuss, S. Wülfert, F. Dubois, M.J. Dale, R. Zenobi, *Analytical Chemistry* 70(1998)707
- [98] F.J. Marner, A. Freyer, J. Lex, *Phytochemistry* 30(1991)3709
- [99] <http://www.kremer-pigmente.de/bindem04.htm>
- [100] [http://www.kraton.com/Products/Kraton\\_G\\_SEBS\\_SEPS/](http://www.kraton.com/Products/Kraton_G_SEBS_SEPS/)
- [101] <http://www.freepatentsonline.com/6437038.html>
- [102] <http://www.museumsvicescorporation.com>
- [103] H. Wagner, H.F. Sarx, *Lackkunstharze*, Carl Hansen Verlag, Munich, Alemania, 1950
- [104] H. Kittel, *Farben -Lack- und Kunststoff Lexikon*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.B.H., Stuttgart, Alemania, 1952
- [105] Lucius, Brüning, *Mowilith*, Farbwerke Hoest A.G., Brüning, Frankfurt am Main, Alemania, 1959
- [106] D. Stoye, W. Freitag, *Lackharze: Chemie, Eigenschaften, Anwendung*, Ed. Hanser, Munich, Alemania, 1996
- [107] O. Chiantore, M. Lazzari, *Polymer* 42(2001)17
- [108] T. Learner, *Studies in Conservation* 46(2001)225
- [109] J. Koller, U. Baumer, *Restauro* 1(2001)26
- [110] <http://www.basf.com/rawmaterials/pdfs/ed1032e.pdf>
- [111] <http://www.kern-gmbh.de/kunststoff>

- [112] C. M. Selwitz, *Cellulose Nitrate in Conservation*, Ed. Paul Getty Institut, Los Angeles, USA, (1988)
- [113] H.M. Spurlin, *High Polymers*, Ed. Interscience, New York, 1955
- [114] E.C. Worden, *Technology of Cellulose Esters*, Ed. Millburn. New Jersey, 2981
- [115] J. Barsha, *Cellulose and Cellulose Derivatives*, Eds. Ott, H.M. Spurlin, and M.W. Graffin, Interscience, New York, 1954
- [116] B. Hardman, *Silicones in Encyclopedia of Polymer Science & Engineering*, 2 ed., J. Wiley & Sons, New York, 1989
- [117] R. Feller, *Conservation and Restoration of Pictorial Art*, Ed. Butterworths, 1976
- [118] G.L. Stout, R.J. Gettens, *Mouessin* 17-18(1932)107
- [119] G. Thompson, *Recent Advances in Conservation*, Ed. Thomson, Butterworths, London, 1963
- [120] R.G. Newton, S. Davison, *Conservation of Glass*, Ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, 1996
- [121] R.L. Feller, *Recent Advances in Conservation*, Ed. Thomson, Butterworths, London, 1963
- [122] E. De Witte, M. Goessens-Landrie, E.J. Goethalls, K. Van Leberghe, C. van Springel, ICOM Committee for Conservation Report 81/16/4, 6<sup>th</sup> Triennial Meeting, Ottawa, 1981
- [123] R. Breek, W. Froentjes, *Studies in Conservation* 20(1975)183
- [124] M. Johnson, *Nitrocellulose as a Conservation Hazard*, The American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, Preprints, Fourth Annual Meeting, Dearborn, Michigan, USA (1976) p.66
- [125] S.P. Koob, *The Conservator* 6(1982)31
- [126] E.T.G. Mibach, *Conservation in Archaeology and the Applied Arts*, IIC, London (1975)55
- [127] H.J. Plenderleith, A.E.A. Werner, *The Conservation of Antiquities and Works of Art*, Oxford University, London, 1971
- [128] J.F. Mills, *The Care of Antiques*, Ed. Arligton, London, 1694
- [129] E. Dowman, *Conservation in Field Archaeology*, Ed. Methnen and Co., Ltd., London, 1970
- [130] S. Davison, *A Reviews of Adhesives and Consolidants used on glass Antiquities*, Preprints of the contributions to the Paris Congress IIC, Paris, France, 1984, p.191-194
- [131] A. Moncrieff, *Protecting Silver from Tarnishing*, IIC News 4(1966)6
- [132] J.L. Down, *Studies in Conservation* 29(1984)63
- [133] M.J. Melo, S. Brazzi, M. Camaiti, O. Chiantore, F. Piacenti, *Polymer Degradation and Stability* 66(1999)23

- 
- [134] V. Arjunan, N. Puviarasan, S. Mohan, P. Murugesan, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(2007)1290
- [135] M. Odlyha, *Thermochimica Acta* 269-270(1995)705
- [136] M.C.M. Moya-Moreno, D. Mendoza-Olivares, F.J. Amezcua-López, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, *Talanta* 50(1999)269
- [137] F. Capitelli, S. Vinici, P. Paggio, P. Abbruscato, E. Princi, A. Casadevall, J.D. Nosanchuk, E. Zanardini, *Macromolecular Bioscience* 5(2005)49
- [138] M. P. Colombini, A. Carmignani, F. Modugno, F. Frezzato, A. Olchini, H. Brecolaki., V. Vassilopoulou, P. Karkanias, *Talanta* 63(2004)839
- [139] H.G.M. Edwards, M.J.P. Falk, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 53(1997)2685
- [140] C.W. Beck, *Science and Technology in the Service of Conservation*, Preprints of the IIC Washington Congress, (1984)104
- [141] T. Learner, The Analysis of Synthetic Resins Found in Twentieth Century Paint Media, in *Resins Ancient and Modern*, M.M. Swright and J.H. Townsend, (Eds.), Scottish Society for Conservation and Restoration Publications, Edinburgh, 1995
- [142] J.L. Down, R.S. Williams, *A Report on the Evaluation of Selected Poly(vinyl acetate) and Acrylic Adhesives for use in Paper Conservation*, Proceedings of Symposium 88 in Conservation of Historic and Artistic Works on Paper, 1994, Ottawa, Canada
- [143] F. Capitelli, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 71(2004)405
- [144] M.T. Doménech-Carbó, F. Bosch-Reig, J.V. Gimeno-Adelantado, V. Peris-Martínez, M.C.M. Moya-Moreno, *Journal of Molecular Structure* 410-411(1997)559
- [145] M.T. Doménech-Carbó, F. Bosch-Reig, V. Peris-Martínez, J.V. Gimeno-Adelantado, *Química Analítica* 16(1997)223
- [146] R.J. Meilunas, J.G. Bentsen, A. Steinberg, *Studies in Conservation* 35(1990)51
- [147] J. Glastrup, *Studies in Conservation* 40(1995)65
- [148] P. Vandenabeele, B. Wheling, L. Moens, H. Edwards, M. De Reu, G. Van Hooydonk, *Analytica Chimica Acta* 407(2000)261
- [149] L. Burgio, J.H.C. Robin, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 57(2001)1491
- [150] H.G.M. Edwards, M.J. Falk, *Journal of Raman Spectroscopy* 28(1997)211
- [151] G. Burrafato, M. Calabrese, A. Cosentino, A.M. Gueli, S.O. Troja, A. Zuccarello, *Journal of Raman Spectroscopy* 35(2004)879
- [152] D. Versan, P.P. Lottici, G. Antonioli, E. Campani, A. Vasoli, C. Violante, *Journal of Raman Spectroscopy* 35(2004)694
-

- 
- [153] H.G.M. Edwards, D.W. Farwell, S. Rozenberg, *Journal of Raman Spectroscopy* 30(1999)361
- [154] E.N. Dubis, A.T. Dubis, J.W. Morzycki, *Journal of Molecular Structure* 511(1999)173
- [155] H.G.M. Edwards, D. Farwell, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy* 51(1995)2073
- [156] E.H. Korte, H. Staat, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 347(1993) 454
- [157] M. Baker, D. von Endt, W. Hopwood, D. Erhardt, *FT-IR Microspectrometry: a Powerful Conservation Analysis Tool*, in Preprints of 16<sup>th</sup> Annual Meeting (New Orleans, 1988), p.1
- [158] L. Toniolo, C. Colombo, S. Bruni, P. Fermo, A. Casolli, G. Palla, C.L. Bianchi, *Studies in Conservation* 43(1998)201
- [159] A. M. Morrow, N.S. Allen, M. Edge, D. Aldcroft, H. Jones, *Polymer Degradation and Stability* 66(1999)95
- [160] J. De la Cruz-Cañizares, M.T. Doménech-Carbó, J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, F. Bosch-Reig, *Journal of Chromatography A* 1025(2004)277
- [161] A. Derieux, S. Rochut, M.C. Papillon, C. Pepe, *Chemistry* 4(2001)295-300
- [162] J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, M.T. Doménech-Carbó, F. Bosch-Reig, A. Doménech-Carbó, J. De la Cruz-Cañizares, M.J. Casas-Catalán, *Talanta* 56(2002)71
- [163] R. Mateo-Castro, M.T. Doménech-Carbó, V. Peris-Martínez, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, *Journal of Chromatography A* 778(1997)373
- [164] R. Mateo-Castro, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, A. Doménech-Carbó, M.J. Casas-Catalán, L. Osete-Cortina, J. de-la-Cruz-Cañizares, M.T. Doménech-Carbó, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369(2001)642
- [165] J.V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, M.T. Doménech-Carbó, F. Bosch-Reig, A. Doménech-Carbó, M.J. Casas-Catalán, L. Osete-Cortina, *Journal of Chromatography A* 922(2001)385
- [166] M.T. Doménech, M.J. Casas-Catalán, A. Doménech-Carbó, R. Mateo-Castro, J.V. Gimeno-Adelantado, F. Bosch-Reig, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369(2001)571
- [167] A. González-Casado, E.J. Alonso-Hernández., P. Espinosa, J.L. Vílchez, *Journal of Chromatography A* 826 (1998) 49
- [168] J. Gamazo, M.S. García, J. Simal, *Food Control* 14(2003)463
- [169] R.C. De Souza, V. Zanon, F. Trombetta, M. Martinelli, E. Bastos, *Analytica Chimica Acta* 505(2004)223
- [170] T.C. Jenkins, T.C. Thies, E.E. Moseley, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49 (2001) 2142
-

- [171] A. Asperger, W. Engewald, G. Fabia, *Journal of Analytical Applied Pyrolysis* 61(2001)91
- [172] J. Dron, R. Linke, E. Rosenberg, M. Schreiner, *Journal of Chromatography A* 1047(2004)111
- [173] M.P. Colombibi, F. Modugno, R. Fouco, A. Tognazzi, *Microchemical Journal* 73(2002)175
- [174] A. Tchaplá, P. Méjanelle, J. Bleton, S. Goursaud, *Journal of Separation Science* 27(2004)217
- [175] M.T. Doménech-Carbó, S. Kuckova, J. de la Cruz-Cañizares, L. Osete-Cortina, *Journal of Chromatography A* 1121(2006)148
- [176] A. Casoli, P.C. Musini, G. Palla, *Journal of Chromatography A* 731(1996)237
- [177] C.W. Beck, J. Greenlie, M.P. Diamond, A. M. Macchiarulo, A.A. Hannenberg, M.S. Hauck, *Journal of Archaeological Science* 5(1978)343
- [178] C. Mathe, G. Culioli, P. Archier, C. Viellescazes, *Journal of Chromatography A* 1023(2004)277
- [179] S. Hamm, E. Lesellier, J. Bleton, A. Tchaplá, *Journal of Chromatography A* 1018(2003)73
- [180] S.M. Van Ruth, E.S. Shaker, P.A. Morissey, *Food Chemistry* 75(2001)177
- [181] P. Bocchini, P. Traldi, *Organic Mass Spectrometry* 33(1998)1053
- [182] F. Capitelli, T. Learner, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 63(2002)339
- [183] G. Chiavarri, D. Fabbri, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74(2005)39
- [184] J. D. J. Van den Berg, J.J. Boon, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61(2005)45
- [185] G. Chiavarri, D. Fabbri, S. Prati, *Chromatographia* 55(2002)611
- [186] L. Osete-Cortina, M.T. Doménech-Carbó, *Journal of Analytical Applied Pyrolysis* 76(2006)144
- [187] Laura Osete-Cortina, M.T. Doménech-Carbó, *Journal of Chromatography A* 1127(2006)228
- [188] Y. Ishida, S. Wakamatsu, H. Yokoi, H. Ohtani, S. Tsuge, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49(1999)267
- [189] S. Okuyama, T. Mitsui, Y. Ishida, H. Ohtani, S. Tsuge, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 64(2002)187
- [190] A. Piccirilli, D. Scalarone, O. Chiantore, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74(2005)33
- [191] S. Pipatmanomai, C.A. Islas, I. Suelves, A.A. Herod, D.R. Dugwell, R. Kandiyoti, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 58-59(2001)299

- 
- [192] H. Mestdagh, C. Rolando, M. Sablier, J.P. Rioux, *Analytical Chemistry* 64(1992)2221
- [193] J. Odermatt, O. Ringena, R. Teucke, C. Reiter, M. Gerst, *Appita Journal* 58(2005)462
- [194] C.N. Cascaval, D. Rosu, *Revue Roumaine de Chimie* 36(1991)1331
- [195] G. Garzo, J. Tamas, T. Szekely, K. Ujszaszi, *Acta Chimica Academiae Scientiarum Hungaricae* 69(1971)273
- [196] G. Chiavari, M. Ioele, S. Prati, P. Santopadre, *Chromatographia* 56(2002)763
- [197] I. Surowiec, I. Kaml, E. Kenndler, *Journal of Chromatograph A* 1024(2004)1453
- [198] I. Kaml, K. Vcelakova, E. Kenndler, *Journal of Separation Science* 27(2004)161
- [199] S.M. Harrison, I. Kaml, V. Prokoratova, M. Mazanek, E. Kenndler, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382(2005)1520
- [200] J.H.T. Luong, T. Rigby, K.B. Male, P. Brouvette, *Journal of Chromatography A* 849(2000)255
- [201] I. Karapanagiotis, *American Laboratory* 38(2006)36
- [202] I. Karapanagiotis, D. Karapanagiotis, A. Tsakalof, Y. Chryssoulakis, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 28(2005)739
- [203] I. Karapanagiotis, M. Gika, A. Danielia, A. Tsakaloph, *Chemika Chronika* 67(2005)31
- [204] D.W. McMartin, K.M. Peru, J.V. Headley, M. Winkley, J.A. Gillies, *Journal of Chromatography A* 952(2002)289
- [205] A. Latorre, A. Rigol, S. Lacorte, *Journal of Chromatography A* 991(2003) 205
- [206] S. Grcev, P. Schoenmakers, P. Iedema, *Polymer* 45(2004)39
- [207] J.C.J.F. Tacx, N.L.J. Meijerink, K.W. Suen, *Polymer* 38(1997)5363
- [208] M. L. Dias, E.B. Mano, C. Azuma, *European Polymer Journal* 33(1997)559
- [209] D. Vareckova, S. Podzimek, J. Lebduska, *Analytica Chimica Acta* 557(2006)31-36
- [210] T. E. Ereemeeva, T. O. Bykova, V. S. Gromov, *Journal of Chromatography A* 552(1990)67
- [211] C.A. Maines, E.R. de la Rie, *Progress in Organic Coatings* 52(2005)39
- [212] C.M. Grzywacz, *Journal of Chromatography A* 676(1994)177
- [213] K. Funazo, M. Tanaka, Y. Yasaka, H. Takigawa, T. Shono, *Journal of Chromatography* 481(1989)211
- [214] M.J. Cooper, M.W. Andrews, *Analytical Chemistry* 46(1989)1974
- [215] E. Grushka, H.D. Durst, E.J. Kikta, *Journal of Chromatography*
-

- 112(1975)673
- [216] A. Mehta, A.M. Oeser, M.G. Carlson, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 719(1998)9
- [217] D.S. Nichols, N.W. Davies, *Journal of Microbiological Methods* 50(2002)103
- [218] N. E. Hoffman, J. C. Liao, *Analytical Chemistry* 48(1976)1104
- [219] E. Vioque, P. Maza, F. Millán, *Journal of Chromatography* 331(1985)187
- [220] H. Miwa, C. Hiyama, M. Yamamoto, *Journal of Chromatography* 321(1985)165
- [221] H. Miwa, *Journal of Chromatography A* 881(2000)365
- [222] H. Miwa, M. Yamamoto, T. Momose, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 28(1980)599
- [223] R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, S. Van der Wal, *Journal of Chromatography A* 1031(2004)35
- [224] T. Toyo'oka, *Analytica Chimica Acta* 465(2002)111
- [225] T. Yoshida, A. Uetake, H. Yamaguchi, N. Nimura, T. Kinoshita, *Analytical Biochemistry* 173(1988)70
- [226] M. Yamaguchi, S. Hara, K. Obata, *Journal of Liquid Chromatography* 18(1995)2991
- [227] Y. Saito, T. Uchiyama, K. Sasamoto, K. Takata, Y. Ohkura, K. Uneo, *Analytica Chimica Acta* 300(1995)243
- [228] M. Saito, M. Chiyoda, T. Ushijima, K. Sasamoto, Y. Ohkura, *Analytical Science* 10 (1994) 669
- [229] M. Iketa, K. Shimada, T. Sakaguchi, *Journal of Chromatography* 305(1984)261
- [230] Y.M. Lee, H. Nakamura, T. Nakajima, *Analytical Science* 5(1989)205
- [231] J. You, W. Zhang, Y. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 416(2001)163
- [232] Y. Yasaka, M. Tanaka, T. Shono, T. Tetsumi, J. Katakawa, *Journal of Chromatography* 508(1990)133
- [233] K. Akasaka, H. Ohru, H. Meguro, *Analyst* 118(1993)765
- [234] H. Tsuchiya, T. Hayashi, H. Naruse, N. Tagaki, *Journal of Chromatography* 231(1982)247
- [235] M. Yamaguchi, R. Matsunaga, K. Fukuda, M. Nakamura, *Journal of Chromatography* 414(1987)275
- [236] A. Takadate, T. Masuda, C. Tajima, C. Murata, M. Irikura, S. Goya, *Analytical Science* 8(1992)663
- [237] A. Takadate, T. Masuda, C. Murata, C. Haratake, A. Isobe, M. Irikura, *Analytical Science* 8(1992)695
- [238] H. Cisse, R. Farinotti, *Journal of Chromatography* 225(1981)509
- [239] J.S. Yoo, V.L. Mc Guffin, *Journal of Chromatography* 627(1992)87
- [240] S. Lam, E. Grushka, *Journal of Chromatography* 158(1978)207

- 
- [241] W. Elbert, S. Breitenbach, A. Neftel, J. Hahn, *Journal of Chromatography* 328(1985)111
- [242] W. Dünge, *Analytical Chemistry* 49(1977)442
- [243] J.L. Shen, C. Hummert, B. Luckas, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357(1997)101
- [244] D. Perret, A. Gentilli, S. Marchese, M. Sergi, L. Caparossi, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18(2004)1989
- [245] K. Nagy, A. Jakab, J. Fekete, K. Vekey, *Analytical Chemistry* 76(2004)1935
- [246] R.E. Calaf, J. Peña, S. Paytubi, M. Carrascal, M. Posada, M. Gelpi, J. Abian, *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 49(2001)5085
- [247] M. Jemal, Z. Ouyang, D.S. Teitz, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12(1998)429
- [248] J. Sajiki, J. Yonekubo, *Analytica Chimica Acta* 465(2002)417
- [249] K. Takamura, T. Fuse, K. Arai, F. Kusu, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 468(1999)53
- [250] A. Kotani, F. Kusu, K. Takamura, *Analytica Chimica Acta* 465(2002)199
- [251] S. Ikenoya, O. Hiroshima, M. Ohmae, K. Kawabe, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 28(1980)2941
- [252] K. Shimada, C. Sakayori, T. Nambara, *Journal of Liquid Chromatography* 10 (1987) 2177
- [253] A. Vasanits, I. Molnár-Perl, *Journal of Chromatography A* 832(1999)109
- [254] R.G. Granberg, *LC Magazine* 2(1984)776
- [255] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *Journal of Chromatography A* 961(2002)9
- [256] J. You, W. Lao, Q. Ou, X. Sun, *Journal of Chromatography A* 848(1999)117
- [257] R. Gatti, M.G. Gioia, A.M. Di Petra, *Analytica Chimica Acta* 474(2002)11
- [258] Y. Huang, H. Matsunaga, A. Toriba, T. Santa, T. Fukushima, K. Imai, *Analytical Biochemistry* 270(1999)257
- [259] G.P. Palace, C.H. Phoebe, *Analytical Biochemistry* 244(1997)393
- [260] A.J. Shah, V. de Biasi, S.G. Taylor, C. Roberts, P. Hemmanti, R. Munton, A. West, C. Routledge, P. Camilleri, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 735(1999)133
- [261] D.P. Manica, J.A. Lapos, A.D. Jones, A.G. Ewig, *Analytical Biochemistry* 322(2003)68
- [262] J. You, Y. Shan, L. Zhen, L. Zhang, Y. Zhang, *Analytical Biochemistry* 313(2003)17
-

- 
- [263] P. Herbert, M.J. Cabrita, N. Ratola, O. Laureano, A. Alves, *Journal of Food Engineering* 66(2005)315
- [264] H. Sultana, R. Onodera, M.M. Or-Rashid, S. Wadud, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 755(2001)321
- [265] A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl, *Journal of Chromatography A* 870(2000)271
- [266] T. P. Piepponen, A. Skujins, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 757(2001)277
- [267] H.P. Fitznar, J.M. Lobbes, G. Kattner, *Journal of Chromatography A* 832(199)123
- [268] G.P.M.A. Hardy, F.J. Van Hermet, A.J. Meijer, J. Goudmits, *Analytical Biochemistry* 291(2001)297
- [269] C. S. Yang, P.J. Tsai, W.Y. Chen, W.J. Tsai, J.S. Kuo, *Journal of Chromatography B* 734(1999)1
- [270] K. Salchet, T. Pompe, C. Sperling, C. Werner, *Journal of Chromatography A* 1005(2003)113
- [271] E.H. Soufleros, E. Bouloumpasi, C. Tsarchopoulos, C.G. Biliaderis, *Food Chemistry* 80(2003)261
- [272] Y.V. Tcherkas, A.D. Denisenko, *Journal of Chromatography A* 913(2001)309
- [273] K.S. Lee, D.G. Drescher, *Journal of Biological Chemistry* 254(1979)6248
- [274] K. Petritis, P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Dreux, *Journal of Chromatography A* 896(2000)253
- [275] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *Journal of Chromatography A* 855(1999)191
- [276] J. Qu, Y. Wang, G. Luo, Z. Wu, C. Yang, *Analytical Chemistry* 74(2002)2034
- [277] B. Casetta, D. Tagliacozzi, B. Shushan, G. Federici, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 38(2000)391
- [278] J.L. Gómez-Ariza, M.J. Villegas-Portero, V. Bernal-Daza, *Analytica Chimica Acta* 540(2005)221-230
- [279] J.J. Dalluge, S. Smith, F. Sánchez-Riera, C. McGuire, R. Hobson, *Journal of Chromatography A* 1043(2004)3
- [280] Z. Liu, P.E. Minkler, D. Lin, L.M. Sayre, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18(2004)1059
- [281] Y.V. Tcherkas, L.A. Kartsova, I.N. Kartsova, *Journal of Chromatography A* 913(2001)303
- [282] Y. Qu, Y.M. Li, E. Vandebussche, S. Geeraerts, F. Vandesinde, *Journal of Chromatography A* 798(1998)19
- [283] V. Rizzo, A. Anessi, L. Montalbeti, G. Bellantoni, R. Trotti, C.V. Melzi d'Eril, *Journal of Chromatography A* 729(1996)181

- [284] L. Canevari, R. Vieira, M. Aldegunde, F. Dagani, *Analytical Biochemistry* 205(1992)137
- [285] G.C. Li, I.S. Krull, S.A. Cohen, *Journal of Chromatography A* 724(1996)147
- [286] T. Mahachi, J. Tendai, R.M. Carlson, D.P. Poe, *Journal of Chromatography* 298(1984)279
- [287] S. Cui, *Ziran Kexueban* 19(1993)37-41
- [288] J. Pei, X.Y. Li, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367(2000)707
- [289] M. Odhyla, N.S. Cohen, G.M. Foster, *Thermochimica Acta* 365(2000)34
- [290] M.J. Lerma-García, J.M. Herrero-Martínez, G. Ramis-Ramos, E.F. Simó-Alfonso, *Analytica Chimica Acta*, 2006, in referees.
- [291] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4<sup>th</sup> Ed., Prentice-Hall, Harlow, England, 2000
- [292] J. Dugot, *Les Luths (Occident)-Catalogue des Collections du Musée de la Musique*, vol. 1, Cité de la Musique, Paris, 2006
- [293] S.H. Chen, K.C. Chen, H.M. Lien, *Journal of Chromatography A* 849(1999)357
- [294] J.S. Mills, *Studies in Conservation* 11(1966)92
- [295] S. Basar, *Phytochemical Investigations on Boswellia Species*, Thesis, University of Hamburg, 2005
- [296] H. Chisholm In (Ed.), *Encyclopædia Britannica*, vol. 9, 11th ed., Horace Everett Hooper, 1911, p. 259
- [297] R. White, J. Kirby, *Technical Bulletin*, vol. 22, National Gallery, London, 2001, p. 64