

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ**

**ANÁLISIS QUÍMICO DE UNA OBRA DE ARTE COLONIAL EN
EL PERÚ DEL SIGLO XVI CON POSIBLE ATRIBUCIÓN A
BERNARDO BITTI**

Tesis para optar el Título de Licenciado en Química, que presenta el bachiller:

Jhonatan Javier Arízaga Torres

ASESORA: Dra. Patricia Elena Gonzales Gil

Lima, julio de 2018



Para todos los que siempre han creído en mí.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanas, por brindarme su apoyo, cariño y comprensión incondicional durante toda la carrera y la elaboración de la tesis.

A mi asesora, la doctora Patricia Gonzales, por su paciencia y guía durante toda esta etapa universitaria.

Al Padre Enrique Rodríguez, S. J., párroco de la Iglesia San Pedro de Lima, por autorizar el acceso a la obra cuyo estudio se presenta en este trabajo y a la información disponible sobre la misma. Al Taller C&R San Pedro, en especial a Nancy Junchaya, por su gran apoyo en este trabajo.

A los doctores Yves Coello, Luis Ortega y Betty Galarreta por el apoyo con el manejo de los equipos SEM-EDS, fluorescencia de rayos X y espectroscopios Raman, respectivamente. Al doctor Eric Cosio y a Fabián Limonchi por brindar su apoyo con el uso del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas. Un especial agradecimiento al doctor Alfredo Ibañez y al Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA), por posibilitar el uso del equipo de espectrometría de masas con ionización MALDI.

Al Laboratorio de Investigación Científica y Análisis del Museo Winterthur, por permitir el uso de sus instrumentos e instalaciones para el análisis de micromuestras.

A mis amigos, compañeros y seres queridos que me dieron ánimos para cumplir mis metas académicas y personales, en especial a Rafael Valencia, con quien compartí muchas horas de trabajo en el laboratorio.

A Melina Moreno, quien me animó a seguir adelante cada día.

A la Pontificia Universidad Católica del Perú, por la oportunidad de formarme como profesional, por todas las experiencias y recuerdos.

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Gestión de Investigación de la PUCP, a través de la subvención DGI-2015-15. Así mismo, se agradece a la Dirección de Gestión de Investigación por la aceptación de este trabajo como ganador en el concurso “PADET” del año 2017.

RESUMEN

El objeto de estudio de esta investigación fue una pintura sobre tabla titulada “El Señor de la Caída”, la cual forma parte del vasto patrimonio cultural del Perú. La pintura, propiedad de la iglesia San Pedro de Lima, es anónima, pero podría pertenecer a Bernardo Bitti, quien fue un artista de gran importancia en el proceso de evangelización del Perú y países vecinos a finales del siglo XVI.

Se trabajó en la caracterización química de los materiales presentes en la obra mencionada. Por la naturaleza del objeto en estudio, estos análisis químicos tuvieron que ser no invasivos o microdestructivos.

En una primera fase del estudio, se realizaron análisis *in situ* de la obra, usando fluorescencia de rayos X como técnica elemental y espectroscopía Raman como técnica molecular. Posteriormente, se tomaron radiografías de transmisión y fotografías de reflectancia infrarroja para investigar posibles detalles o esbozos ocultos a la vista.

En base a la información obtenida, se tomaron micromuestras de zonas de la obra que requerían un estudio más detallado. Estas muestras fueron analizadas mediante diferentes técnicas. Se caracterizaron los pigmentos inorgánicos y el material de la base de preparación mediante microespectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido. Por otro lado, se analizaron los aglutinantes y resinas utilizados en la obra mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se identificó una laca orgánica mediante espectrometría de masas con ionización MALDI (MALDI-MS) y se propuso la presencia de material proteico a partir de los resultados de una tinción con Ponceau S.

Los materiales identificados en la obra concuerdan con aquellos que se esperaría en una pintura sobre tabla del siglo XVI. En base al estilo de los personajes representados en la obra, es posible que más de un autor haya estado involucrado en su creación. No se puede determinar, sólo a partir de este estudio, si el artista principal fue Bernardo Bitti o algún contemporáneo a él, pero sí es un punto de inicio importante para poder investigar y entender mejor la técnica del autor (o autores) de la obra.

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : Análisis químico de una obra de arte colonial en el Perú del siglo XVI con posible atribución a Bernardo Bitti

ÁREA : Ciencias analíticas

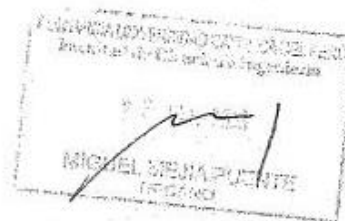
ASESORA : Dra. Patricia Elena Gonzales Gil

ALUMNO : Jhonatan Javier Arízaga Torres

CÓDIGO : 2011.1597.412

FECHA : 25 de junio de 2018

NUMERO : # 221



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

En esta investigación se realizará un estudio de la pintura sobre tabla "El Señor de la Caída" desde el punto de vista químico. Esta obra, propiedad de la iglesia San Pedro de Lima, podría ser del hermano Bernardo Bitti, quien fue un artista de gran importancia en el proceso de evangelización del Perú y países vecinos a finales del siglo XVI.

Si bien los análisis químicos por sí solos no permiten confirmar la autoría de una obra, los resultados que se obtengan y la posterior discusión con los profesionales de otras especialidades (conservadores, restauradores, historiadores del arte, entre otros) pueden enriquecer la información que se tiene sobre esta pintura y contribuir a la puesta en valor de la misma. Adicionalmente, este tipo de estudios es importante para la toma de decisiones sobre una obra en cuanto a su conservación y restauración.

Por la naturaleza del objeto en estudio, los análisis que se realicen deben evitar causar daños a la misma, por lo que se prefiere utilizar métodos no invasivos o, de ser necesaria la toma de muestras, microdestructivos.

El objetivo de este trabajo es caracterizar a nivel químico los materiales que se utilizaron en la obra ya mencionada para luego interpretar los resultados en el contexto histórico de la misma. Para ello, se emplearán diversas analíticas que permitirán la identificación de los pigmentos, aglutinantes y barnices presentes en la obra. Se espera que este trabajo contribuya a incrementar el conocimiento sobre los materiales y las técnicas utilizadas por los pintores en el Perú virreinal y a facilitar las labores de restauración y conservación de la obra en estudio.

Máximo : 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR: 

FIRMA DEL COORDINADOR: 



ÍNDICE GENERAL

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. | OBJETIVOS | 3 |
| 3. | MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1 | CONTEXTO HISTÓRICO | 4 |
| 3.2 | ESTUDIOS PREVIOS DE LA OBRA DE BITTI | 5 |
| 3.3 | DESCRIPCIÓN DE LA OBRA EN ESTUDIO: “EL SEÑOR DE LA CAÍDA” | 6 |
| 3.4 | MATERIALES USADOS EN UNA PINTURA SOBRE TABLA | 10 |
| 3.4.1 | <i>La madera y la capa de preparación</i> | 12 |
| 3.4.2 | <i>Las imprimaciones, pigmentos y barnices</i> | 13 |
| 3.4.3 | <i>Degradación debido a jabones de plomo</i> | 14 |
| 3.5 | TÉCNICAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA INTERACCIÓN ENTRE LA MATERIA Y LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA | 14 |
| 3.5.1 | <i>Fotografía de luz ultravioleta (UV)</i> | 17 |
| 3.5.2 | <i>Fotografía de reflectancia de luz infrarroja (IR)</i> | 18 |
| 3.5.3 | <i>Espectroscopía Raman</i> | 20 |
| 3.5.4 | <i>Espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)</i> | 21 |
| 3.5.5 | <i>Radiografías por transmisión</i> | 22 |
| 3.5.6 | <i>Microscopía óptica</i> | 23 |
| 3.5.7 | <i>Microscopía electrónica de barrido</i> | 24 |
| 3.6 | OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE OBRAS DE ARTE | 25 |
| 3.6.1 | <i>Espectrometría de masas mediante ionización MALDI y analizador de masas Orbitrap (MALDI-MS)</i> | 26 |
| 3.6.2 | <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)</i> | 27 |
| 3.6.2.1 | <i>Estudio de aceites</i> | 27 |
| 3.6.2.2 | <i>Identificación de barnices</i> | 28 |
| 3.6.3 | <i>Identificación de material proteico mediante tinción con Ponceau S</i> | 29 |
| 4. | PARTE EXPERIMENTAL | 30 |
| 4.1 | MATERIALES Y REACTIVOS | 30 |
| 4.2 | INSTRUMENTOS Y EQUIPOS | 31 |
| 4.3 | METODOLOGÍA | 32 |
| 4.3.1 | <i>Análisis preliminares por fluorescencia por luz ultravioleta</i> | 32 |
| 4.3.2 | <i>Examinación de la obra por radiografías de transmisión</i> | 32 |
| 4.3.3 | <i>Análisis in situ mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)</i> | 33 |
| 4.3.4 | <i>Análisis in situ por espectroscopía Raman</i> | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.3.5 | <i>Análisis in situ de la obra por reflectancia infrarroja</i> | 33 |
| 4.3.6 | <i>Toma de micromuestras por parte del Taller de Conservación y Restauración de la Iglesia San Pedro de Lima</i> | 36 |
| 4.3.7 | <i>Examinación de micromuestras por microscopía óptica</i> | 37 |
| 4.3.8 | <i>Montaje de micromuestras en resina</i> | 37 |
| 4.3.9 | <i>Análisis de micromuestras mediante microscopía óptica y fluorescencia ultravioleta</i> | 38 |
| 4.3.10 | <i>Análisis de micromuestras por microespectroscopía Raman</i> | 38 |
| 4.3.11 | <i>Análisis de micromuestras mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (SEM/EDS)</i> | 39 |
| 4.3.12 | <i>Análisis de micromuestras mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)</i> | 39 |
| 4.3.12.1 | <i>Derivatización de muestras para análisis de barnices</i> | 39 |
| 4.3.12.2 | <i>Derivatización de ácidos grasos para validación del método analítico</i> | 40 |
| 4.3.12.3 | <i>Derivatización de muestras de pintura</i> | 41 |
| 4.3.12.4 | <i>Análisis cromatográfico de las muestras derivatizadas</i> | 42 |
| 4.3.13 | <i>Identificación de colorantes orgánicos mediante espectrometría de masas por ionización/desorción asistida por matriz (MALDI-MS)</i> | 43 |
| 4.3.14 | <i>Identificación de material proteico en micromuestras mediante tinciones</i> | 45 |
| 5. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 5.1 | ESTUDIO INICIAL DE LA OBRA SIN OBTENCIÓN DE MICROMUESTRAS | 46 |
| 5.1.1 | <i>Estudio in situ por fluorescencia ultravioleta y reflectancia infrarroja</i> | 46 |
| 5.1.2 | <i>Estudio de la obra mediante radiografías</i> | 49 |
| 5.1.3 | <i>Estudio in situ por espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)</i> | 49 |
| 5.1.4 | <i>Análisis in situ usando microespectroscopía Raman</i> | 56 |
| 5.2 | ANÁLISIS DE MICROMUESTRAS OBTENIDAS | 58 |
| 5.2.1 | <i>Análisis de micromuestras por SEM-EDS</i> | 63 |
| 5.2.2 | <i>Identificación de materiales por espectroscopía Raman</i> | 68 |
| 5.2.3 | <i>Identificación de barnices y aglutinantes lipídicos por GC-MS</i> | 69 |
| 5.2.3.1 | <i>Análisis de barnices</i> | 69 |
| 5.2.3.2 | <i>Análisis de aceites</i> | 72 |
| 5.2.4 | <i>Identificación de pigmentos orgánicos por MALDI-MS</i> | 74 |
| 5.2.5 | <i>Evaluación de material proteico mediante tinción con Ponceau S</i> | 83 |
| 6. | CONCLUSIONES | 84 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 85 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. DOS OBRAS CON ATRIBUCIÓN A BERNARDO BITTI..... | 5 |
| FIGURA 2. FOTOGRAFÍA DE LA OBRA “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”..... | 6 |
| FIGURA 3. DIVISIÓN DE LOS PERSONAJES POR SECCIONES EN LA OBRA “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”..... | 8 |
| FIGURA 4. VISTA DEL REVERSO DE LA OBRA “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”..... | 10 |
| FIGURA 5. ESQUEMA DE LA DISPOSICIÓN DE CAPAS EN UNA PINTURA SOBRE TABLA. | 11 |
| FIGURA 6. ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO Y SU INTERACCIÓN CON LA MATERIA..... | 16 |
| FIGURA 7. ESQUEMA DE PENETRACIÓN APROXIMADA DE LA LUZ SOBRE LAS CAPAS DE UNA PINTURA A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA. | 16 |
| FIGURA 8. PROCESOS DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA Y RELAJACIÓN, LOS CUALES DAN ORIGEN AL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA MOLECULAR..... | 18 |
| FIGURA 9. APLICACIÓN DE LA FOTOGRAFÍA EN EL INFRARROJO CERCANO PARA OBTENER INFORMACIÓN SOBRE LOS TRAZOS EN UN DIBUJO SOBRE PAPEL..... | 19 |
| FIGURA 10. ESQUEMA DE LOS PROCESOS ELECTRÓNICOS QUE DAN ORIGEN A LAS DISPERSIONES DE RAYLEIGH Y RAMAN..... | 20 |
| FIGURA 11. TRANSICIONES ELECTRÓNICAS QUE DAN ORIGEN A LAS SEÑALES OBSERVADAS EN UN ESPECTRO FRX..... | 22 |
| FIGURA 12. DESCUBRIMIENTO DE UN ROSTRO OCULTO EN LA OBRA “GRASGROND”, DE VAN GOGH. | 23 |
| FIGURA 13. DIFERENTES EFECTOS QUE GENERAN LOS ELECTRONES INCIDENTES SOBRE UNA MUESTRA. | 24 |
| FIGURA 14. ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN UNA RESINA DE PINO DEBIDO A PROCESOS DE OXIDACIÓN Y CALENTAMIENTO DURANTE EL TRATAMIENTO DE LA MISMA..... | 29 |
| FIGURA 15. EQUIPO DE RADIOGRAFÍAS CON EL QUE SE ANALIZÓ LA OBRA..... | 32 |
| FIGURA 16. TODOS LOS PUNTOS DE ANÁLISIS POR FRX REALIZADOS A LA OBRA DE ARTE. | 34 |
| FIGURA 17. PUNTOS DE TOMA DE MICROMUESTRAS. | 36 |
| FIGURA 18. DETALLE DEL PATRÓN DE VAPORIZACIÓN EN ESPIRAL PROGRAMADO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS POR MALDI-MS. | 45 |
| FIGURA 19. IMAGEN DE FLUORESCENCIA ULTRAVIOLETA DE LA OBRA “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”..... | 46 |
| FIGURA 20. FOTOGRAFÍA POR REFLECTANCIA INFRARROJA Y POR LUZ VISIBLE DE LOS PERSONAJES P9 Y P4..... | 47 |
| FIGURA 21. COMPARACIÓN ENTRE LA FOTOGRAFÍA DE LUZ VISIBLE Y DE REFLECTANCIA INFRARROJA DEL MADERO CERCA AL PERSONAJE P5..... | 48 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 22. RADIOGRAFÍA DE LA ZONA SUPERIOR IZQUIERDA DE LA OBRA. | 50 |
| FIGURA 23. EJEMPLO DE PROCESAMIENTO EN FALSO COLOR DE LAS RADIOGRAFÍAS. | 51 |
| FIGURA 24. ESPECTROS DE FRX DE DIFERENTES PUNTOS DE LA OBRA. | 53 |
| FIGURA 25. ESPECTROS RAMAN OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS <i>IN SITU</i> | 57 |
| FIGURA 26. FOTOGRAFÍAS DE LAS MICROMUESTRAS MONTADAS EN RESINA, OBSERVADAS CON EL MICROSCOPIO ÓPTICO. | 58 |
| FIGURA 27. FOTOGRAFÍAS DE LA MICROMUESTRA SC4 VISTA AL MICROSCOPIO ÓPTICO, CON VARIAS FUENTES DE EXCITACIÓN. | 62 |
| FIGURA 28. MICROFOTOGRAFÍAS CON LUZ VISIBLE Y ULTRAVIOLETA DE LA MUESTRA SC11. | 64 |
| FIGURA 29. IMAGEN SEM DE LA MICROMUESTRA SC14 CON LOS PUNTOS ANALIZADOS POR EDS. | 64 |
| FIGURA 30. ESPECTROS EDS DE LOS PUNTOS 2 Y 8 DE LA MICROMUESTRA SC14. | 65 |
| FIGURA 31. IMAGEN SEM DE UNA SECCIÓN DE LA MICROMUESTRA SC16. | 66 |
| FIGURA 32. ESPECTROS EDS DE LOS PUNTOS 4 Y 5 DE LA MICROMUESTRA SC16. | 66 |
| FIGURA 33. MAPEO ELEMENTAL DE LA MICROMUESTRA SC6. | 67 |
| FIGURA 34. ESPECTRO RAMAN DE UNA ZONA AMARILLA DE LA MICROMUESTRA SC6. | 68 |
| FIGURA 35. CROMATOGRAMAS DE LAS RESINAS ESTUDIADAS COMO REFERENCIA, USANDO EL MODO SCAN DEL EQUIPO. | 70 |
| FIGURA 36. CROMATOGRAMAS DEL ANÁLISIS DE RESINAS EN LAS MICROMUESTRAS DE LOS PUNTOS M4, M6 Y M16. | 72 |
| FIGURA 37. CURVAS DE CALIBRACIÓN OBTENIDAS PARA LA VERIFICACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO. | 73 |
| FIGURA 38. AMPLIACIÓN DEL MAPA DE IONES OBSERVADO EN LA MUESTRA DE ÁCIDO CARMÍNICO. | 76 |
| FIGURA 39. COMPARACIÓN ENTRE EL PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN OBSERVADO EN UN ESPECTRO DE MASAS DE TÁNDEM EN UNA BASE DE DATOS Y EL ESPECTRO DE MASAS OBTENIDO EXPERIMENTALMENTE. | 77 |
| FIGURA 40. ESTRUCTURAS DEL ÁCIDO CARMÍNICO Y KERMÉSICO. | 77 |
| FIGURA 41. ESPECTRO DE MASAS AMPLIADO (ION $m/z = 329,02948$) DE LA MUESTRA DE ÁCIDO CARMÍNICO EN METANOL. | 79 |
| FIGURA 42. ESPECTRO DE MASAS AMPLIADO (ION $m/z = 491,08292$) DE LA MUESTRA DE ÁCIDO CARMÍNICO EN METANOL. | 80 |
| FIGURA 43. ESPECTRO DE MASAS AMPLIADO (ION $m/z = 329,03001$) DE LA MICROMUESTRA M12 EN METANOL. | 81 |

FIGURA 44. ESPECTRO DE MASAS AMPLIADO (ION $m/z=491,08420$) DE LA MICROMUESTRA M12 EN METANOL..... 82

FIGURA 45. TINCIÓN CON PONCEAU S DE LAS MICROMUESTRAS M16 Y M2..... 83



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. FICHA DE REGISTRO DE LA OBRA EN ESTUDIO EN EL CATÁLOGO DEL PATRIMONIO CULTURAL DE LA NACIÓN..... | 7 |
| TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LOS PERSONAJES QUE APARECEN EN LA OBRA. | 9 |
| TABLA 3. ORGANIZACIÓN DE LAS CAPAS EN UNA PINTURA. | 11 |
| TABLA 4. PIGMENTOS ESPERADOS EN UNA OBRA DEL PERIODO VIRREINAL EN EL SIGLO XVI. | 14 |
| TABLA 5. VALORES DE LA RELACIÓN P/S REPORTADOS EN LA LITERATURA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AGLUTINANTES LIPÍDICOS. | 28 |
| TABLA 6. MATERIALES USADOS EN EL PRESENTE TRABAJO..... | 30 |
| TABLA 7. REACTIVOS Y SOLVENTES UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN. | 30 |
| TABLA 8. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS USADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN. | 31 |
| TABLA 9. PUNTOS ANALIZADOS POR ESPECTROMETRÍA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X Y ESPECTROSCOPÍA RAMAN. | 35 |
| TABLA 10. MICROMUESTRAS OBTENIDAS DE LA OBRA “EL SEÑOR DE LA CAÍDA”. | 37 |
| TABLA 11. MASAS DE ÁCIDOS GRASOS USADOS PARA LA GENERACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO EMPLEADO | 41 |
| TABLA 12. PARÁMETROS DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS CUALITATIVO DE RESINAS. | 42 |
| TABLA 13. PARÁMETROS DE LAS CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN MUESTRAS REALES. | 43 |
| TABLA 14. PARÁMETROS DEFINIDOS EN EL PROGRAMA DE CONTROL DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS THERMO FISHER Q EXACTIVE HF..... | 44 |
| TABLA 15. ZONAS QUE PODRÍAN TENER ALGÚN REPINTE EN BASE A LOS ELEMENTOS ENCONTRADOS POR FRX Y LA FECHA DE USO REPORTADA EN LA LITERATURA | 52 |
| TABLA 16. PIGMENTOS Y MATERIALES ORIGINALES PROPUESTOS EN BASE A LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR FRX..... | 56 |
| TABLA 17. PIGMENTOS CONFIRMADOS CON EL ANÁLISIS RAMAN PORTÁTIL (<i>IN SITU</i>). | 57 |
| TABLA 18. PRINCIPALES COMPONENTES ENCONTRADOS EN LAS MICROMUESTRAS ANALIZADAS..... | 69 |
| TABLA 19. IONES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE RESINAS | 71 |
| TABLA 20. RESINAS IDENTIFICADAS EN LAS MICROMUESTRAS ESTUDIADAS DE LA OBRA EL SEÑOR DE LA CAÍDA..... | 71 |
| TABLA 21. IONES CARACTERÍSTICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTUDIADOS..... | 73 |

| | |
|--|----|
| TABLA 22. VERIFICACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO USADO PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS. | 74 |
| TABLA 23. VALORES PROMEDIO DE LA RELACIÓN DE ÁCIDOS PALMÍTICO/ESTEÁRICO EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS. | 74 |
| TABLA 24. IONES IDENTIFICADOS MEDIANTE MALDI-MS EN UNA MUESTRA DE ÁCIDO CARMÍNICO CON 9-AMINOACRIDINA. | 75 |



ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| AGC | Control de ganancia automática (<i>automatic gain control</i>) |
| AP/MALDI | Ionización/desorción por láser asistido por una matriz a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization</i>) |
| BSE | Electrones retrodispersados (<i>back-scattered electrons</i>) |
| CPS | Cuentas por segundo |
| EDS | Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>) |
| FRX | Fluorescencia de rayos X |
| GC-MS | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (<i>gas chromatography – mass spectrometry</i>) |
| IR | Infrarrojo |
| IT | Tiempo de inyección (<i>injection time</i>) |
| mAs | Mili Amper segundo |
| MS | Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>) |
| NCE | Energía normalizada de colisión (<i>normalized collision energy</i>) |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido (<i>scanning electron microscopy</i>) |
| S/N | Relación señal/ruido (<i>signal/noise ratio</i>) |
| TFA | Ácido trifluoroacético (<i>trifluoroacetic acid</i>) |
| UV | Ultravioleta |
| μA | Micro amperios |
| WD | Distancia de trabajo (<i>working distance</i>) |

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país tiene la peculiaridad de ser un lugar de gran riqueza cultural e histórica, pero, paradójicamente, no siempre se cuidan, estudian y valoran nuestras obras artísticas. El estudio de una obra de arte es un proceso complejo que abarca diversos campos profesionales. El aporte de la química a estos estudios es de gran importancia, puesto que permite la caracterización de los materiales presentes en ella. De esta forma, los materiales permiten contestar algunas preguntas sobre la originalidad de la obra, su estado de conservación, el contexto histórico en el que fue creada, la paleta y técnicas del autor, entre otras. La discusión de los resultados de los análisis químicos con los profesionales de otras especialidades (conservadores, restauradores, historiadores del arte, entre otros) puede enriquecer la información que se tiene sobre una obra y, además, es importante para la toma de decisiones sobre ella en cuanto a su conservación y restauración.

En este trabajo se estudió una pintura sobre tabla que se encuentra en la Iglesia San Pedro de Lima, la cual ha sido catalogada como “El Señor de la Caída” en el registro de Patrimonio Cultural de la Nación. Se desconoce la ubicación original de esta obra; sin embargo, a inicios de esta investigación se encontró en la oficina del párroco de la Iglesia San Pedro de Lima, y es posible que haya sido reubicada múltiples veces a lo largo de la historia. Esta pintura no presenta ninguna firma, pero podría formar parte de la obra del pintor italiano Bernardo Bitti. Esta propuesta se basa en la información presentada por Estabridis, quien afirma lo siguiente:

Existe un documento de 1589 que cita 26 tablas de los misterios de la vida de Cristo que rodeaban el interior del templo. Ello nos da la pauta para detenernos en una tabla con el tema pasionario: *Cristo camino al Calvario se encuentra con su madre*, obra en proceso de restauración en los talleres de San Pedro. El tratamiento compositivo permite relacionarla con una pintura similar que ubicáramos años atrás en la colección del Banco Central de Reserva de Arequipa, en ambas la figura de Jesús es la que más se acerca al pincel del maestro italiano, mientras que el resto de la escena denota intervención de colaboradores. Creemos que estas dos pinturas, así como *La Oración en el Huerto* que conserva el Museo de Arte de Lima, ponen de manifiesto el uso temprano del grabado manierista de Amberes en el taller de Bitti. (Estabridis 1996: p.19).^[1]

En el caso de la obra “El Señor de la Caída” existe una diferencia apreciable en el estilo de los personajes, lo que podría sugerir que fue ejecutada por más de un artista. La ejecución de obras atribuidas a Bitti por parte de colaboradores ha sido propuesta también por otros autores.^[2,3] Toda esta información generó un gran interés por el estudio de esta obra. El presente trabajo abordó el estudio de dicha pintura desde el punto de vista químico. No se han realizado muchas investigaciones de esta índole en el Perú y la caracterización de los diversos materiales presentes en la obra puede sentar las bases de futuros trabajos en el campo de la conservación y restauración de patrimonio cultural peruano.



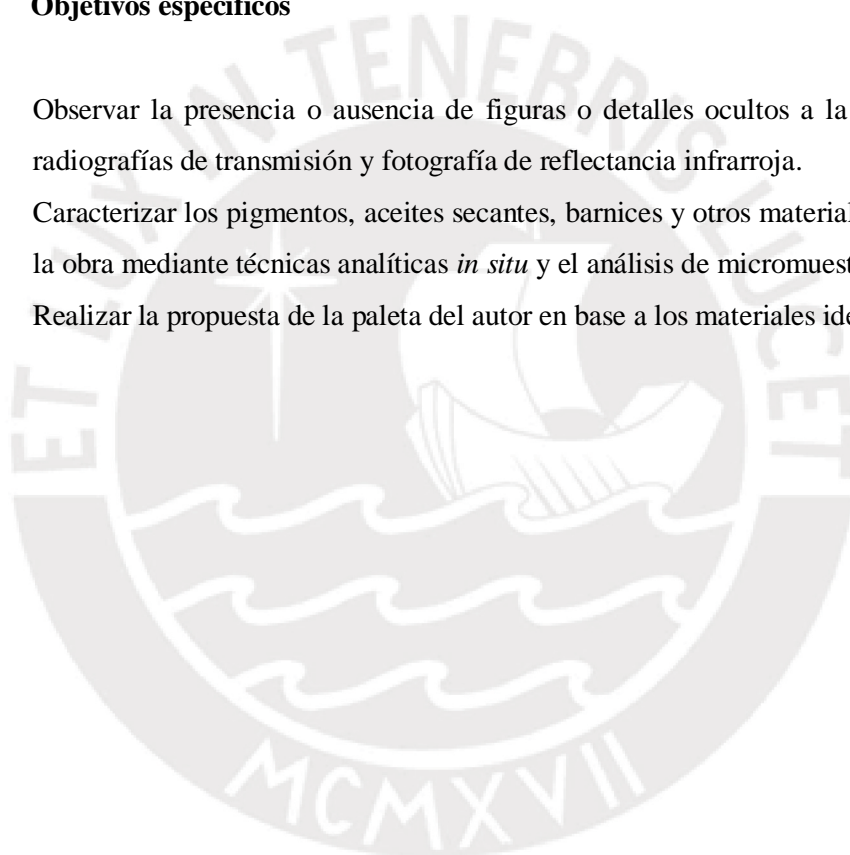
2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Caracterizar los materiales usados en la pintura sobre tabla “El Señor de la Caída” mediante diversas técnicas analíticas (tanto *in situ* como *ex situ* mediante el estudio de micromuestras) con la misión de encontrar más información sobre la paleta y técnicas del autor.

2.2 Objetivos específicos

- Observar la presencia o ausencia de figuras o detalles ocultos a la vista mediante radiografías de transmisión y fotografía de reflectancia infrarroja.
- Caracterizar los pigmentos, aceites secantes, barnices y otros materiales presentes en la obra mediante técnicas analíticas *in situ* y el análisis de micromuestras de la obra.
- Realizar la propuesta de la paleta del autor en base a los materiales identificados.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Contexto histórico

Bernardo Luis Demócrito Bitti fue un pintor italiano nacido en Camerino (provincia italiana de las Marcas), en 1548. En la Italia de dicho tiempo ya había surgido el Renacimiento y, con él, un gran desarrollo de técnicas artísticas, caracterizadas por un enfoque naturalista. Sin embargo, surgió también un movimiento conocido como el *manierismo*, el cual se basaba en ir en contra de las reglas establecidas por el clasicismo para buscar “gracia y belleza” en la figura. No se dispone de mucha información sobre la formación artística de Bitti, pero se sabe que viajó a Roma, posiblemente para perfeccionar su arte.^[4] De esta forma, se cree que conoció la obra de maestros renacentistas y se empapó de la tercera generación del manierismo.^[4,5] En 1568, Bitti ingresó a la Compañía de Jesús en Roma (orden de los jesuitas). Ese mismo año, los jesuitas en Lima solicitaron al Padre General Everardo Mercuriano – el máximo jefe de la orden- el envío de un pintor que ayudara a la obra evangelizadora de los indígenas en el territorio virreinal. En 1573, Bernardo Bitti fue destinado a viajar al Perú y llegó a nuestro país en 1575.^[5]

Los estudiosos de las obras virreinales latinoamericanas, entre los que destacan Martín Soria, José de Meza y Teresa Gisbert, han analizado varias de las obras que son hoy atribuidas a Bernardo Bitti. Este pintor tuvo una importancia enorme en el contexto histórico virreinal del siglo XVI en el Perú, no sólo por su extensa labor evangelizadora sino por su valor artístico, ya que se desempeñó como pintor, escultor y retablista.^[5] Se considera que, junto con Angelino Medoro y Mateo Pérez de Alessio, fue una figura clave para la introducción del modelo pictórico manierista en el Perú.^[6] Bitti es el autor de auténticas obras maestras que se conservan en Lima, como *la Coronación de la Virgen* y *la Virgen de la Purificación (La Candelaria)*, que se encuentran en la iglesia San Pedro de Lima. Se desconoce si firmaba sus obras, a pesar de que existen indicios de firmas atribuidas a jesuitas con el símbolo “IHS”.^[5]

En la Figura 1 se muestran dos obras con atribución a Bitti que fueron exhibidas en el 2016 en el Museo de Arte de Lima durante la exposición “Pintura cuzqueña”: “La Oración en el Huerto” y “Virgen con el Niño”. Algunas características principales de sus obras incluyen, en palabras de Franz Grupp y Zully Mercado (2010): “...brillante colorido, acartonados drapeados en las vestiduras, fondos de aspecto irreal, altas, delgadas, cimbreantes y luminosas figuras humanas y, sobre todo, una serena y conmovedora dulzura en los rostros de vírgenes, cristos y santos representados”.^[3]



Figura 1. Dos obras con atribución a Bernardo Bitti. Izquierda: “La oración en el huerto”; derecha: “Virgen con el Niño”. [Fotografía: Jhonatan Arízaga. Exposición “Pintura cuzqueña” en el Museo de Arte de Lima. Diciembre, 2016].

3.2 Estudios previos de la obra de Bitti

Una obra atribuida a Bitti, la “Madona del Pajarito”, es una pintura sobre tabla que se encuentra actualmente en la catedral de Cuzco, la cual sufrió graves daños en un incendio al poco tiempo de haber sido terminada, pero pudo recibir restauraciones sucesivas y se conserva hasta el día de hoy.^[2] En el reporte del análisis de dicha pintura previa a su restauración se mencionó que fue creada entre 1580 y 1582 en el Cuzco. Fue pintada sobre madera de cedro americano (el cual se puede encontrar en una gran parte de Latinoamérica, incluyendo el Perú), utilizando una técnica de “témpera de huevo y pigmentos” sobre una base de yeso (sulfato de calcio). Si se sabe que Bitti utilizó esta técnica y materiales puede ser un punto de referencia importante para analizar la obra en el presente estudio, el cual está centrado en una pintura sobre tabla de atribución dudosa, llamada “Señor de la Caída”. La fotografía de esta obra se encuentra en la Figura 2.



Figura 2. “El Señor de La Caída”. [*Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro*].

3.3 Descripción de la obra en estudio: “El Señor de la Caída”

La obra de arte en cuestión corresponde a una pintura sobre una tabla de madera. El tema de la obra es la caída de Cristo al cargar la cruz y la consecuente ayuda de Simón de Cirene. Los datos disponibles de esta obra en el registro del Patrimonio Cultural de la Nación se muestran

en la Tabla 1. La obra cuenta con ocho personajes, los cuales parecen no haber sido creados con el mismo estilo artístico. Estos fueron identificados según la numeración mostradas en la Figura 3, cuyas descripciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Ficha de registro de la obra en estudio en el catálogo del Patrimonio Cultural de la Nación.

| | | |
|--------------------------------|-------------------------|--|
| Datos de Identificación | TIPO DE BIEN | Pintura |
| | NOMBRE | “El señor de la Caída” |
| | AUTOR | Anónimo |
| | FIRMA / ATRIBUCIÓN | Ninguno |
| | ESTILO | Barroco |
| | ESCUELA/PROCEDENCIA | Lima |
| | FECHA/ÉPOCA | Siglo XVIII |
| Datos técnicos | MATERIAL | Tela |
| | TÉCNICA DE MANUFACTURA | Óleo |
| | TÉCNICA DE DECORACIÓN | No presenta |
| | TÉCNICA DE ACABADO | Barnizado |
| | DESCRIPCIÓN | Escena de la Pasión en la cual Cristo cae al suelo cargando la cruz. Viste túnica rosada. A la derecha se encuentra la Virgen Dolorosa, quien le observa con las manos implorantes. Dos hombres aparecen en segundo plano, uno sosteniendo una pica y el otro ayudando a Cristo con el madero crucifijional. Al fondo se hallan tres personajes dolorosos más y parte de un arbusto. |
| | DIMENSIONES DEL BIEN | Alto: 152,5 cm. Ancho: 117 cm. |
| | ESTADO DE CONSERVACIÓN | Bueno |
| | ESTADO DE INTEGRIDAD | Completo |
| | DETALLE DE CONSERVACIÓN | Suciedad |
| TRATAMIENTO | Obra restaurada | |

Es importante resaltar que el tipo de material reportado en la ficha técnica es incorrecto, puesto que esta se trata en realidad de una pintura sobre tabla y no un lienzo. De forma adicional, según lo reportado por los encargados del Taller de Conservación y Restauración de San Pedro de Lima, esta obra tendría un estilo manierista y podría haber sido realizada en el siglo XVI, lo cual discrepa con el estilo y la época de creación estipulada en la ficha técnica.



Figura 3. División de los personajes por secciones en la obra “El Señor de la Caída”. Los personajes de la sección 7 son (de izquierda a derecha): 7A, 7B y 7C. [*Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro*].

Tabla 2. Descripción de los personajes que aparecen en la obra.

| Personaje | DESCRIPCIÓN |
|-------------------|--|
| P1 | Personaje con un turbante verde, cuyo rostro no se aprecia por completo (está tapado por lo que aparenta ser una túnica marrón). |
| P2 | Aparentemente se trata de una pierna cuyo cuerpo no se aprecia en la obra (o si se tratase del personaje de la sección 1, se vería bastante forzada por la forma cómo ha sido plasmada). Este es uno de los motivos por los que se sospecha que la obra era originalmente más grande, pero que fue posteriormente cortada. |
| P3 | Personaje con un cayado. A diferencia de los otros personajes, no cuenta con la cara alargada ni excesivamente pálida. Probablemente se trate de uno de los acompañantes de Jesucristo en el camino al Gólgota. |
| P4 | Jesucristo cargando la cruz, siendo ayudado por otro personaje. Se observa que se encuentra mirando a la mujer de la sección 6. |
| P5 | Personaje que ayuda a Cristo a llevar la cruz. Lo más probable es que se tratara de Simón de Cirene. |
| P6 | Personaje femenino con las manos cruzadas. Probablemente se trate de la Virgen Dolorosa, quien acompañaba a Cristo en camino al Gólgota. Se observa que mira al personaje de la sección 5 con actitud suplicante. Una vista más cercana muestra lágrimas en su rostro. |
| P7, P8, P9 | Tres personajes con un semblante triste (de izquierda a derecha: P7, P8 y P9). Se tratarían de otros acompañantes de esta escena. |

Tal como se observa en la Figura 3, los personajes P1 y P2 se encuentran aparentemente incompletos. Por otro lado, existen algunas diferencias entre el personaje P3 y los del P4 al P9, por lo que se consideró la posibilidad de que varios artistas hayan participado en la creación de esta obra. También es posible que algunos personajes sean una adición posterior a la pintura original.

La inspección visual inicial del reverso del cuadro (Figura 4) mostró que se trataba en realidad de dos piezas de madera unidas por unos listones y juntas (también de madera). En parte de estas piezas se observaron trozos de tela, grapas y algunos agujeros circulares. Por la forma cómo se encuentra cortada la tabla y la aparente remoción de personajes en el cuadro, es posible que esta obra haya sido parte de una obra de mayores dimensiones. No se dispuso de mayor información sobre el estado original de la obra (más allá de que se indica alguna restauración previa en la ficha técnica), por lo que no se pudo confirmar este hecho.

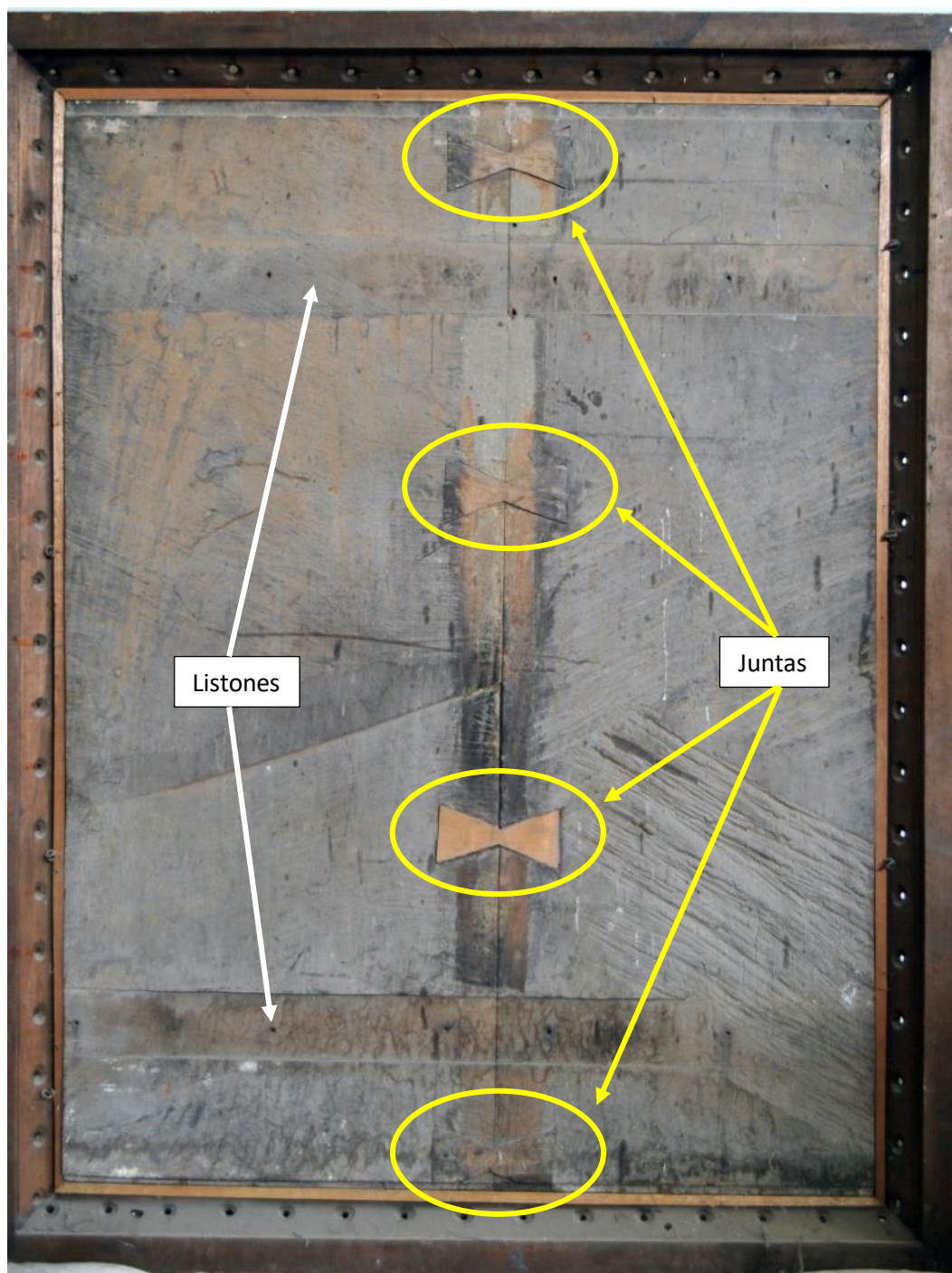


Figura 4. Vista del reverso de la obra “El Señor de la Caída”. [Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro].

3.4 Materiales usados en una pintura sobre tabla

Una pintura está constituida por una serie de materiales dispuestos en capas, unas sobre otras. Se debe tomar en cuenta que estas son aplicadas de forma secuencial, por lo que las que se encuentren en la zona interna serán más antiguas, y las que se encuentren en la zona más

externa serán más recientes. La organización general de estas capas se encuentra descrita en la Tabla 3, y un esquema se muestra en la Figura 5. ^[7]

Tabla 3. Organización de las capas en una pintura.

| CAPA | DESCRIPCIÓN |
|----------------------------------|--|
| El barniz o capa protectora | Es un material que cubre las capas pictóricas. Puede ser usado para protegerlas del medio ambiente, así como para darles diferentes efectos visuales. ^[8] Al ser la capa más externa, suele sufrir transformaciones por reacciones químicas con la atmósfera, evidenciadas, por ejemplo, por cambios de color. |
| La(s) capa(s) pictórica(s) | Constituidas por los pigmentos coloreados, dispersos en un aglutinante. ^[9] |
| La capa de imprimación | Es una capa de material que es usado generalmente para darle un cierto tono de color o acabado a la obra. ^[10-12] |
| La capa de preparación o aparejo | Es un material que se coloca directamente sobre el soporte, de tal forma que se obtenga una superficie uniforme sobre la cual soportar la(s) capa(s) pictórica(s). En el caso de una pintura sobre tabla se solía usar yeso con una cola animal. ^[10] |
| La capa de soporte | Es el material sobre el cual se realiza la obra. Este puede ser madera, papel, tela, cuero, entre otros. La madera tiene la particularidad de ser sensible a las condiciones ambientales en las que se encuentra (como la humedad, la temperatura) así como a la invasión de otros organismos (como insectos xilófagos u hongos), y está sujeta a procesos de degradación con el paso del tiempo. ^[13,14] |

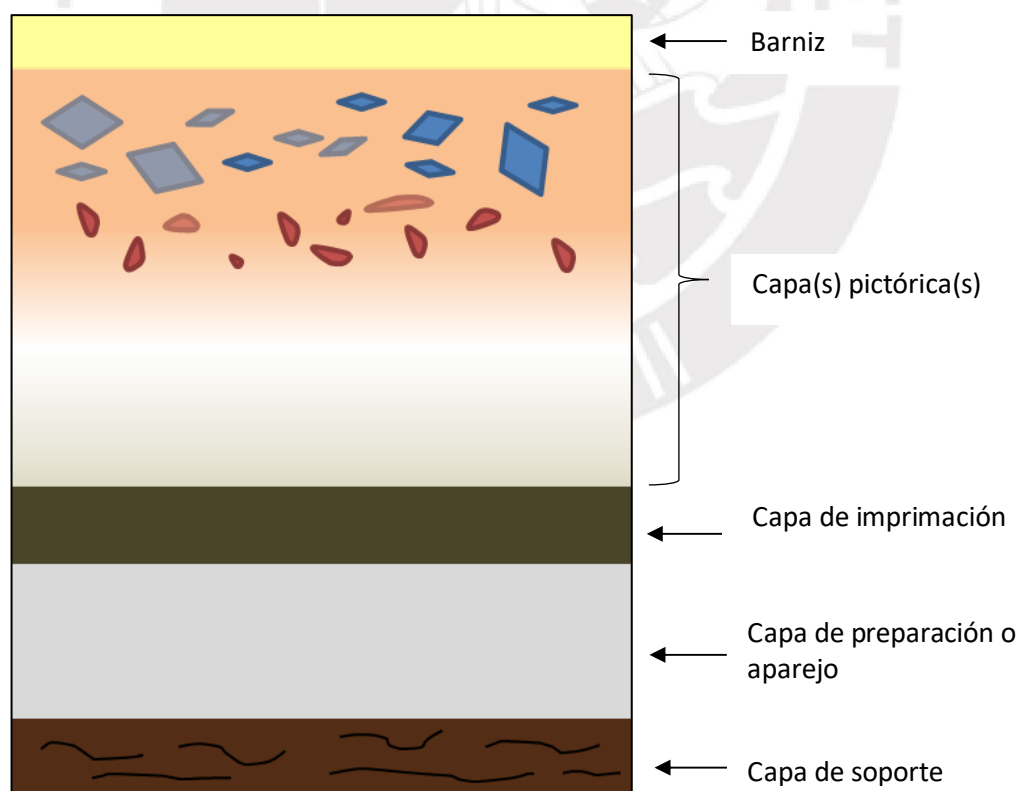


Figura 5. Esquema general de la disposición de capas en una pintura sobre tabla.

Cada capa no contiene un único compuesto, sino que es una mezcla compleja de diversos materiales. Es posible indagar acerca de la técnica del artista (como el uso preferente de ciertos materiales para el aparejo, el grosor de las capas pictóricas, o los aglutinantes utilizados) y la época en la que fue realizada la obra (cada material ha sido usado en épocas específicas de la humanidad, algunas desde la antigüedad y otras desde hace menos de un siglo) a partir de los análisis químicos de los diversos compuestos presentes en las muestras analizadas.

Durante los primeros años del virreinato español en América del Sur en el siglo XVI los artistas usaron técnicas y materiales propias de las escuelas renacentistas (y en el caso de Bitti, el estilo manierista), y no fue hasta la segunda mitad del siglo XVII que comenzaron a observarse cambios en los materiales y estilos de las obras, propias del periodo barroco.^[6,15] A continuación se detallarán varios materiales comunes en el siglo XVI y que podrían encontrarse en la obra “El Señor de la Caída”.

3.4.1 La madera y la capa de preparación

La madera es un soporte vegetal con características variables en función a la especie de árbol. Este material es susceptible a la degradación por ataques de insectos xilófagos, hongos y otros parásitos que pueden habitar en ella, así como la expansión, contracción y doblez por acción de la humedad, la temperatura y la fuerza que se le aplique. Por este factor, es usual agregar unas tiras de madera de encaje como refuerzo de la tabla, de tal manera que esta no cambie su forma, tal como se vio en la Figura 4.

Se pueden tener maderas con una mayor o menor dureza, flexibilidad, resistencia a la humedad, entre otras propiedades deseables. Debido a que la madera es voluminosa y puede llegar a ser difícil de transportar, es posible que los artistas eligieran un ejemplar nativo a su lugar de trabajo. Se ha reportado que las maderas preferidas por los artistas latinoamericanos fueron el cedro de Nicaragua y Panamá, y el roble de Guayaquil.^[15]

Debido a que la madera es una superficie porosa e irregular es necesario realizar un tratamiento inicial (conocido como preparación o aparejo, y como *ground* en inglés) para que la superficie sobre la cual se pinte sea uniforme y resistente. Según las fuentes consultadas, el material óptimo para el aparejo de tablas de madera y que fue ampliamente utilizado en el siglo XVI fue el yeso (sulfato de calcio hidratado) junto con una cola (material proteico con función de pegamento) proveniente de una fuente animal (obtenida tras hervir huesos, pieles o cartílagos).^[6,16] Para realizar el aparejo se seguían dos pasos principales: el primero consistía en cubrir la madera con una capa de cola animal (este procedimiento es conocido como

apresto, o *sizing* en inglés) para sellar los poros, sobre la cual se colocaba una capa de yeso con cola animal. El segundo paso consistía en lijar esta capa y dejarla completamente lisa.^[10]

3.4.2 Las imprimaciones, pigmentos y barnices

Una vez lista la capa de preparación, los artistas solían colocar una capa de imprimación. La imprimación cumplía una doble función: impermeabilizaba el aparejo y permitía la aplicación de una tonalidad base a toda la obra. Es posible que se aplicara ténpera en esta etapa, como fue evidenciado en el análisis de la obra “La Madona del Pajarito” mencionado previamente.^[2] En el siglo XVI era común que se usaran colores claros, pero a mediados de siglo se comenzaron a usar imprimaciones coloreadas a base de ocre. Para citar un ejemplo, Tiziano, un artista muy importante en Europa a inicios del siglo XVI, aplicó una capa de imprimación coloreada muy delgada y transparente en sus obras, lo cual le daba una tonalidad base sobre la cual ejecutar toda la pintura. Esta capa es conocida como *primuersel*, la cual era colocada por encima del aparejo.^[10,11,17]

Los pigmentos más utilizados de la época virreinal eran, en un inicio, provenientes de Europa, aunque también se utilizaron materiales locales (como es el caso de los ocre o la cochinilla).^[6,18] En la Tabla 4 se muestran algunos de los compuestos que se esperarían en una obra del siglo XVI.

Si bien es cierto que el tamaño de grano no es una característica constante ya que depende de la forma en la que fue preparado el pigmento, según la temperatura, el proceso de molienda o su obtención química, es importante para el efecto visual obtenido por el artista: un menor tamaño aumenta su opacidad y poder de recubrimiento,^[19] pero a su vez puede variar ligeramente el color observado del mismo. Este último punto es especialmente importante para los pigmentos azules o verdes, ya que pierden color al ser finamente molidos.^[20] Adicionalmente, el tamaño de grano se relaciona con la “porosidad” del pigmento; es decir, a menor tamaño de grano, el solvente o el aglutinante puede acomodarse mejor entre las partículas.^[9] Esta preparación de los pigmentos también fue importante para la ejecución por parte de cada artista, siendo parte de su técnica.

Finalmente, respecto a los barnices, en la época virreinal era común el uso de resinas de origen vegetal disueltas en aceites secantes.^[21] Las resinas fueron utilizadas con un doble propósito: proteger la obra de arte ante la degradación por el contacto con el ambiente y darle un acabado especial a gusto del autor. Las siguientes resinas eran encontradas habitualmente en las tiendas de materiales artísticos en Lima: ámbar, sandárica, almáciga, trementina (destilado de resinas de pino) y *menjuí* (bálsamo aromático de un árbol que crece en el continente asiático).^[15] Otros

materiales que podrían haber sido utilizadas en dicha época incluyen la resina colofonia, y recetas a base de gomas vegetales y huevo.^[8]

Tabla 4. Pigmentos esperados en una obra del periodo virreinal en el siglo XVI.^[6,22]

| COLOR | NOMBRE | COMPOSICIÓN QUÍMICA |
|----------|--|---|
| Blanco | Albayalde (blanco de plomo) | $2 \text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb(OH)}_2$ |
| Rojo | Bermellón | HgS |
| | Ocres o tierras rojas | Óxidos de hierro, aluminio, titanio, calcio y magnesio |
| | Laca roja | Colorantes orgánicos naturales |
| | Minio | $(\text{Pb}^{2+})_2\text{Pb}^{4+}\text{O}_4$ |
| Azul | Azurita | $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$ |
| | Esmalte | Iones de cobalto en una matriz de vidrio |
| | Índigo (colorante orgánico) | $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ |
| | Vivianita natural | $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{2+}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ |
| Verde | Malaquita | $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ |
| | Verdigris | $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ |
| | Tierra verde | Óxidos de hierro, aluminio, titanio, calcio y magnesio |
| Amarillo | Amarillo de plomo y estaño (tanto el tipo I como el tipo II) ^[23] | SnPb |
| | Oropimente | As_2S_3 |
| | Ocres o tierras amarillas | Óxidos de hierro, aluminio, titanio, calcio y magnesio |
| Negro | Carbón vegetal | C |
| | Negro de huesos | $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3 + \text{C}$ |

3.4.3 Degradación debido a jabones de plomo

Uno de los aspectos más problemáticos con respecto a la degradación de las pinturas corresponde a los jabones de metales pesados. Estos se producen por la reacción de un metal presente en grandes cantidades con ácidos grasos provenientes de los aglutinantes o de los barnices, lo cual da lugar a la formación de sales.^[24] Debido a que el uso de blanco de plomo era bastante común en las obras del siglo XVI, es posible encontrar jabones de plomo durante el análisis de la obra, lo cual suele evidenciarse por la deformación de las capas en las muestras obtenidas.

3.5 Técnicas analíticas basadas en la interacción entre la materia y la radiación electromagnética

Muchas de las técnicas analíticas disponibles para el análisis no destructivo de obras de arte se basan en la interacción entre la materia y la radiación electromagnética para obtener información acerca de los materiales que las componen. Entre dichas técnicas se tienen la

fotografía de fluorescencia de luz ultravioleta, la fotografía de reflectancia infrarroja, la espectroscopía Raman, la espectrometría de fluorescencia de rayos X, las radiografías por transmisión, la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido acoplada a un espectrómetro de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva. Por esta razón, a continuación se describirá cómo es la interacción entre la luz y la materia.

Según la mecánica clásica, la radiación electromagnética (luz) se trata de una perturbación oscilante en el campo magnético y eléctrico que se propaga en el vacío a una velocidad constante de aproximadamente 3×10^8 metros por segundo (c). La luz también se puede entender como una colección de paquetes discretos de energía llamados fotones, los cuales son descritos por la Ecuación 1 en función a su frecuencia (ν), longitud de onda (λ), número de onda ($\tilde{\nu}$) y a la constante de Planck (h).^[25]

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El poder de penetración de la radiación electromagnética depende de la longitud de onda incidente y de la naturaleza de la muestra que se analiza. Todo tipo de radiación electromagnética tiene cierta interacción con la materia, pero esta depende mucho de su energía. El poder de penetración (T) de la radiación decrece con el aumento del espesor (L) y la densidad del material (ρ) con un valor característico del coeficiente de atenuación (μ) —el cual es dependiente de la longitud de onda estudiada—, propuesta por la ley de Beer-Lambert en la Ecuación 2.^[26]

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\mu\rho L} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Según la energía con la que llegue el fotón se podrá realizar una excitación a nivel atómico o a nivel molecular.^[25,27,28] La excitación a nivel atómico se daría en casos en los que la energía corresponda a transiciones electrónicas (como es el caso de la radiación ultravioleta o los rayos X), mientras que el segundo caso se daría cuando la energía corresponda a estados moleculares excitados, producto de la suma de los estados vibracionales, rotacionales y electrónicos de la molécula. En la Figura 6 se muestran los efectos más importantes de cada zona del espectro electromagnético sobre la materia. Al analizar una pintura se deben tomar en cuenta las capas que la componen (ver la Tabla 3), ya que cada una de ellas presentará diferentes materiales. En la Figura 7 se puede observar un esquema de las capas que pueden ser penetradas por cada tipo de radiación. Algunos materiales pueden absorber ciertos tipos de radiación mejor que otros en base a su estructura atómica y molecular, lo cual varía el grado de penetración de la radiación incidente y proporciona información química útil.

Por ejemplo, los materiales más densos de una muestra tendrían una mayor probabilidad de absorber rayos X incidentes, ya que al existir una mayor cantidad de átomos en el camino del haz de radiación existiría también un mayor número de electrones (y la transición entre niveles energéticos electrónicos se encuentra en este rango de energía).^[29] Las radiografías (imágenes por rayos X) se basan en este principio, en las que se pueden observar detalles en una muestra en base a la diferencia de densidad de sus componentes. En el caso de una pintura, se pueden diferenciar las zonas pintadas con materiales en base a metales pesados (como el plomo o el mercurio) de los pintados con otros elementos más ligeros (como pigmentos orgánicos) y otros objetos que no se encuentren a simple vista (como grapas o clavos) debido al elevado poder de penetración de esta radiación.

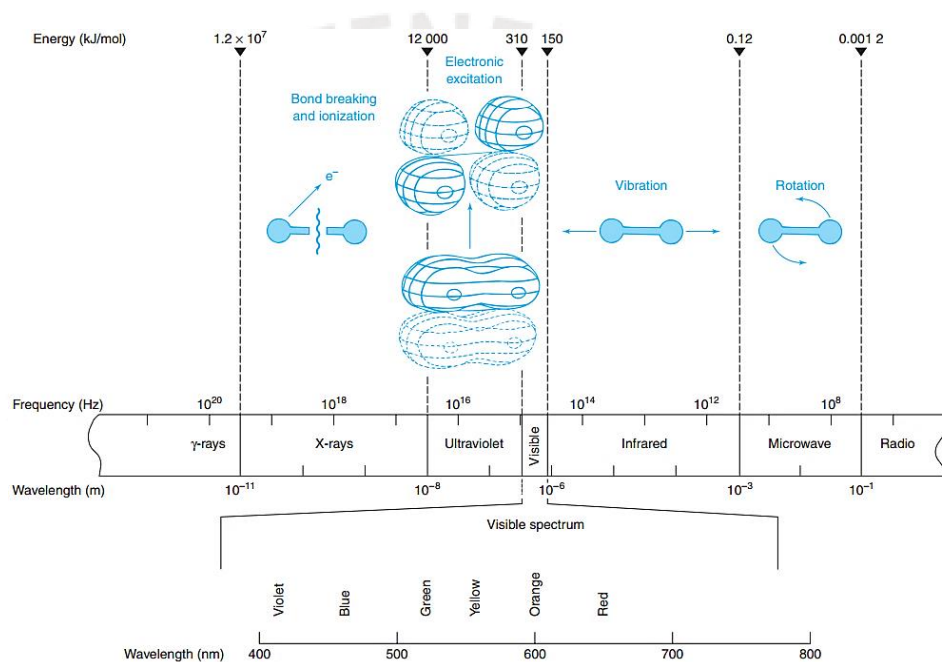


Figura 6. Espectro electromagnético y su interacción con la materia.^[30]

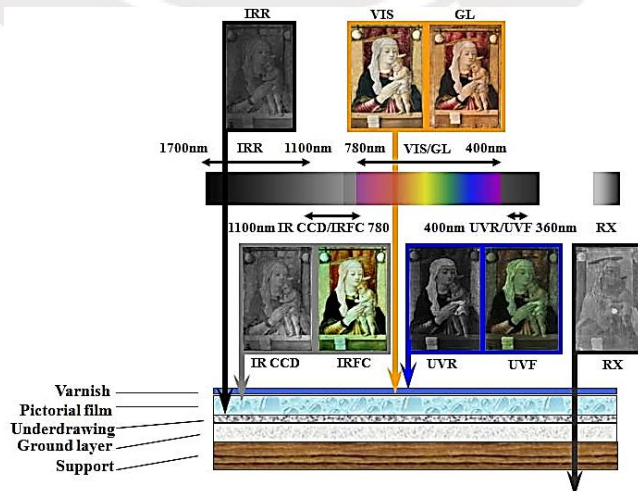


Figura 7. Esquema de penetración aproximada de la luz sobre las capas de una pintura a diferentes longitudes de onda.^[31]

3.5.1 Fotografía de luz ultravioleta (UV)

La luz UV corresponde al rango del espectro electromagnético de mayor energía que la luz visible pero menor energía que los rayos X. Comprende las longitudes de onda desde 100 hasta 400 nm.^[32] La materia también puede absorber, reflejar o dispersar los fotones a estas longitudes de onda. Sin embargo, su energía puede ser suficiente para provocar reacciones químicas adicionales.

La luz UV puede ser usada para examinar el estado de la preservación de pinturas mediante el fenómeno de fluorescencia. La fluorescencia es un tipo de relajación energética, la cual corresponde a un proceso por el cual un sistema pasa de un nivel energético excitado a uno menor. Si un fotón de luz lleva a la molécula a cualquier nivel vibracional excitado asociado a un nivel electrónico superior, esta perderá energía mediante un proceso no radiativo, entregando energía vibracional a las moléculas cercanas. Finalmente, al llegar a un estado electrónico excitado podrá descender al estado electrónico fundamental (o a algún nivel vibracional asociado a este) mediante la pérdida de un fotón. Este fotón emitido tendrá una longitud de onda mayor a la del absorbido, y en muchos casos llegará a caer en el rango de luz visible. Este proceso es mucho más rápido que la pérdida de energía por una transición entre estados electrónicos.^[28] En la Figura 8 se muestra un esquema de este proceso (ver las flechas anaranjadas para una mejor visualización del mismo).

Las capas más externas de una pintura suelen absorber fuertemente la radiación UV y generan fluorescencia (suelen contener barnices, aceites y material proteico); esto provoca una baja penetración de la luz UV hacia las capas más internas. Debido a esto la fluorescencia de los pigmentos presentes en las capas pictóricas se ve reducida,^[33] más no resulta despreciable.

En las pinturas de la época virreinal en el Perú se usó el blanco de plomo de forma extensiva. Por sí sólo, este pigmento presenta una fluorescencia bastante baja, pero en presencia de aceites puede aumentar considerablemente.^[34] Se ha reportado en la literatura que el blanco de plomo puede inducir una elevada fluorescencia UV en presencia de aceite de linaza, con un tono blanco-azulado.^[35] Una posible explicación es que los iones de metales pesados como el plomo aceleran el proceso de “secado” (polimerización de las cadenas lipídicas). Este proceso no solo puede generar varios productos de degradación del aceite de linaza (los cuales pueden presentar fluorescencia y también son responsables del amarillamiento del aceite) sino que la formación de quelatos entre dichos compuestos y los iones metálicos pueden reducir o aumentar la fluorescencia de la mezcla.^[36]

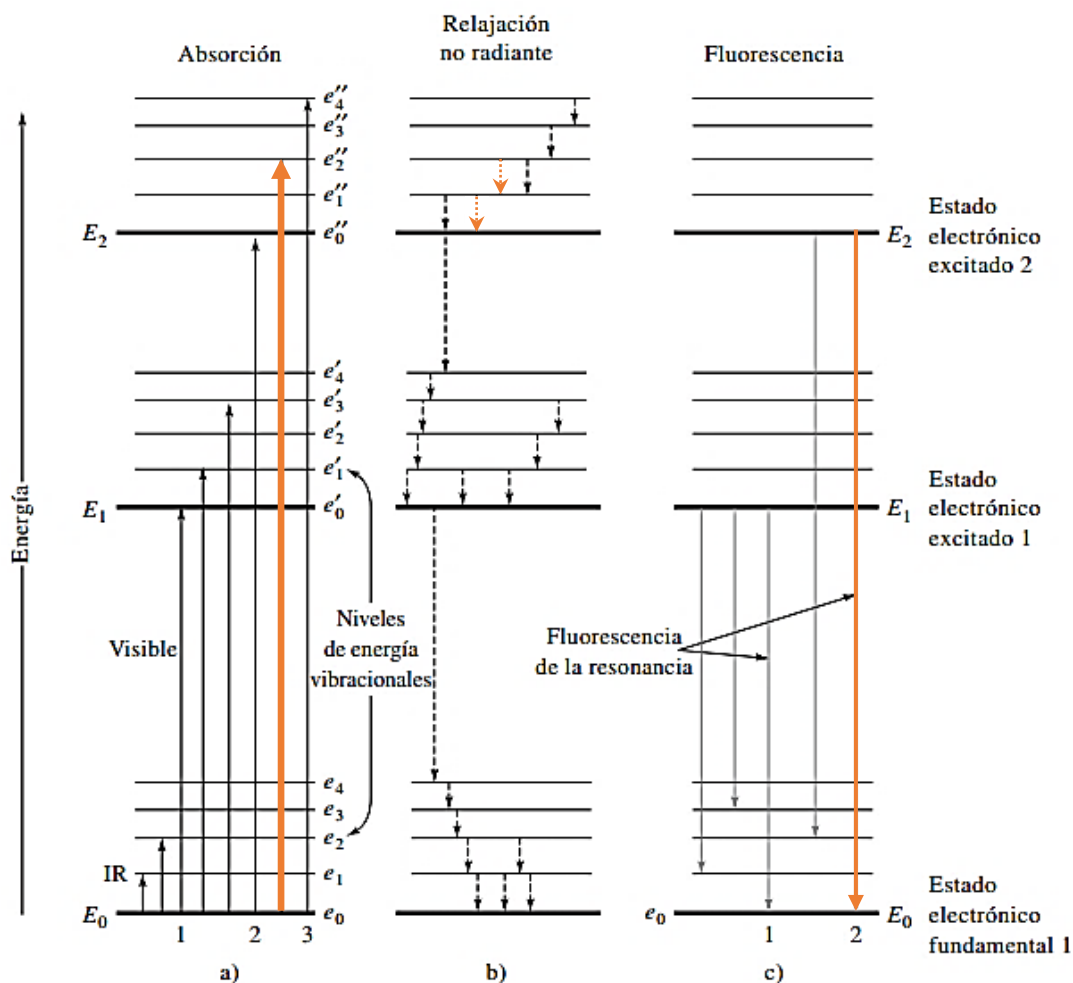


Figura 8. Procesos de absorción de energía y relajación, los cuales dan origen al fenómeno de fluorescencia molecular.^[28]

3.5.2 Fotografía de reflectancia de luz infrarroja (IR)

La luz infrarroja (IR) tiene un mayor poder de penetración que la luz UV al tener una longitud de onda mayor (la cual va desde 760 nm en el infrarrojo cercano hasta 1 mm en el infrarrojo lejano). Esto permite que algunos materiales opacos a la luz visible sean transparentes a este tipo de radiación ya que no la absorben ni interactúan con ella.

La fotografía de reflectancia infrarroja es posible gracias a los fenómenos de reflectancia y luminiscencia.^[37-39] Esta técnica se basa en una forma de la interacción de la materia con la luz, en la que esta incide en la muestra y es reflejada hacia un detector. Algunos pigmentos o materiales aparentemente indiferenciables ante la luz visible pueden mostrar diferentes respuestas (por procesos de absorción y luminiscencia) a la luz infrarroja, lo cual permite su diferenciación y caracterización.^[33] Por ello, se puede obtener información acerca de los compuestos presentes en una pintura debido a que no todos los materiales dispersan la luz IR

de la misma forma,^[40] en especial aquellos usados para los trazos (como el carboncillo o grafito de un lápiz).

Se ha reportado en la literatura el uso de una cámara web con función de visión nocturna para realizar el análisis por imagen infrarroja (tanto de reflectancia como por transmisión) de una pintura, con muy buenos resultados.^[41] De esta forma, es posible realizar estos análisis con equipamiento de bajo costo y fácilmente adquirible. Un ejemplo del uso de esta técnica en un dibujo sobre papel se presenta en la Figura 9. Es posible apreciar con claridad los trazos de carbón por debajo de la obra finalizada, los cuales no son observables a simple vista.



Figura 9. Aplicación de la fotografía en el infrarrojo cercano para obtener información sobre los trazos en un dibujo sobre papel [1461-1525]. *Arriba:* fotografía en color. *Abajo:* Fotografía infrarroja a 1040-1000 nm.^[39]

3.5.3 Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se basa en la dispersión inelástica de la radiación electromagnética tras la excitación de las moléculas presentes en la pintura con un láser monocromático (de una única longitud de onda).

La difusión (o dispersión) de la luz es un proceso “no cuantizado” [28] que consiste en la absorción de un fotón por un sistema, el cual es llevado hasta un nivel energético “virtual”. Según cómo regrese a un estado de menor energía se pueden encontrar dos casos: difusión elástica y difusión inelástica. En la difusión elástica el sistema pasa de un nivel energético basal a uno excitado y, al relajarse, regresa al nivel basal inicial y emite un fotón con la misma frecuencia que el incidente. Esta difusión es conocida como Rayleigh. En el caso de la difusión inelástica, el sistema no vuelve al nivel energético original (el cual puede ser el basal o un estado ya excitado) tras ser llevado a un estado “virtual” como en la dispersión elástica. Aquí, el nivel energético que alcanza tras la relajación puede ser superior (dispersión Stokes) o inferior (dispersión anti-Stokes) al nivel inicial. A partir de ello, en una dispersión Stokes el fotón emitido tras la relajación tiene una frecuencia menor a la del fotón incidente, mientras que en una dispersión anti-Stokes el fotón emitido tras la relajación tiene una frecuencia mayor a la del fotón incidente, tal como se muestra en la Figura 10.

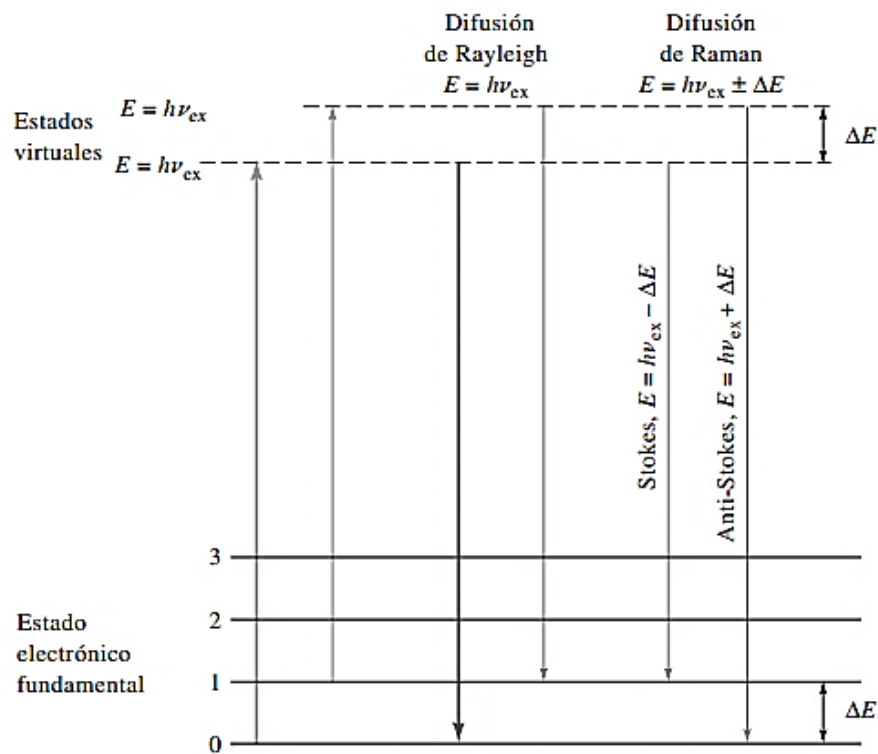


Figura 10. Esquema de los procesos electrónicos que dan origen a las dispersiones de Rayleigh y Raman.^[28]

No es siempre posible obtener señales útiles de una muestra debido a la fluorescencia de los materiales presentes (como los aglutinantes, barnices y pigmentos). Cuando esto sucede, la línea base es más intensa que las señales Raman del analito y no es posible la identificación de los analitos con la fuente de excitación usada. La probabilidad de que ocurra un proceso de fluorescencia es mucho mayor que la de la dispersión Raman (sólo un fotón por cada 10^6 a 10^9 fotones incidentes son dispersados de esta forma).^[42]

La fluorescencia se puede reducir al cambiar la fuente de excitación de tal forma que el material analizado no absorba a la longitud de onda aplicada y la relación señal-ruido (S/N) sea la máxima posible.^[42]

3.5.4 Espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)

Los rayos X son una forma de radiación electromagnética de alta energía (abarcen el rango entre 1 pm y 1 nm)^[32] que interactúa con los átomos del objeto de estudio, y el nivel de penetración depende de la densidad del elemento que atraviesan.^[33] La energía de los fotones es suficiente para ionizar los átomos en diferentes niveles energéticos, lo cual se utiliza en múltiples técnicas analíticas, como la espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX) o las radiografías.

Cuando un material es expuesto ante una fuente de rayos X, un electrón de las capas más internas de sus átomos es arrancado fuera del átomo. Al descender un electrón de los niveles superiores para suplir esta pérdida, se emite radiación mediante el fenómeno de fluorescencia (ver sección 3.5.1). Esta radiación emitida, cuya energía es característica del elemento que ha sido afectado,^[26] se clasifica según la posición del electrón eyectado y de la capa de procedencia del que ocupa su lugar: si el electrón eyectado proviene de la capa electrónica más interna la línea característica se denominará K; si proviene de la capa siguiente se denominará L y así sucesivamente.

Adicionalmente, si el electrón que ocupa su lugar proviene de la capa inmediata superior se denominará con el subíndice “ α ”, mientras que si el electrón proviene de la capa subsiguiente se denominará “ β ”. En la Figura 11 se muestran algunas transiciones electrónicas observadas en un espectro de FRX.

En un espectro de FRX no se observan líneas propiamente dichas puesto que las muestras analizadas son una mezcla compleja de materiales, en cuyas interacciones elásticas e inelásticas (discutidos en la sección 3.5.3) entre los fotones y los átomos presentes pueden existir múltiples efectos de pérdida, mantenimiento o ganancia de energía. Estos efectos pueden generar artefactos que dificultan el análisis de una muestra. Un inconveniente de esta técnica es que algunos elementos presentan superposiciones en sus líneas características. Tal

es el ejemplo del azufre, plomo y arsénico: las líneas K del azufre coinciden con las líneas M del plomo, así como las líneas L del plomo coinciden con las líneas K del arsénico. De igual forma, si existe un contenido elevado de plomo, sus líneas L pueden opacar las L del mercurio. Esta técnica permite un análisis elemental de la muestra, pero no brinda la posibilidad de discriminar los compuestos que se encuentran presentes, por lo que se necesitan técnicas complementarias para determinar esta información restante. Entre estas últimas se encuentran el análisis Raman, cromatografías, tinciones, entre otras. Es común en la literatura observar análisis por FRX y Raman en conjunto, y han sido previamente usados de forma exitosa para el estudio de pinturas sobre madera.^[43] Debido a esto, su uso en común es un buen punto de partida para proponer los análisis posteriores que sean requeridos.

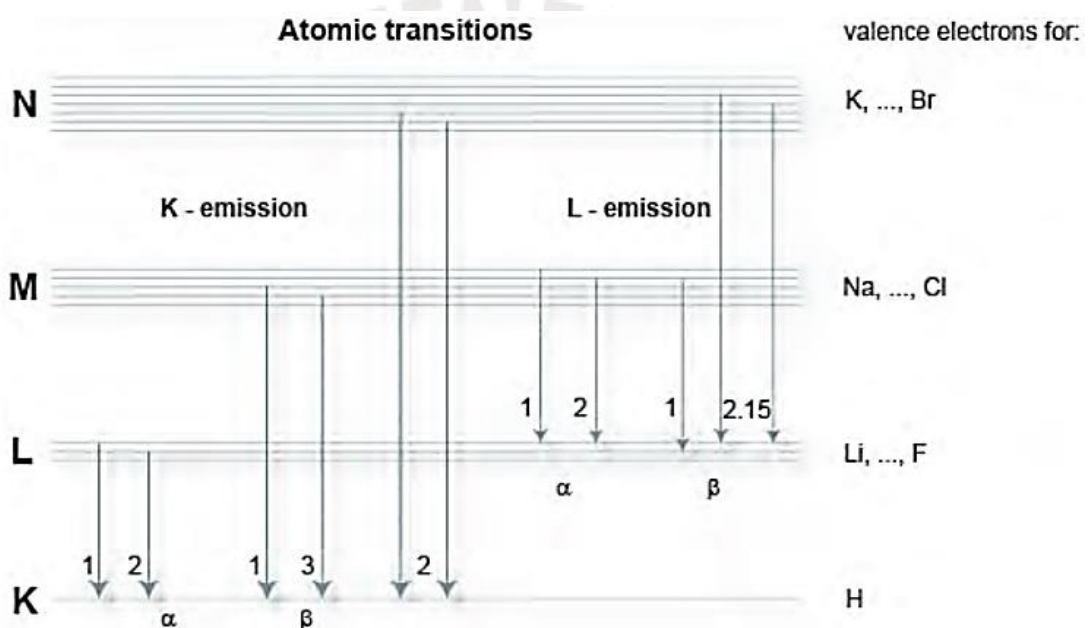


Figura 11. Transiciones electrónicas que dan origen a las señales observadas en un espectro FRX. Un electrón de la capa electrónica K es arrancado por un rayo X incidente y otro electrón ocupa su posición, dando origen a las líneas K, L y M en un espectro FRX.^[44]

3.5.5 Radiografías por transmisión

Una radiografía por transmisión consiste en la irradiación de un objeto con una fuente de rayos X, bajo el cual una placa radiográfica se colorea en escala de grises según esta radiación incide sobre la misma. Esto se da en función a la densidad de los objetos que se encuentren en el camino del haz de radiación.

Su uso común en el ámbito médico ha sido extendido al campo del análisis artístico, puesto que permite revelar detalles que no son observables a simple vista (tales como clavos y grapas) y se puede complementar con otras técnicas ya mencionadas anteriormente. En algunas

ocasiones es posible apreciar claramente una imagen, ya que la radiografía por transmisión permite ver un contraste claro-oscuro por el cambio de densidad de los átomos en la muestra, lo cual suele coincidir con los detalles de los personajes y figuras en la obra.

En la Figura 12 se muestra un ejemplo del uso de las radiografías por transmisión junto a otras técnicas en el análisis de la obra “Grasgrond”, una pintura creada por Van Gogh en 1887. Mediante una radiografía por transmisión, un mapeo por fluorescencia de rayos X y por reflectancia de IR (IRR) se pudo encontrar un rostro oculto bajo la pintura actual.^[45]

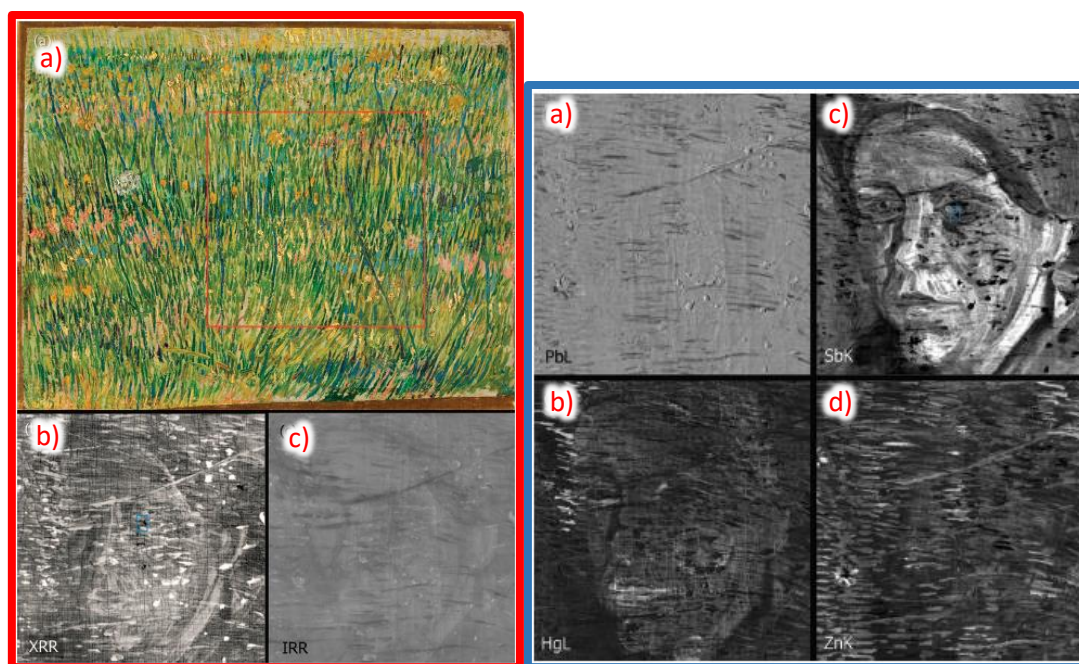


Figura 12. “Grasgrond”, de Van Gogh. *Izquierda, en marco rojo.* Descubrimiento de un rostro oculto en la obra: (a) Pintura original, (b) radiografía por transmisión, (c) reflectancia de IR (IRR). *Derecha, en marco azul.* Mapeo por fluorescencia de rayos X de cuatro elementos diferentes: (a) plomo, (b) antimonio, (c) mercurio y (d) zinc.^[45]

3.5.6 Microscopía óptica

La luz visible corresponde al rango del espectro del electromagnético que los seres humanos podemos captar naturalmente con la vista, el cual va desde 380 hasta 760 nm.^[32] A grandes rasgos nos permite observar los colores y detalles de los materiales que componen la pintura, así como su relieve (proporciona información del estilo del artista por las pinceladas y texturas) o imperfecciones presentes en ella (grietas, rajaduras). Sin embargo, debido a que el ojo humano no puede resolver detalles en un objeto muy pequeño, es necesario utilizar la microscopía. Esta técnica se encarga de magnificar una imagen utilizando una fuente de radiación (en este caso, la luz visible), cuyo límite de resolución o capacidad para resolver

(diferenciar) dos puntos que aparecen separados en una imagen ^[46] dependen de la longitud de onda utilizada y de la apertura angular del microscopio.

En el análisis artístico la microscopía óptica resulta muy útil para identificar detalles de una muestra que no pueden ser apreciados a simple vista. Esto incluye la distribución de capas de una micromuestra (en la que se soporta gran parte de esta investigación) así como los materiales presentes en ellas.

3.5.7 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que se basa en el uso de electrones en lugar de luz para poder visualizar detalles que no son visibles por el ojo humano. Este proceso es realizado mediante el enfoque de un fino haz de electrones sobre una muestra, el cual es pasado sobre una muestra con un barrido de trama. ^[28] La interacción de los electrones sobre la muestra puede ocasionar múltiples efectos (ver Figura 13), de los cuales dos son usados comúnmente para producir imágenes: el primero corresponde a la reflexión elástica de los electrones al interactuar con los núcleos atómicos de la muestra, cambiando sus trayectorias (electrones retrodispersados o *back-scattered electrons*, *BSE*); el segundo corresponde a un efecto de dispersión inelástico en el que los electrones incidentes llevan suficiente energía para expulsar los electrones dentro de los átomos (electrones secundarios). ^[47] Por lo general, los electrones secundarios son usados para analizar la topología de la muestra, mientras que los electrones retrodispersados proporcionan información sobre la composición de la muestra —estos son producidos con mayor probabilidad tras la interacción con átomos de número atómico superior. ^[28]

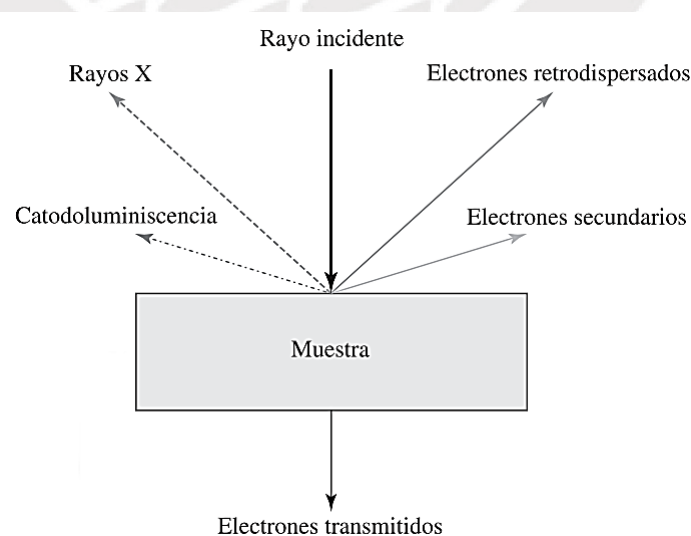


Figura 13. Diferentes efectos que generan los electrones incidentes sobre una muestra. ^[28]

El límite de resolución teórico es de 9 nm.^[46] Esto es aprovechado para realizar análisis con fluorescencia de rayos X en puntos muy cercanos entre sí, los cuales brindan información elemental de la muestra. Los objetos que son expuestos al haz deben ser conductores de la electricidad, ya que en caso no lo sean pueden sufrir de un efecto de carga.^[47] Este proceso se debe a que la velocidad de ganancia de electrones es menor a la de la pérdida de los mismos en materiales aislantes, lo que puede originar una descarga repentina que genera artefactos en la imagen. Es por ello que los trozos de resina que contienen la muestra de pintura deben ser cubiertos con pintura de carbono coloidal antes de colocarse en el equipo SEM, dejando sólo la muestra al descubierto. En este caso, debido a que los compuestos presentes en la pintura suelen estar formados por metales y elementos de alto peso molecular, no es necesario realizar ningún tratamiento previo a la muestra.

3.6 Otras técnicas analíticas para el estudio de obras de arte

Otras técnicas que han sido utilizadas ampliamente para la identificación de compuestos presentes en obras artísticas incluyen la espectrometría de masas, las cromatografías (separación de sustancias en base a su interacción con una columna que contiene una fase móvil y una fase estacionaria) y las tinciones.

La espectrometría de masas es una técnica analítica muy útil y versátil que permite la identificación de sustancias y compuestos presentes en una muestra en base a la ionización y fragmentación de sus moléculas. Todo espectrómetro de masas tiene una entrada de muestra, una fuente de ionización, uno o más analizadores de masa y un detector.^[48] La fuente de ionización influye en el tipo de iones formados (sean positivos o negativos), así como la extensión de la fragmentación que se producirán sobre las moléculas. Existen muchos tipos de ionización, pero en esta investigación se usaron la ionización electrónica (IE) y la ionización/desorción por láser asistida por una matriz (MALDI, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* por sus siglas en inglés). Al ionizarse una molécula esta obtiene una carga y sufre una deflexión en su trayectoria por acción de un campo eléctrico externo. El espectrómetro de masas puede detectar cada ion (con sus respectivos isótopos) y generar un espectro de abundancia relativa de cada uno versus su cociente masa/carga (m/z).^[49]

Como ya se mencionó anteriormente, las muestras de pintura estudiadas corresponden a mezclas complejas de diversos componentes. En muchos casos es necesaria una separación de dichos componentes en la matriz para obtener información útil de la muestra. La cromatografía es una técnica separativa en la que los componentes de una muestra pasan por una fase móvil (en la cual se encuentran disueltos) y una fase estacionaria (la cual se encuentra fija en una superficie) presentes en una columna, cada una con diferentes propiedades físicas y químicas.

La correcta separación de los componentes de la muestra depende de muchos factores. Entre los fenómenos de transporte (cómo se mueven los componentes de la muestra problema a través de la fase móvil) se pueden considerar los efectos de la viscosidad de la fase móvil, el tamaño de las partículas de los analitos, la velocidad del flujo, la presión del sistema, entre otros.^[50] Por lo general, la afinidad de los analitos a la fases móvil y la fase estacionaria (la cual se encuentra fija en una superficie) depende de sus estructuras químicas, y la medida en que interaccionan con una u otra generan una separación en el tiempo.^[51]

3.6.1 Espectrometría de masas mediante ionización MALDI y analizador de masas Orbitrap (MALDI-MS)

Entre las técnicas que se han desarrollado para un análisis directo de muestras (sin necesidad de acoplarla a una columna cromatográfica) se encuentra la ionización asistida por matriz (MALDI). Esta forma de ionización se basa en la utilización de una matriz adecuada en la cual se depositan los analitos de interés, de tal forma que al ser irradiada por un láser a cierta longitud de onda sea vaporizada y arrastre a los compuestos presentes en ella hacia el analizador de masas.^[52] Esta técnica de ionización es lo suficientemente “suave” como para generar poca fragmentación en los analitos, los cuales pueden llegar prácticamente intactos al detector.^[48]

Entre los últimos avances de la espectrometría de masas se encuentra el analizador Orbitrap. Su funcionamiento se basa en agrupación selectiva de iones, los cuales orbitan alrededor de un electrodo central que genera un campo electrostático. Esta configuración del analizador de masas, junto con la ionización MALDI, permite una resolución y sensibilidad muy alta, lo cual hace posible la identificación de compuestos que normalmente no sería posible con otros tipos de analizadores de masa.^[48]

La espectrometría de masas ha sido utilizada previamente para la identificación de pigmentos naturales de origen biológico (como las lacas y pigmentos rojos mencionados en documentos históricos del siglo XVI)^[6,18] en diferentes estudios utilizando varios métodos de ionización y analizadores de masa.^[53-58] En uno de los estudios se reportaron los iones $[M-H]^-$ altamente resueltos del ácido carmínico ($m/z = 491,0840$), el ácido kermésico ($m/z = 329,0301$) y varios otros compuestos presentes en una muestra de cochinilla americana.^[58] Esta información da pie a la posibilidad de identificar la presencia de cochinilla usando la combinación de la ionización MALDI con un analizador Orbitrap. Adicionalmente, se puede utilizar la espectrometría de masas en tándem dependiente de datos ($dd-MS^2$) sobre los iones precursores para confirmar la identidad de los iones precursores encontrados al comparar los m/z de sus fragmentos con los encontrados en las bases de datos.

Se encontró también que otras lacas orgánicas de origen vegetal han sido utilizadas desde la antigüedad, las cuales se encuentran compuestas principalmente por alizarina y purpurina.^[59] Tal es el caso de la planta *Rubia Tinctorum*, cuya raíz ha sido usada para producir una laca roja y ha sido estudiada por MALDI previamente, reportándose el ion característico $m/z = 256,16$ en el modo negativo.^[55]

3.6.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para el estudio de los aglutinantes y barnices presentes en una muestra de pintura se puede recurrir a la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica se basa en la separación de componentes de una muestra tras ser vaporizada, la cual corre a través de una columna cromatográfica gracias al arrastre de un flujo de gas inerte. Puesto que no todos los componentes presentan la misma afinidad con dicha columna, se genera una separación durante la elución. Posteriormente, los componentes son ionizados y fragmentados por una fuente de ionización. La ionización electrónica es muy usada en esta técnica, la cual genera una fragmentación extensiva de los analitos.

Un punto a tomar en cuenta es que las muestras pueden necesitar una preparación previa al análisis cromatográfico. Se pueden usar, según la necesidad, diferentes agentes derivatizantes en la misma muestra para analizar diferentes compuestos (como resinas, ácidos grasos, aminoácidos y otros compuestos), los cuales modifican químicamente a los analitos con el objetivo de otorgarles características deseables en la cromatografía (como un aumento en la volatilidad).^[60,61] De esta forma, la cromatografía es una herramienta muy importante para la caracterización de barnices y medios aglutinantes de pigmentos,^[62] que pueden proveer mayor información acerca de los materiales utilizados por el pintor.

Para el trabajo con GC-MS, es recomendable trabajar con un estándar interno para poder realizar el análisis cuantitativo de forma reproducible y fiable. Idealmente, el estándar interno debe tener una estructura y propiedades químicas similares a los analitos estudiados (de tal forma que el tiempo de retención sea cercano), mientras que este no debe aparecer naturalmente en la muestra analizada. En el caso del análisis de aglutinantes lipídicos y barnices en una pintura, el ácido tridecanoico cumple con estos criterios y ha sido utilizado con éxito en pinturas.^[63]

3.6.2.1 Estudio de aceites

En la literatura se encontró que los aceites usados en una pintura podían ser determinados a partir de la relación entre las áreas de los ácidos grasos palmítico y esteárico (P/S), cuya

proporción es relativamente estable en el tiempo y no sufren cambios químicos significativos.^[60,61,64-66] Sin embargo, esto sólo es posible si se verifica la linealidad de la respuesta del equipo a diferentes concentraciones de ácidos grasos y no existe falta de ajuste para el modelo de regresión calculado, con un valor de significación de 5%.^[67] En la Tabla 5 se muestran las proporciones P/S características de los aglutinantes reportados en la literatura. Es importante tener en cuenta que la relación P/S puede variar en el tiempo hacia un valor menor debido a la evaporación de los ácidos grasos presentes en la obra, pero este efecto se ve reducido en el caso de que los pigmentos puedan estabilizarlos (como cuando ocurre un proceso de formación de jabones de metales pesados).^[68]

Tabla 5. Valores de la relación P/S reportados en la literatura para la identificación de aglutinantes lipídicos.

| REFERENCIA | RELACIÓN P/S | | |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------|------------------------------|
| | Aceite de linaza | Aceite de nuez | Aceite de semilla de amapola |
| [61] | 1,2 ± 0,2 | 2,2 ± 0,3 | No se reportó |
| [66] | 1,5 | 2,2 | 3,8 |
| [67] | 1,0 ± 0,1 (en combinación con yeso) | No se reportó | No se reportó |
| [69] | 1,40 ± 0,10 | 2,72 ± 0,19 | 4,46 ± 0,66 |
| [70] | No se reportó | 3,3 ± 0,1 | 3,9 ± 0,1 |
| [71] | 1,4 – 1,9 | 2,2 – 2,8 | 2,9 – 3,7 |
| Rango aceptado | 0,9 – 1,8 | 1,9 – 2,8 | 2,9 – 5,0 |

3.6.2.2 Identificación de barnices

La identificación de barnices mediante GC-MS es posible mediante la identificación de biomarcadores característicos de las resinas que las componen, los cuales son compuestos que mantienen su estructura química con pocos cambios significativos con el paso del tiempo. De esta manera es posible determinar el compuesto original a partir de los marcadores encontrados, así hayan sufrido modificaciones debido al envejecimiento natural, a factores ambientales o a la producción del barniz. A modo de ejemplo, en la Figura 14 se pueden observar algunos productos encontrados en un barniz a base de resina de pino, los cuales pueden ser utilizados como marcadores para la identificación de colofonia.^[72]

Para la identificación de barnices en una muestra de pintura es necesario identificar los biomarcadores más útiles tras una separación previa de otros compuestos (como ácidos grasos), los cuales pueden enmascarar las señales de los compuestos provenientes de resinas al encontrarse en una mayor proporción.

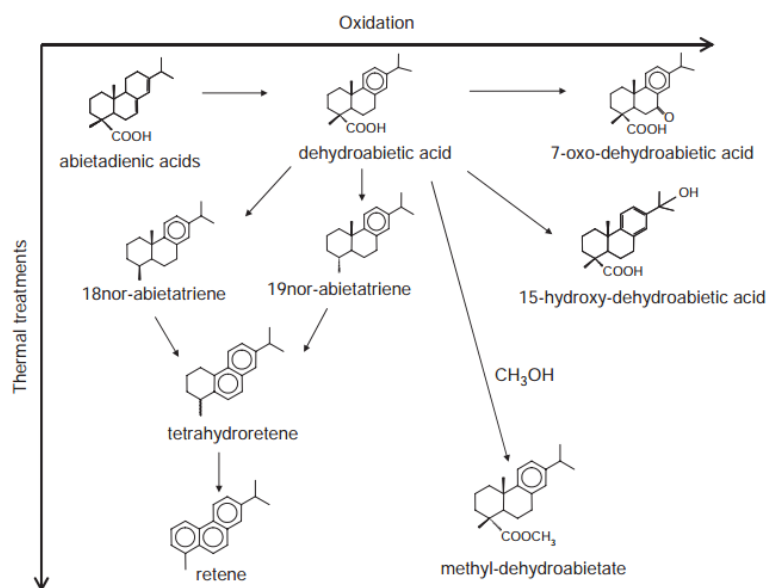


Figura 14. Algunos compuestos presentes en una resina de pino debido a procesos oxidación y calentamiento durante el tratamiento de la misma.^[72]

3.6.3 Identificación de material proteico mediante tinción con Ponceau S

El método de análisis por tinciones es útil para determinar la naturaleza de los compuestos orgánicos presentes en las muestras, como son las lacas, barnices, aglutinantes y algunos pigmentos. Debido al reducido tamaño de las muestras es necesario utilizar un microscopio óptico para detectar la coloración de los componentes.

Existe una gran variedad de agentes de tinción,^[73] y se debe probar cuáles son los más indicados para cada caso específico, teniendo en cuenta una idea previa de los posibles compuestos usados en la época. En el caso de la pintura virreinal, y como ya se discutió previamente, los materiales que se estarían esperando incluirían colas animales (como cola de conejo o colapez) o gomas vegetales, así como otros compuestos de origen animal (como clara o yema de huevo). Sin embargo, es necesario tener cuidado debido a que pueden existir falsos positivos o falsos negativos según la matriz de la muestra y los compuestos presentes, que en algunos casos pueden causar interferencia.

Para la observación de la presencia o ausencia de material proteico se utilizó Ponceau S, un agente de tinción de color rojizo, el cual tiñe de color rojo-anaranjado una muestra que contenga yema de huevo y de rojo-rosado una muestra que contenga alguna goma animal.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y reactivos

En las Tablas 6 y 7 se muestran los materiales, reactivos y solventes utilizados durante esta investigación.

Tabla 6. Materiales usados en el presente trabajo.

| MATERIALES | MARCA |
|--|---------------------------------------|
| Lijas al agua gruesas - 360A, 600A, 800A | Abralt |
| Lijas al agua finas - P1500A, P2500A | Asalite |
| Paños de pulido (Micro-mesh cushioned abrasives) – 4000, 6000, 8000, 12000 | Micro-Surface Finishing Products Inc. |
| Resina epoxi y | Leco |
| Endurecedor de resina de “curado rápido” | Leco |
| Pintura conductiva de carbono (grafito coloidal) | SPI Supplies |
| Molde de silicona, con cubetas de 1 cm x 1 cm | Be Cool |
| Bisturí | |
| Sierra de joyería | |
| Reactivales cónicos de 0,3 mL con tapas de PTFE | Wheaton |
| Viales de 1,5 mL | Agilent Technologies |
| Tapas con rosca para viales de 1,5 mL | Agilent Technologies |
| Septos rojos de PTFE | Agilent Technologies |
| Micropipeta de 200 μ L | Isolab |
| Microtips de 200 μ L (polipropileno) | Isolab |
| Micropipeta de 20 μ L | Witeg |
| Jeringa de 25 μ L (Gastight 1702) | Hamilton company |
| Jeringa de 100 μ L (Gastight 1710N) | Hamilton company |
| Indicadores universales de pH | Merck |

Tabla 7. Reactivos y solventes utilizados en esta investigación.

| COMPUESTO | MARCA |
|---|---------------|
| Methprep II (solución de hidróxido de m-(trifluorometil)fenil-trimetilamonio en metanol al 0,2 N), ampollas de 1 mL | Grace Alltech |
| Estándares de ácidos grasos: tridecanoico, palmítico y esteárico | Sigma-Aldrich |
| Estándares de resinas: dammar, colofonia y copal | |
| Metanol p.a. | Merck |
| Tolueno p.a. | Merck |
| Acetona p.a. | Merck |
| Éter etílico | Merck |
| Ácido acético glacial | Merck |
| Ácido trifluoroacético (TFA) | Merck |
| Ácido carmínico GR | Merck |
| 9-aminoacridina | Sigma-Aldrich |

4.2 Instrumentos y equipos

En la Tabla 9 se muestran los instrumentos utilizados y equipos utilizados en esta investigación. Los instrumentos marcados con asterisco (*) se encuentran en el Laboratorio de Investigación Científica y Análisis del Museo Winterthur, Delaware, Estados Unidos. Todos los demás equipos e instrumentos se encuentran disponibles en los laboratorios de la sección química o del Centro de Caracterización de Materiales de la PUCP.

Tabla 8. Instrumentos y equipos usados en esta investigación.

| INSTRUMENTO | MARCA / MODELO | ACCESORIOS |
|--|-----------------------------------|--|
| Cámara web | Sabrent / WCM-6LNV | Filtro de luz visible LEE Filters 87CP3 |
| Baño de ultrasonido | Cole-Parmer / 8891 | Ninguno |
| Espectrómetro de fluorescencia de rayos X portátil | Bruker / Tracer III-SD | Ninguno |
| Espectroscopio Raman portátil | B&W Tek / i-Raman Plus | Láser de 785,18 nm (potencia máxima de 420 mW) |
| Espectroscopio Raman de sobremesa con microscopio confocal | Renishaw / inVia | Láser Renishaw RL785 de 785 nm (potencia nominal de 300 mW \pm 30 mW), láser Renishaw RL633 de 633 nm (potencia nominal de 17,5 mW) |
| Microscopio óptico binocular | Leica Microsystems / M80 | Aumento ocular 10X, objetivo de 1,25X (Achio) |
| Microscopio óptico binocular* | Zeiss / Axio Imager.M2m | Ocular de 10X, objetivos de 5X, 10X, 20X y 50X. Fuente de luz: lámpara de mercurio Kübler Codix HXP 120C |
| Cámara digital | Canon / EOS Rebel T5i | Adaptador de microscopio (Martin Microscope Company) |
| Cámara digital* | Zeiss / AxioCam HRC | Software de procesamiento de imágenes: Zeiss AxioVision |
| Microscopio electrónico de barrido | FEI / Quanta 650 | Detector EDS |
| Microscopio electrónico de barrido* | Zeiss / EVO MA15 | Fuente: LaB6, con voltaje de aceleración de electrones de 20 kV Detector EDS: Bruker Nano X-flash® 6 30 |
| Bloque de calentamiento análogo | VWR / 460-32xx series | Ninguno |
| Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas | Agilent / 7890B GC | Espectrómetro de masas Agilent 5977A MSD. Columnas: Agilent DB-5ms Ultra Inert, Agilent DB-23. Ambas de 30 m de largo, 0,25 mm diámetro, 0,25 μ m de grosor de película |
| Espectrómetro de masas | Thermo Scientific / Q Exactive HF | Fuente de ionización MALDI: MassTech AP/MALDI(ng) (longitud de onda de láser: 355 nm, potencia máxima de 80W) |

4.3 Metodología

4.3.1 Análisis preliminares por fluorescencia por luz ultravioleta

Para la primera parte del estudio de la obra esta fue retirada de su emplazamiento original y llevada al taller de restauración de la iglesia San Pedro de Lima. Ahí se realizó el examen visual de la obra, así como una inspección con luz ultravioleta.

La fuente de luz ultravioleta correspondió a dos tubos fluorescentes disponibles de forma comercial con el nombre de “luz negra”. Para una iluminación más precisa de la obra se armó un sistema a manera de una ventana rectangular, forrando la parte externa de los tubos de luz con papel negro, de tal forma que la radiación no fuera captada directamente por la cámara ni iluminara otras zonas del cuadro. Las fotografías fueron obtenidas usando una cámara digital sin ningún filtro acoplado a la lente.

4.3.2 Examinación de la obra por radiografías de transmisión

Las radiografías de la obra fueron tomadas en la sala de radiografías del Hospital de la Solidaridad (Avenida Camaná 700, Cercado de Lima). Debido al tamaño de la tabla, las radiografías fueron obtenidas por secciones, tal como se muestra en la Figura 15. El análisis se realizó aplicando un pico de voltaje de 48 kV al tubo de rayos X, con una corriente total de 2,8 mAs (miliAmper segundo).

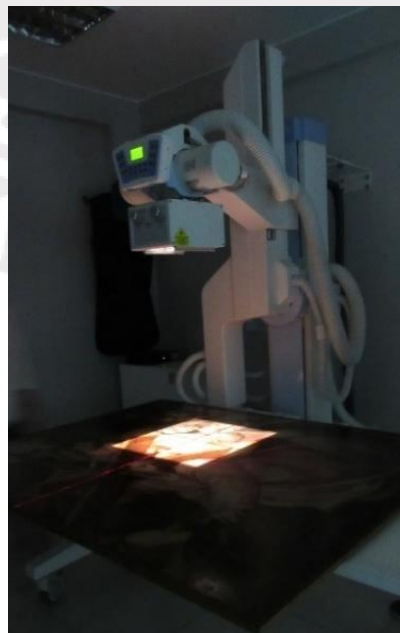


Figura 15. Toma de radiografías de la obra. El procedimiento se realizó por secciones cuadradas. [Fotografía: Nancy Junchaya].

4.3.3 Análisis *in situ* mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)

Se utilizó un espectrómetro de fluorescencia de rayos X portátil Bruker Tracer III-SD (sin ningún filtro acoplado) para el análisis *in situ*. El análisis fue realizado a través del software *SIPXRF*, el cual permitió el manejo del instrumento desde una laptop con el sistema operativo Windows 7. El tiempo de análisis fue de 30 segundos, con un voltaje de 40 kV y una corriente de 10,3 μA en todos los casos. Estos archivos fueron procesados posteriormente con el programa Bruker Artax 7.4.0.0.

La toma de espectros de diferentes puntos se realizó en dos fechas diferentes, y los puntos de análisis se muestran en la Figura 16. La exploración inicial consistió en el análisis de 22 zonas de la obra (puntos verdes en la figura, etiquetados con letras mayúsculas), el cual se llevó a cabo para obtener información rápida sobre los elementos presentes en varias zonas de interés. En una segunda fecha se realizó un análisis más minucioso de otras zonas, incluyendo a todos los personajes, la vegetación del fondo y el cielo, tomándose en total 122 puntos. En la Tabla 9 se muestran los códigos y el color de la pintura en estos puntos.

4.3.4 Análisis *in situ* por espectroscopía Raman

Se utilizó un espectroscopio Raman portátil B&W Tek i-Raman Plus con una fuente de excitación de 785,18 nm para el análisis *in situ* de la pintura sobre tabla. Los puntos de análisis fueron los mismos que los considerados para el estudio por espectrometría de fluorescencia de rayos X (ver Figura 16 y Tabla 9). El software usado para la obtención de los espectros fue BWSpec 4, proporcionado por el fabricante del equipo. Antes de cada análisis se realizó una medición “oscura” (“dark”), en la cual se cubrió el filamento de fibra óptica con un trozo de poliestireno expandido (TEKNOPOR®) y se tomó un espectro sin encender el láser (el programa presenta esta opción en su interfaz gráfica). Con este procedimiento el software realiza la substracción del ruido de fondo y genera la corrección de la línea base del espectro obtenido. El tiempo de integración fue de 1000 ms, con tres repeticiones y la potencia del láser al 10%. En todas las mediciones el láser fue cubierto con un pequeño trozo de TEKNOPOR® para evitar dañar la superficie de la obra, así como para evitar la interferencia de la luz ambiental durante las mediciones.

4.3.5 Análisis *in situ* de la obra por reflectancia infrarroja

En el presente estudio se usó una cámara web de la marca Sabrent (modelo WCM-6LNV), a la cual se le acopló un filtro de luz visible Lee Filters 87C, como se encontró reportado

en la literatura.^[41] Con ayuda de una lámpara infrarroja se iluminaron partes de la obra, las cuales fueron luego visualizadas en una computadora usando el software de captura de video proporcionado por el fabricante de la cámara web. La fuente de luz infrarroja fue colocada en una posición tal que no generara reflexiones especulares en la imagen obtenida que pudieran enmascarar detalles de la obra.

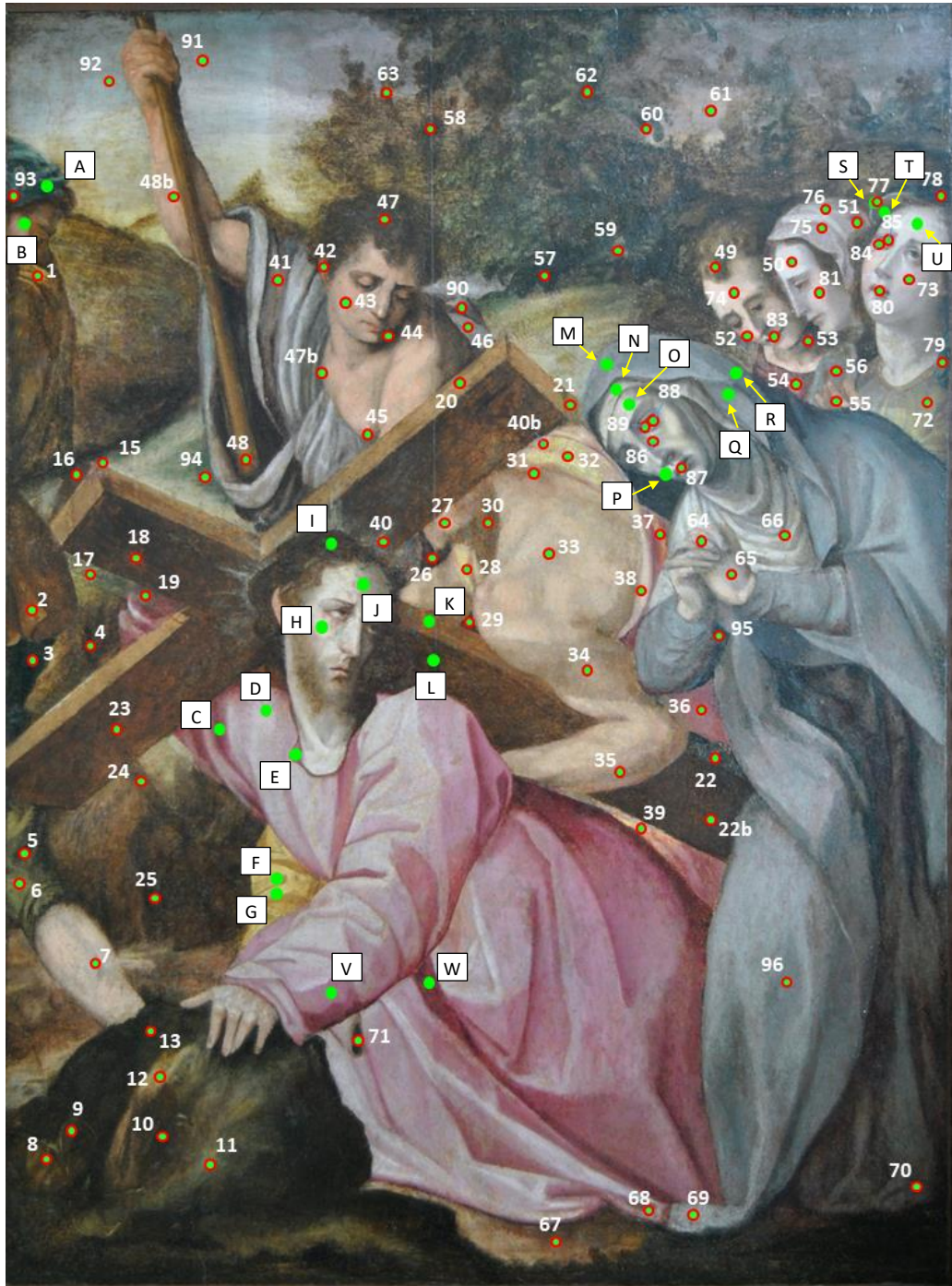


Figura 16. Todos los puntos de análisis por FRX realizados a la obra de arte. [Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro].

Tabla 9. Puntos analizados por espectrometría de fluorescencia de rayos X y espectroscopía Raman *in situ*.

| PUNTO | COLOR | PUNTO | COLOR | PUNTO | COLOR |
|-------|----------------|-------|-----------------------|-------|-------------------|
| A | Verde | 20 | Marrón claro | 57 | Verde |
| B | Marrón | 21 | Marrón/mostaza | 58 | Marrón claro |
| C | Morado | 22 | Azul | 59 | Verde |
| D | Morado claro | 22b | Marrón | 60 | Verde |
| E | Morado | 23 | Marrón | 61 | Anaranjado |
| F | Amarillo | 24 | Marrón claro | 62 | Verde |
| G | Amarillo | 25 | Marrón oscuro | 63 | Marrón |
| H | Rosado | 26 | Marrón rojizo | 64 | Gris/rojo |
| I | Marrón oscuro | 27 | Amarillo/crema | 65 | Gris/rosado |
| J | Blanco | 28 | Amarillo | 66 | Gris verdoso |
| K | Marrón claro | 29 | Rojo oscuro | 67 | Marrón |
| L | Marrón oscuro | 30 | Marrón claro | 68 | Morado |
| M | Azul-verdoso | 31 | Marrón claro | 69 | Azul-verdoso |
| N | Gris | 32 | Amarillo | 70 | Azul/rosado |
| O | Gris | 33 | Blanco | 71 | Verde negruzco |
| P | Gris | 34 | Gris | 72 | Mostaza |
| Q | Azul-grisáceo | 35 | Gris | 73 | Rosado |
| R | Azul-verdoso | 36 | Rosa | 74 | Rosado |
| S | Verde | 37 | Anaranjado | 75 | Blanco/rosa |
| T | Marrón | 38 | Blanco | 76 | Verde |
| U | Blanco | 39 | Amarillo/anaranjado | 77 | Verde |
| V | Morado oscuro | 40 | Blanco/gris/marrón | 78 | Verde oscuro |
| W | Morado claro | 40b | Amarillo/marrón | 79 | Verde |
| 1 | Mostaza | 41 | Rosa grisáceo | 80 | Rojo |
| 2 | Marrón | 42 | Marrón | 81 | Blanco |
| 3 | Azul-verdoso | 43 | Rosado | 82 | Rojo |
| 4 | Marrón | 44 | Marrón oscuro | 83 | Rojo oscuro/negro |
| 5 | Verde oscuro | 45 | Marrón claro/rosa | 84 | Blanco |
| 6 | Verde claro | 46 | Gris | 85 | Marrón |
| 7 | Gris | 47 | Marrón | 86 | Blanco |
| 8 | Marrón | 47b | Gris/rosado | 87 | Rojo |
| 9 | Marrón | 48 | Marrón | 88 | Gris claro |
| 10 | Marrón verdoso | 48b | Rosado | 89 | Marrón grisáceo |
| 11 | Verde | 49 | Marrón claro | 90 | Morado |
| 12 | Mostaza | 50 | Blanco | 91 | Celeste verdoso |
| 13 | Verde oscuro | 51 | Morado | 92 | Gris verdoso |
| 15 | Verde | 52 | Rojo | 93 | Verde |
| 16 | Marrón | 53 | Marrón oscuro | 94 | Verde oscuro |
| 17 | Verde claro | 54 | Blanco/amarillo claro | 95 | Verde |
| 18 | Marrón rojizo | 55 | Rosado | 96 | Verde grisáceo |
| 19 | Rosa claro | 56 | Azul verdoso | | |

4.3.6 Toma de micromuestras por parte del Taller de Conservación y Restauración de la Iglesia San Pedro de Lima

La toma de micromuestras fue realizada en el taller de conservación de la iglesia San Pedro de Lima por un conservador calificado. Usualmente, esta toma se realiza en lugares que no supongan un daño mayor (o al menos visible) a la obra, como los bordes o craqueladuras ya existentes. En lo posible se procura no hacerlo en los rostros. La persona encargada de esta tarea utilizó un bisturí de hoja de punta, con el cual se realizó un corte triangular y profundo, procurando tomar todas las capas. En la Figura 17 se muestran las zonas de las cuales se extrajeron las micromuestras, y en la Tabla 10 se detalla el color principal de las mismas. En la mayor parte de los casos, las micromuestras obtenidas sufrieron fragmentaciones posteriores, y cada fragmento fue ser tratado como una micromuestra independiente.

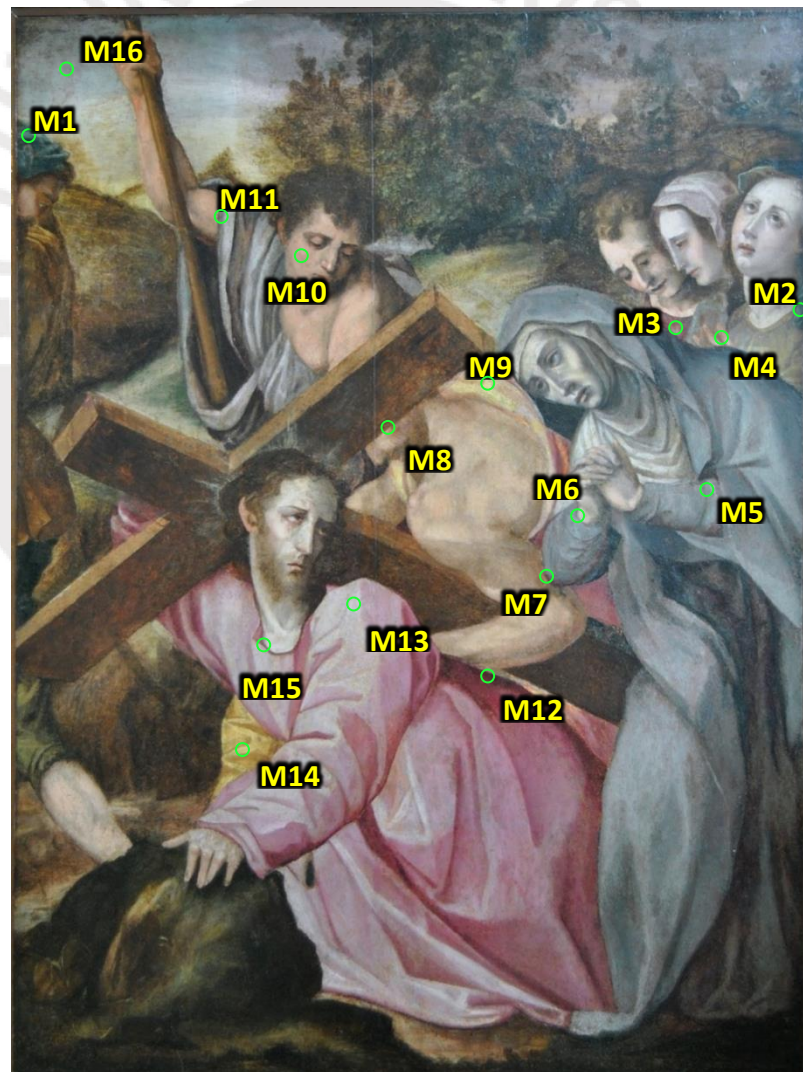


Figura 17. Zonas de toma de micromuestras. [Colección Compañía de Jesús, Comunidad de San Pedro].

Tabla 10. Micromuestras obtenidas de la obra “El Señor de la Caída”.

| PUNTO | COLOR | PUNTO | COLOR |
|-------|---------------|-------|--------------------|
| M1 | Verde | M9 | Amarillo |
| M2 | Verde | M10 | Rosado |
| M3 | Rojo | M11 | Verde |
| M4 | Rosado | M12 | Rojo oscuro-carmín |
| M5 | Azul grisáceo | M13 | Rosado pálido |
| M6 | Rosado | M14 | Amarillo |
| M7 | Marrón-rojizo | M15 | Blanco |
| M8 | Rosado | M16 | Verde/anaranjado |

4.3.7 Examinación de micromuestras por microscopía óptica

Los fragmentos de las micromuestras M1 – M16 se observaron bajo el microscopio con luz visible para determinar cuáles se podrían utilizar para los análisis siguientes. Una buena micromuestra cuenta con todas las capas estratigráficas; es decir, incluye el barniz, la capa o capas pictóricas, una posible capa de aparejo y la capa de preparación. También es posible que se incluya parte de la capa de soporte (el cual no fue el caso para este estudio). Sólo aquellas micromuestras que cumplieron estas características fueron montadas usando una resina epóxica de curado rápido.

4.3.8 Montaje de micromuestras en resina

Se preparó una mezcla de resina epóxica de dos componentes en una cubeta de jebe (de tamaño 1 x 1 x 1 cm). Se llenó hasta la mitad de su capacidad y se dejó curar al menos por un día. De esta forma se generó un soporte sobre el cual se colocó la micromuestra. Tras ello se preparó otra mezcla de resina epóxica de dos componentes y se cubrió la micromuestra hasta completar la capacidad de la cubeta, cuidando que no se formaran burbujas. Se dejó curar al menos un día, hasta que la resina estuviera completamente endurecida.

Se procedió a cortar la resina con una sierra de joyero hasta el punto donde se encontraba la micromuestra. A partir de ahí se utilizaron lijas de diferentes grosores para pulir la resina y dejar al descubierto las capas que conforman la micromuestra (sección transversal). La inspección de la micromuestra soportada en resina fue realizada utilizando un microscopio óptico. Un fragmento de micromuestra de cada punto de obtención (Tabla 10) fue montado en resina de dos componentes. Estos fragmentos montados en resina epóxica fueron codificadas como SC1 – SC16, respectivamente.

4.3.9 Análisis de micromuestras mediante microscopía óptica y fluorescencia ultravioleta

Se utilizó un microscopio Zeiss Axio Imager.M2m con fuentes de excitación de luz visible, 365 nm, 405 nm y 485 nm. Se tomaron fotografías de las dieciséis micromuestras montadas en resina, ampliadas con una magnificación de 200X.

4.3.10 Análisis de micromuestras por microespectroscopía Raman

Se utilizó un espectroscopio Raman de sobremesa con microscopio confocal Renishaw inVia, con fuentes de excitación de 532 nm y 785 nm. Los espectros se obtuvieron variando las condiciones de tiempo de exposición al láser, tiempo de muestreo, número de repeticiones y potencia del láser para cada punto analizado. Se probaron también algunas funciones disponibles en el software, como la eliminación de rayos cósmicos y la minimización de la exposición de la muestra al láser. Se mejoraron los resultados cerrando todo lo posible el diafragma del microscopio antes de realizar el análisis. El uso del modo pinhole – ON no permitió obtener señales útiles (sólo se observó ruido), por lo que no se recomienda su uso para este análisis.

Los espectros Raman obtenidos fueron procesados con el programa Horiba LabSpec 5 y comparados con los espectros disponibles en las bases de datos gratuitas en internet:

- Cultural Heritage Science Open Source (CHSOS)
<https://chsopensource.org/download/8102/>
- University College London (UCL Chemistry)
<http://www.chem.ucl.ac.uk/resources/raman/>

Si bien estas bases de datos cuentan con información útil sobre los compuestos analizados, es preferible contar con una base de datos propia —usando el mismo equipo y condiciones con los que se analizaron las muestras de la obra—. Se dispuso de una tabla con pigmentos obtenida de la organización Cultural Heritage Science Open Source (<https://chsopensource.org/tools-2/pigments-checker/>), la cual presenta varios materiales usados en obras de diferentes épocas. A partir de dicha tabla, se creó una base de datos propia usando el microscopio Raman Renishaw inVia, usando las fuentes de excitación de 633 y 785 nm a diferentes intensidades.^[74]

4.3.11 Análisis de micromuestras mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a espectroscopía de rayos X por energía dispersiva (SEM/EDS)

La resina que soportaba a la micromuestra fue cortada a un grosor de entre 1 a 2 mm y luego fue cubierta con pintura de carbono, dejando libre la zona de la muestra y una pequeña parte de sus alrededores. Luego, fue llevada al microscopio electrónico de barrido. Se utilizó el software TEAM EDAX para el manejo del equipo y la adquisición de datos. Se ajustó la distancia de trabajo (WD, *working distance* por sus siglas en inglés) a una distancia de 10 mm. Los análisis de las muestras fueron realizados tanto a bajo como alto vacío. Se realizaron análisis puntuales, mapeos (información elemental en un área) y análisis lineales (información elemental en una línea de cierto grosor).

4.3.12 Análisis de micromuestras mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Se diluyó una ampolla de 1 mL de Methprep II con 2 mL de tolueno. De esta manera se contó con una solución Methprep II / tolueno 1:2 como agente derivatizante, el cual es muy útil ya que realiza la metilación de diversos compuestos sin necesidad de un tratamiento previo. La utilidad de este reactivo para análisis de obras de arte fue demostrada en un trabajo previo de White y colaboradores (1996),^[75] así como en un método estándar (ASTM D5974-15)^[76] para la determinación de ácidos grasos y de colofonia por cromatografía de gases.

4.3.12.1 Derivatización de muestras para análisis de barnices

El análisis de los barnices disponibles (colofonia, copal y dammar) se realizó según el procedimiento descrito a continuación, adaptado del trabajo de Andreotti y colaboradores (2006).^[61]

En un reactivial se colocó 1 mg de una resina y se agregaron 300 µL de hidróxido de potasio al 10% en etanol al reactivial. Se calentó el reactivial por 4 horas a 85 °C usando un bloque de calentamiento y, tras dejar enfriarlo unos minutos, el contenido fue trasvasado a otro vial (fracción acuosa), usando dos porciones de 100 µL de agua destilada para mejorar la recuperación de la muestra saponificada. A continuación, se añadió una porción de 200 µL de hexano al vial con la fracción acuosa y se agitó brevemente. Tras la separación de las fases se extrajo la fracción orgánica en otro vial (fracción de hexano). Se repitió la extracción con dos porciones adicionales de 200 µL de hexano. A la fracción acuosa se le

agregó gota a gota una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TF) en agua 1:1 hasta alcanzar un pH de 1. Posteriormente se añadió una porción de 200 μL de éter etílico al vial con la fracción acuosa tratada previamente y se agitó brevemente. Tras la separación de las fases se extrajo la fracción orgánica en otro vial (fracción etérea). Se repitió la extracción con dos porciones adicionales de 200 μL de éter etílico.

Se tomó una alícuota de 100 μL de la fracción etérea y se colocó en un reactival. Usando un flujo suave de nitrógeno se evaporó el éter etílico y se añadieron 50 μL de Methprep II / tolueno 1:2 al reactival. El reactival fue calentado por una hora a 60 °C usando un bloque de calentamiento y, tras dejarlo enfriar unos minutos, todo el contenido fue vertido en un inserto de vidrio. Finalmente, 150 μL de tolueno fueron agregados al inserto para completar un volumen final de 200 μL , del cual se inyectó 1 μL en el cromatógrafo de gases usando un inyector automático.

4.3.12.2 Derivatización de ácidos grasos para validación del método analítico

El procedimiento de derivatización descrito a continuación fue adaptado de los trabajos de Andreotti y colaboradores (2006),^[61] así como de Lluveras y colaboradores (2010).^[60]

Se preparó un estándar de cada ácido graso libre en acetona: palmítico (0,29248 mg/g), esteárico (0,4946 mg/g) y tridecanoico (0,17063 mg/g). La concentración de todos los ácidos grasos fue descrita en términos de miligramos de ácido graso por gramo de solución total (ácido graso más acetona). Se colocó el volumen elegido de cada ácido graso en un mismo reactival y se anotó la masa de cada solución de ácido graso añadida. A continuación, se agregó la cantidad elegida de solución de ácido tridecanoico y se anotó su masa. Usando un flujo suave de nitrógeno se evaporó toda la acetona del reactival. 30 μL de Methprep II / tolueno 1:2 fueron añadidos al reactival y este se calentó por una hora a 60 °C usando un bloque de calentamiento. Luego de dejar enfriar el reactival unos minutos, se vertió el contenido en un inserto de vidrio al cual se le añadieron 170 μL de tolueno al inserto para completar un volumen final de 200 μL .

Para preparar el blanco de análisis se agregaron 20 μL de acetona (con la que fueron preparados los estándares de ácidos grasos) a un reactival. Acto seguido, la acetona fue evaporada con un flujo de nitrógeno. Tras ello, 30 μL de Methprep II / tolueno 1:2 fueron añadidos al reactival y este fue calentado por una hora a 60 °C usando un bloque de calentamiento. Luego de dejar enfriar el reactival unos minutos, se vertió el contenido en un inserto de vidrio al cual se le añadieron 170 μL de tolueno al inserto para completar un volumen final de 200 μL . Se inyectó 1 μL de cada muestra derivatizada al cromatógrafo de gases utilizando un inyector automático.

Este procedimiento fue utilizado para generar las curvas de calibración con los que se verificaría la linealidad del método aplicado. Se agregaron los ácidos grasos en cada vial y se reportó la masa de cada uno tras la evaporación del solvente en la Tabla 11.

Tabla 11. Masas de ácidos grasos usados para la generación de la curva de calibración del método empleado. Para ello, se realizó el análisis por triplicado para cada uno de los puntos de la curva.

| VIAL | MASA DE ÁCIDOS GRASOS | | |
|-------|-----------------------|----------------|-------------------|
| | Palmítico (mg) | Estearico (mg) | Tridecanoico (mg) |
| AG0_1 | 0,00000 | 0,00000 | 2,27708 |
| AG0_2 | 0,00000 | 0,00000 | 2,29216 |
| AG0_3 | 0,00000 | 0,00000 | 2,29216 |
| AG1_1 | 0,17549 | 0,34622 | 2,30724 |
| AG1_2 | 0,26323 | 0,39568 | 2,26200 |
| AG1_3 | 0,20474 | 0,29676 | 2,27708 |
| AG2_1 | 1,08218 | 1,18704 | 2,26200 |
| AG2_2 | 1,08218 | 1,18704 | 2,26200 |
| AG2_3 | 1,08218 | 1,08812 | 2,30724 |
| AG3_1 | 4,41645 | 5,44060 | 2,27708 |
| AG3_2 | 4,41645 | 5,58898 | 2,27708 |
| AG3_3 | 4,47494 | 5,83628 | 2,33740 |
| AG4_1 | 6,63930 | 7,56738 | 2,26200 |
| AG4_2 | 6,63930 | 7,46846 | 2,30724 |
| AG4_3 | 6,58080 | 7,56738 | 2,32232 |

4.3.12.3 Derivatización de muestras de pintura

La identificación de resinas se realizó mediante el procedimiento descrito en la sección 4.3.12.2, mientras que para efectuar la identificación de aglutinantes se siguió el procedimiento descrito a continuación:

En un reactival se colocaron 15,1 mg de la solución de ácido tridecanoico (estándar interno) en acetona (0,1508 mg/g) y se evaporó con un flujo de nitrógeno suave. Se depositó la muestra de pintura (de peso menor a 0,1 mg) en el reactival y se derivatizó con 30 μ L de Methprep II / tolueno 1:2 a 60 °C por una hora. Tras unos minutos de enfriamiento, todo el contenido fue colocado en un inserto de vidrio dentro de un vial de 1,5 mL y se completó a un volumen de 200 μ L con 170 μ L de tolueno. Finalmente, 1 μ L de la solución derivatizada fue inyectada al equipo usando el inyector automático.

La diferencia en el volumen de Methprep II / tolueno 1:2 usado entre ambos procedimientos fue tomado del trabajo de Manzano y colaboradores (2011).^[67] En dicha investigación demostraron que el volumen de Methprep II / tolueno 1:2 óptimo es de unos 15 μ L para las

cantidades que analizan. Puesto que las masas de ácidos grasos que se utilizaron en su investigación son comparables a las del presente trabajo, se decidió reducir el volumen de Methprep II / tolueno 1:2 hasta 30 μL para asegurar la derivatización completa de los componentes analizados.

4.3.12.4 Análisis cromatográfico de las muestras derivatizadas

Se llevaron los viales al equipo, se colocaron en el muestreador automático y se programaron los métodos cromatográficos. Para el análisis cualitativo de las resinas se utilizó una columna Agilent DB-5ms de 30 metros de longitud, 0,25 mm diámetro y 0,25 μm de grosor de película. Los parámetros de las corridas cromatográficas realizadas, descritos en la Tabla 12, fueron adaptados del trabajo de Schilling y colaboradores (2004).^[77]

Los modos de análisis disponibles en el equipo fueron SCAN (un barrido de todos los iones en el intervalo programado por el método) y SIM (monitoreo de uno o más iones específicos). El modo SCAN fue utilizado en exploraciones iniciales, el cual abarcó el rango de 45 – 700 unidades de masa atómica (u.m.a.). Este modo permitió la identificación de los iones característicos y comunes de cada compuesto. A partir de esta información se utilizó el modo SIM, el cual fue utilizado para identificar los tiempos de retención de los marcadores característicos presentes en cada resina y así encontrar su identidad.

Tabla 12. Parámetros de las corridas cromatográficas utilizadas en el análisis cualitativo de resinas.

| PARÁMETRO | VALOR |
|--------------|--|
| Gas portador | Helio / 11,327 psi (presión constante) |
| Entrada | Splitless, 300°C |
| Horno | 55 °C (2 minutos), 10 °C/min hasta 315 °C (17 minutos). Temp. Máxima: 320 °C |
| Inyección | 1 μL |

Los cromatogramas y espectros de masa obtenidos fueron procesados utilizando el software Agilent MassHunter y el programa AMDIS (con la base de datos NIST).

Para el análisis cuantitativo de los ácidos grasos en las muestras de pintura y de aceites se utilizó una columna Agilent DB-23 de 30 metros de longitud, 0,25 mm diámetro y 0,25 μm de grosor de película. El fabricante asegura que esta columna ha sido diseñada específicamente para la separación de ácidos grasos, lo cual es útil para la determinación cuantitativa de los mismos. Los parámetros de la corrida cromatográfica (ver Tabla 13)

fueron adaptados del trabajo de Zou y Wu (2017) ^[78] para el uso de un espectrómetro de masas en lugar de un detector FID.

Tabla 13. Parámetros de las corridas cromatográficas utilizadas en el análisis de ácidos grasos en muestras reales.

| PARÁMETRO | VALOR |
|--------------|---|
| Gas portador | Helio / 12,051 psi (presión constante) |
| Entrada | Split, 250 °C, ratio de split 30:1 |
| Horno | 50 °C (1 minuto), 25 °C/min hasta 175 °C, 4 °C/min hasta 230 °C (5 minutos). Temp. Máxima: 260 °C |
| Inyección | 1 µL |

Los cromatogramas y espectros de masa obtenidos fueron procesados utilizando el software Agilent MassHunter y el programa de código abierto OpenChrom Community Edition (Dalton), v.1.3.0. Estos programas permitieron la integración de las áreas de los picos correspondientes a los ácidos grasos analizados.

4.3.13 Identificación de colorantes orgánicos mediante espectrometría de masas por ionización/desorción asistida por matriz (MALDI-MS)

Se preparó una solución en metanol de la matriz 9-aminoacridina (1 µg/mL) y de ácido carmínico (10 µg/ml). Adicionalmente se realizó una extracción de una micromuestra de pintura utilizando 100 µL de metanol en un baño de ultrasonido (42kHz) por una hora. Cada muestra (la solución de ácido carmínico y el extracto de pintura) fue mezclada con la solución de matriz en una relación 1:1 en volumen y se realizó una deposición de 1 µL de cada solución sobre una placa metálica, de tal forma que la muestra se distribuyera uniformemente en cada diana. La reproducibilidad de un análisis mediante ionización MALDI depende de una preparación correcta de la matriz y del analito que se coloca en ella, así como la deposición uniforme de la muestra sobre la placa metálica, la intensidad del láser, la energía de colisión (para la espectrometría de masas en tándem) y otros parámetros, por lo que es necesario realizar múltiples pruebas previas con la matriz y las muestras problema para optimizar el experimento.

Se utilizó un espectrómetro de masas Thermo Scientific Q Exactive HF acoplado a una fuente de ionización MassTech AP/MALDI. El ion base de la 9-aminoacridina ($m/z = 193,077$) fue utilizado para determinar la potencia del láser necesaria en el estudio, la cual fue programada al 40,5 % del valor máximo. Las muestras fueron analizadas mediante un movimiento en espiral de la placa, tal como se muestra en la Figura 18. En la Tabla 14 se muestran los parámetros de adquisición de iones en el software Q Exactive HF Tune del

espectrómetro de masas. Los archivos fueron adquiridos con el formato “.RAW” y fueron visualizados en el mismo programa. Adicionalmente, se utilizó un programa de código abierto (ProteoWizard SeeMS 3.0.18180.0) para visualizar los espectros de masa, así como generar “mapas de calor”. Estos “mapas de calor” son representaciones en dos dimensiones de los tiempos de escaneo versus cada espectro de masa, y la intensidad de cada fragmento hallado se puede interpretar según su color: mientras más cercano al azul se encuentre (más “frío”) tendrá menor intensidad, y mientras más cercano al rojo (más “caliente”) tendrá mayor intensidad.

Tabla 14. Parámetros definidos en el programa de control del espectrómetro de masas Thermo Fisher Q Exactive HF.

| MODO | PARÁMETRO | VALOR |
|--|--|----------------|
| MODO DE UN SOLO ION (SIM) | Polaridad | Negativa |
| | Carga por defecto | 1 |
| | Resolución | 60000 |
| | Objetivo de control de ganancia automática (<i>AGC target</i>) | $5 \cdot 10^4$ |
| | Máximo tiempo de inyección | 100 ms |
| | Cuenta de bucles (<i>loop count</i>) | 5 |
| | Ventana de aislamiento | 1,5 m/z |
| ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DEPENDIENTE DE DATOS (dd-MS ²) | Resolución | 60000 |
| | Objetivo de control de ganancia automática (<i>AGC target</i>) | $2 \cdot 10^5$ |
| | Máximo tiempo de inyección | 100 ms |
| | Cuenta de bucles (<i>loop count</i>) | 5 |
| | Ventana de aislamiento | 1,5 m/z |
| | Primera masa fija | Ninguna |
| PARÁMETROS DE IONES ANALIZADOS POR dd-MS ² | Energía normalizada de colisión (<i>NCE</i>) | 35 |
| | Umbral de control de ganancia automática (<i>AGC target</i>) | $8 \cdot 10^3$ |
| | Umbral de intensidad | $8 \cdot 10^4$ |
| | Disparador de máxima señal (<i>Apex trigger</i>) | Ninguno |
| | Exclusión de isótopos | Encendido |
| | Exclusión de carga | Ninguno |
| | Coincidencia con estructura peptídica (<i>Peptide match</i>) | Ninguno |
| Exclusión dinámica | 10 s | |

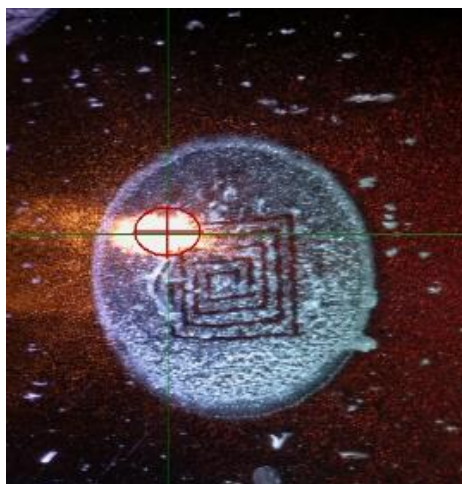


Figura 18. Detalle del patrón de vaporización en espiral programado para el análisis de muestras por MALDI-MS. El material de color blanco corresponde a la mezcla de la matriz con la muestra, depositada sobre la placa metálica.

4.3.14 Identificación de material proteico en micromuestras mediante tinciones

Para verificar la presencia de material proteico presente en una muestra de pintura se preparó una solución de Ponceau S al 3% en ácido acético un día antes del análisis, tal como es recomendado en la referencia.^[73] A partir de esta solución se preparó una dilución de 1:8 en volumen con ácido acético, de tal forma que se pudieran observar las diferencias entre la tinción con diferentes concentraciones de Ponceau S.

Se efectuó la tinción sobre dos micromuestras montadas en resina colocando una gota de la solución de Ponceau S sobre las capas expuestas por el pulido. Tras 20 minutos, se lavaron las micromuestras con agua destilada y se llevaron al microscopio para su observación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio inicial de la obra sin obtención de micromuestras

5.1.1 Estudio *in situ* por fluorescencia ultravioleta y reflectancia infrarroja

En el estudio exploratorio por luz ultravioleta se observó que toda la obra presentaba fluorescencia de color entre blanco, azul y verde, y ciertas zonas se veían más oscuras. En la Figura 19 se muestra las fotografías de fluorescencia ultravioleta de varias zonas de la obra (encerradas en rectángulos rojos). Los puntos oscuros podrían representar zonas de posibles retoques recientes (como parte de las intervenciones a esta obra) o evidenciar la falta de fluorescencia de otros pigmentos, tal como puede ocurrir con compuestos de cobre.^[35]

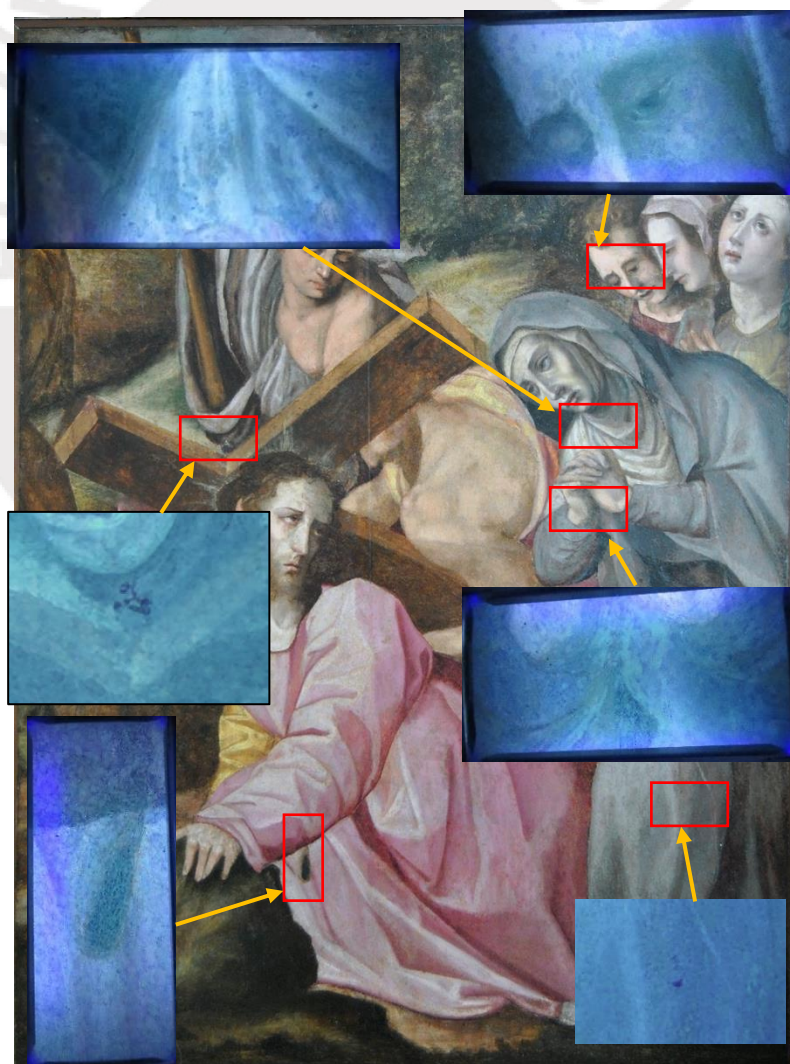


Figura 19. Imagen de fluorescencia ultravioleta de la obra “El Señor de la Caída”.

Como se discutió anteriormente en la sección 3.5.1, la coloración azul/verdosa observada podría deberse a la presencia de blanco de plomo en conjunto con aceite de linaza o a la presencia de algún barniz en la pintura. Por esta razón resultó necesario caracterizar los aglutinantes y resinas presentes en la obra.

En las imágenes obtenidas por reflectancia infrarroja se observaron zonas claras y oscuras, tal como se puede observar en la Figura 20. Esto se puede deber a la presencia de compuestos que absorben esta radiación, como pueden ser tierras oscuras y pigmentos negros.^[38,79] Adicionalmente, en la figura 21 se observan con claridad algunos trazos de corrección en la cruz, cerca al personaje P5.

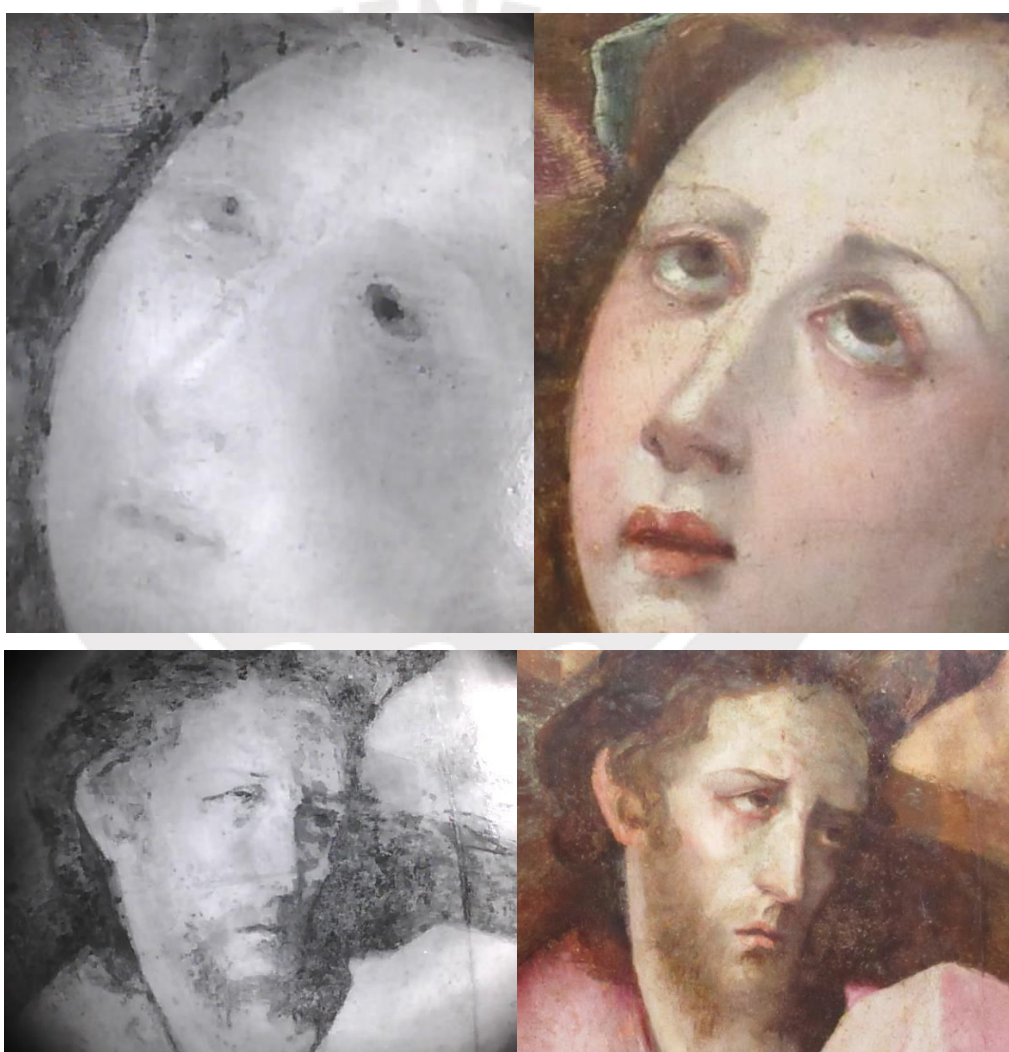


Figura 20. Fotografía por reflectancia infrarroja (izquierda) y por luz visible (derecha) de los personajes P9 (arriba) y P4 (abajo).

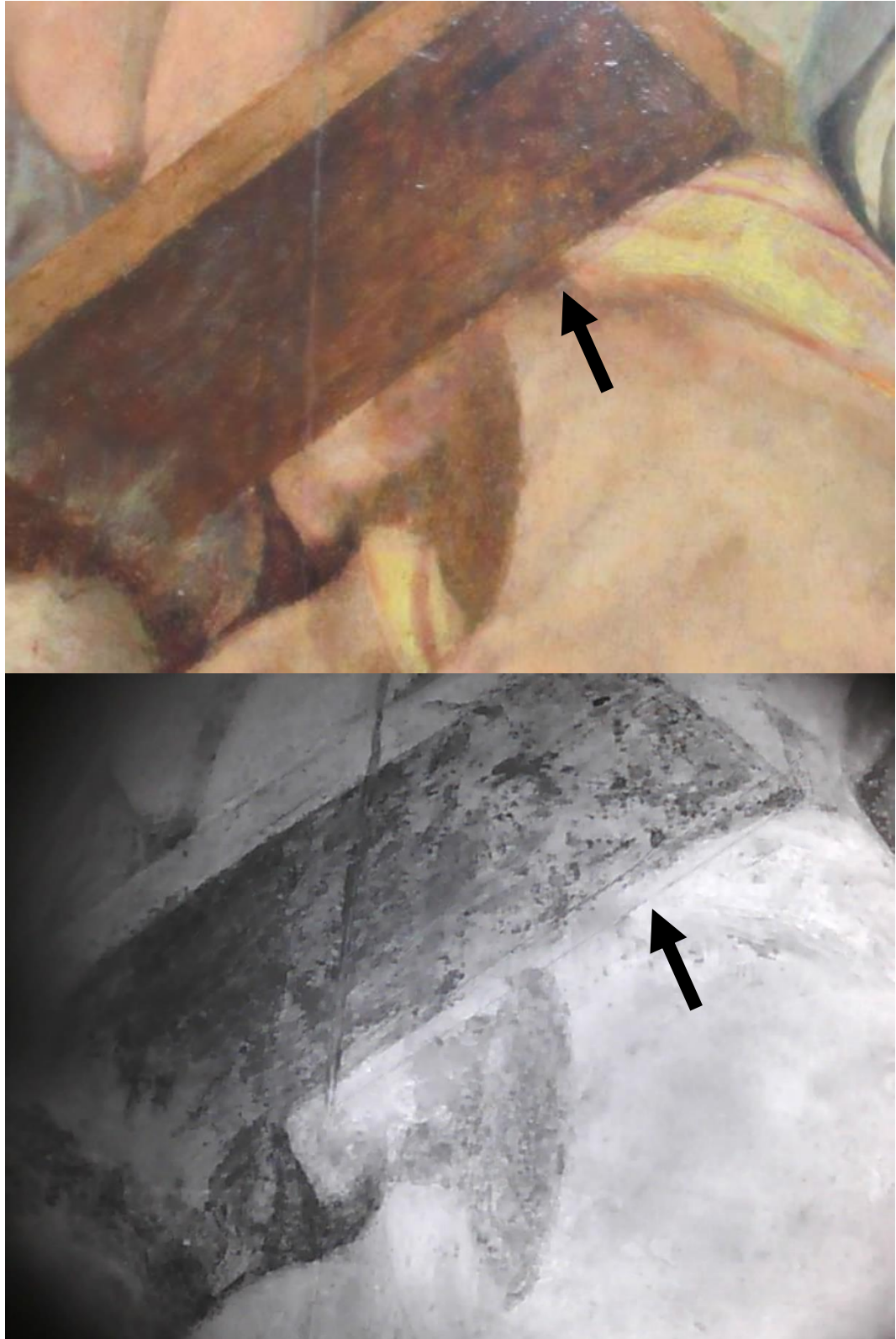


Figura 21. Comparación entre la fotografía de luz visible (arriba) y de reflectancia infrarroja (abajo) del madero cerca del personaje P5. Las flechas indican el lugar donde es apreciable el trazo correctivo de la cruz.

5.1.2 Estudio de la obra mediante radiografías

Se obtuvieron las radiografías por zonas, tal como se mencionó en la sección de metodología. Se observaron múltiples clavos y grapas que unen la madera en la parte posterior (ver Figura 22), así como los listones de madera que se observan en la Figura 4. Las pinceladas aplicadas en la obra son visibles mediante esta técnica ya que se observan patrones claros y oscuros en sucesión. Estos corresponden a las depresiones producidas por las cerdas de un pincel o una brocha al aplicar un pigmento. Para mejorar la visibilidad de estas pinceladas se utilizó un software de edición de imágenes (*GIMP 2*, Programa de manipulación de imágenes de GNU) para convertir las imágenes de escala de grises a falso color. Debido a que las radiografías no fueron uniformes (el brillo y contraste fue seleccionado por el operador del equipo de radiografía para una mejor visibilidad de los detalles), este falso color sólo se pudo utilizar de forma referencial debido a artefactos como el excesivo brillo en las imágenes. En la Figura 23 se observa una muestra de dicho procesamiento, en la que es posible apreciar trazos de mayor intensidad a los vistos en otras partes del cuadro cerca de estos personajes, encerrados en rectángulos rojos discontinuos. Estos trazos corresponden a algunas irregularidades que se pueden apreciar con dificultad en la obra bajo luz visible, lo cual podría indicar algún repinte o corrección importante en los personajes P7 y P8.

5.1.3 Estudio *in situ* por espectrometría de fluorescencia de rayos X (FRX)

Los análisis *in situ* por FRX en la obra permitieron sugerir algunos pigmentos y materiales que eran esperados para la época en la que vivó Bitti (finales del siglo XVI). Uno de los elementos que más se vio en toda la obra y con elevada intensidad fue el plomo. Posiblemente se tratara de blanco de plomo, muy utilizado en ese entonces como una base debido a su alto poder cubriente ^[9] y también como reductor de tonos de otros pigmentos. Dicho pigmento es bastante tóxico, por lo que su uso fue menguando en años posteriores al descubrirse otros pigmentos blancos. Otro elemento que se encontró extensivamente en la obra fue el mercurio. Este elemento corresponde con seguridad al bermellón (sulfuro de mercurio, HgS), de color rojo intenso y alta toxicidad, puesto que no se usaban otros pigmentos a base de este elemento.



Figura 22. Radiografía de la zona superior izquierda de la obra. Obsérvese los numerosos clavos y grapas usadas para ajustar la madera, vistos como líneas blancas delgadas.

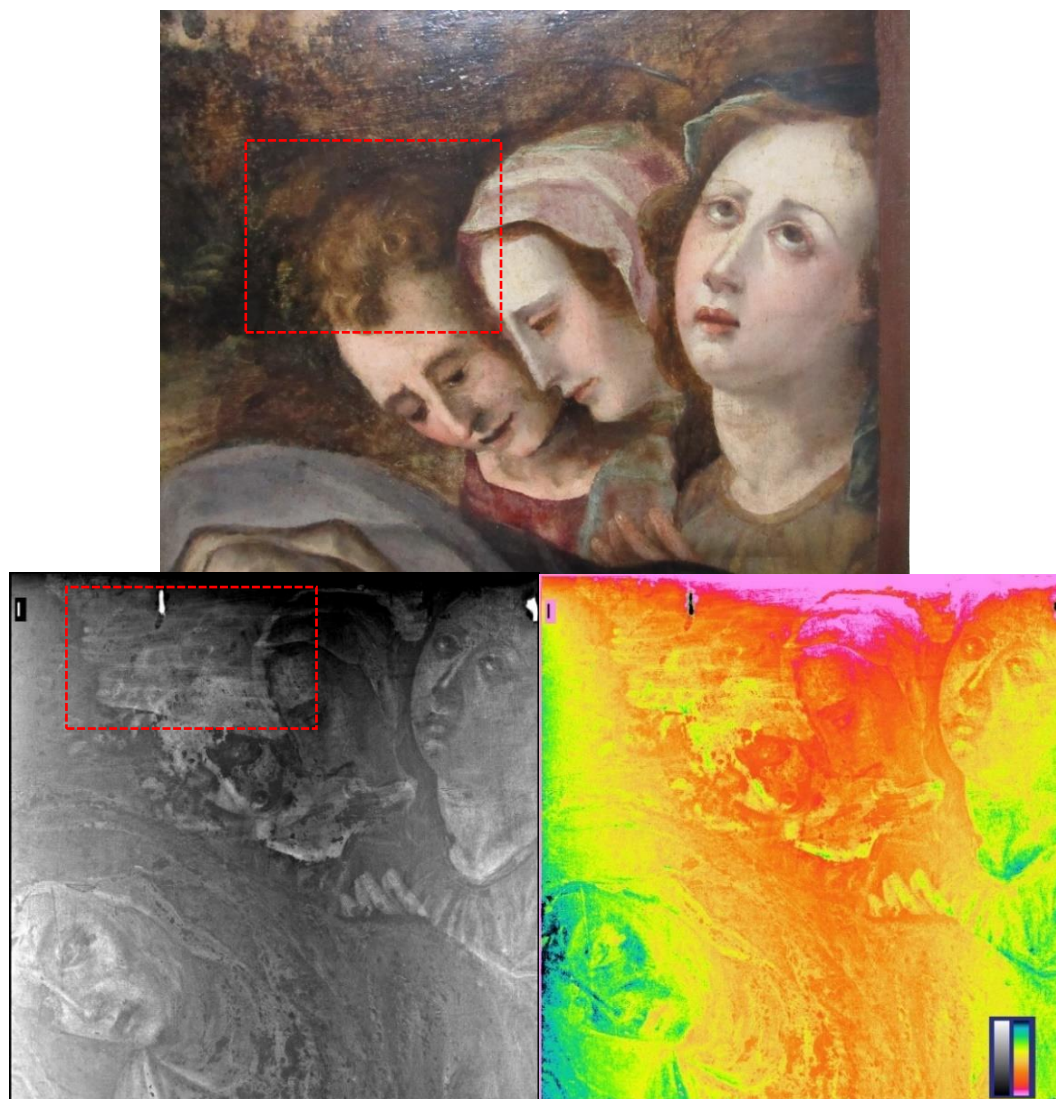


Figura 23. Ejemplo de procesamiento en falso color de las radiografías. Arriba: Imagen a color de esta zona del cuadro. Abajo: radiografía original (izquierda) e imagen de falso color (derecha).

Los colores observados en los rostros de varios de los personajes se ven excesivamente blancos, a diferencia del rostro del personaje P3. El análisis por FRX de las encarnaciones (zonas que representan la piel) reveló que estas presentan un contenido elevado de bario y titanio, cuyos pigmentos blancos tienen una fecha de origen posterior a la época en la que se habría realizado la pintura: el blanco de titanio (TiO_2) se sintetizó a partir de 1920, mientras que el blanco de bario (BaSO_4) se sintetizó a partir del siglo XIX.^[80] Gracias a esta información se decidió no tomar micromuestras de estas zonas, puesto que se tratarían de un repinte. Cabe resaltar que en diversos puntos analizados de la obra se observó la presencia de cromo, selenio y cadmio, tal como se muestra en la Tabla 15. Debido a que

los pigmentos en base a estos elementos se comenzaron a utilizar a partir del siglo XIX, no formarían parte de la pintura original.^[22]

Tabla 15. Zonas que podrían tener algún repinte en base a los elementos encontrados por FRX y la fecha de uso reportada en la literatura.^[22]

| PUNTO DE ANÁLISIS (ver Tabla 9) | ELEMENTOS QUE EVIDENCIARÍAN UN REPINTE | MATERIALES PROPUESTOS |
|--|---|---|
| 16 | Cd, Se | Rojo de cadmio |
| 17 | Cr, Ti | Amarillo de cromo, verde de cromo, verde Viridiana, blanco de titanio |
| 12 | Cd | Amarillo de cadmio |
| 27 | Ti | Blanco de titanio |
| 34 | Ti | Blanco de titanio |
| 35 | Ti | Blanco de titanio |
| 36 | Ti | Blanco de titanio |
| 45 | Cr, Sr | Amarillo de estroncio |
| 46 | Ti | Blanco de titanio |
| 47 | Cr | Amarillo de cromo, verde de cromo |
| 64 | Ti | Blanco de titanio |
| 87 | Cr, Ti | Anaranjado de cromo, amarillo de cromo, blanco de titanio |
| 88 | Ti, Ba | Blanco de titanio, blanco de bario |
| 93 | Cr | Amarillo de cromo, verde de cromo, verde viridiana |
| 94 | Cr, Cd | Amarillo de cadmio, verde de cromo |
| 95 | Cr, Ti, Ba | verde de cromo, verde Viridiana, blanco de titanio, blanco de bario |

Ya que el mercurio no forma otros compuestos de color rojo, se puede identificar el bermellón con tan sólo esta técnica. El bermellón ha sido obtenido naturalmente del mineral cinabrio desde la antigüedad, pero a partir del siglo VIII se pudo producir de forma artificial.^[9,81] En la Tabla 16 se muestran los pigmentos y materiales propuestos en base al análisis por espectrometría de fluorescencia de rayos X. A partir de este análisis no se puede proponer la identidad de los pigmentos rosados presentes en la túnica de Cristo (personaje P5), los pigmentos violáceos (túnica del personaje P7) ni los marrones (aunque de estos últimos se sospecha el uso de un ocre debido a la presencia de hierro y potasio).

Los espectros usados para la propuesta de pigmentos y materiales se muestran en las dos páginas siguientes (Figura 24).

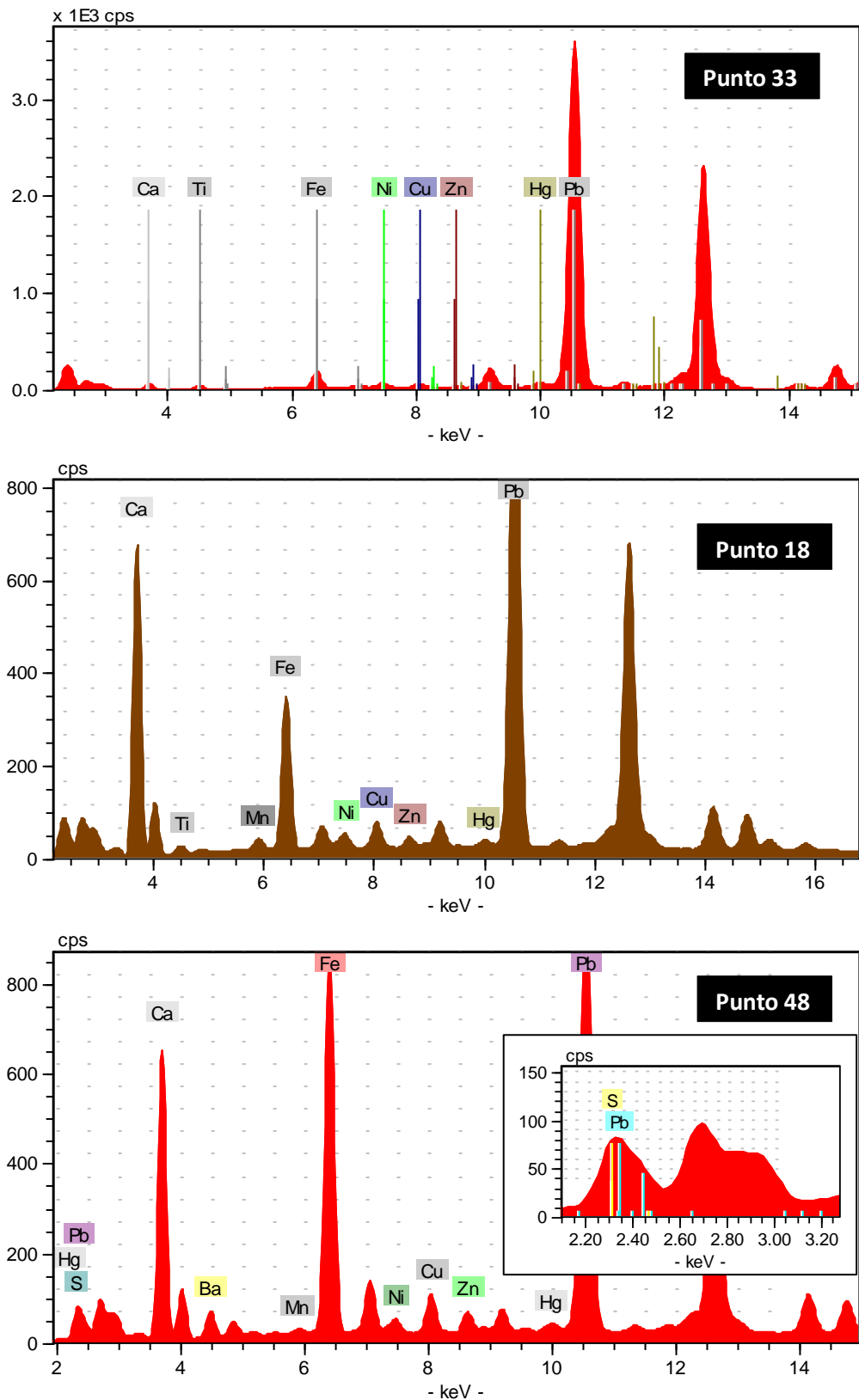


Figura 24. Espectros de FRX de diferentes puntos de la obra (ver Tabla 9). La escala de intensidad de los espectros fue modificada para una mayor claridad de los elementos mostrados. *[Continúa en la página siguiente]*

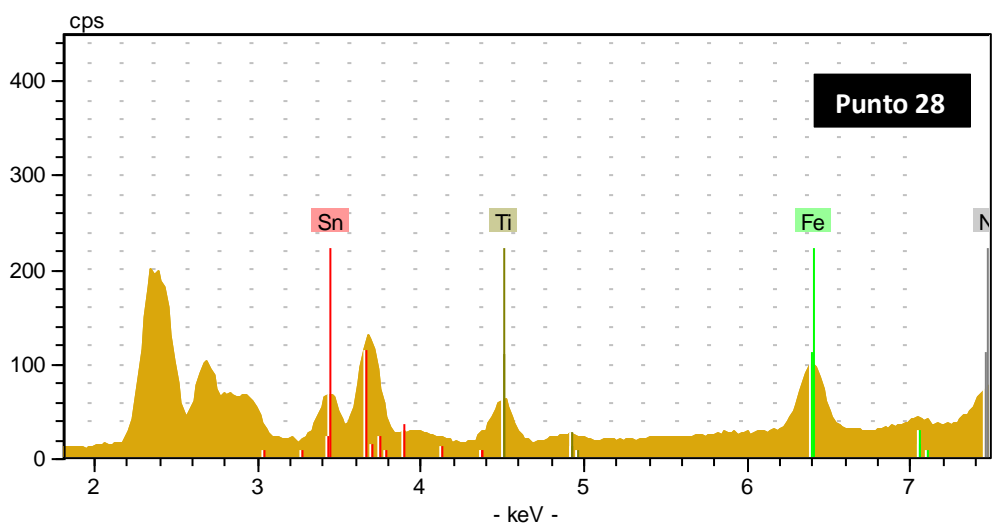
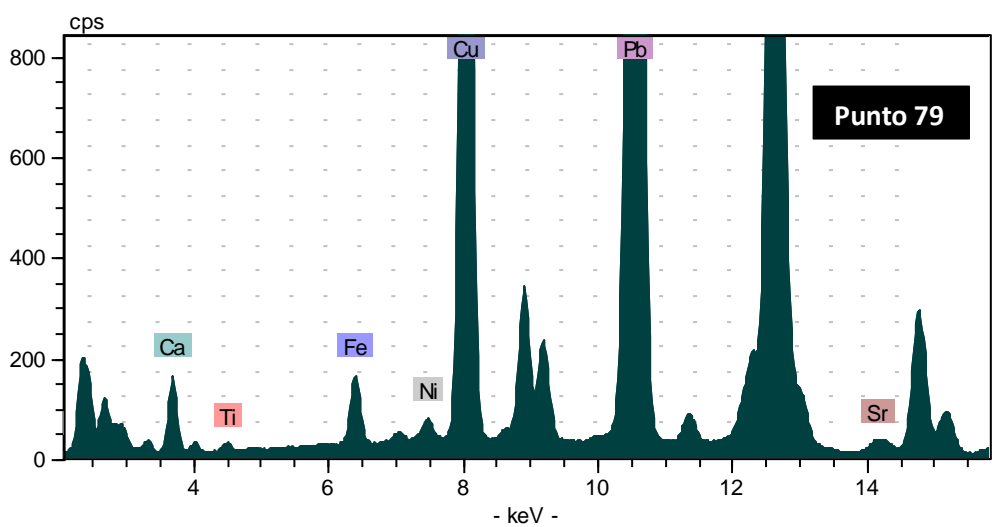
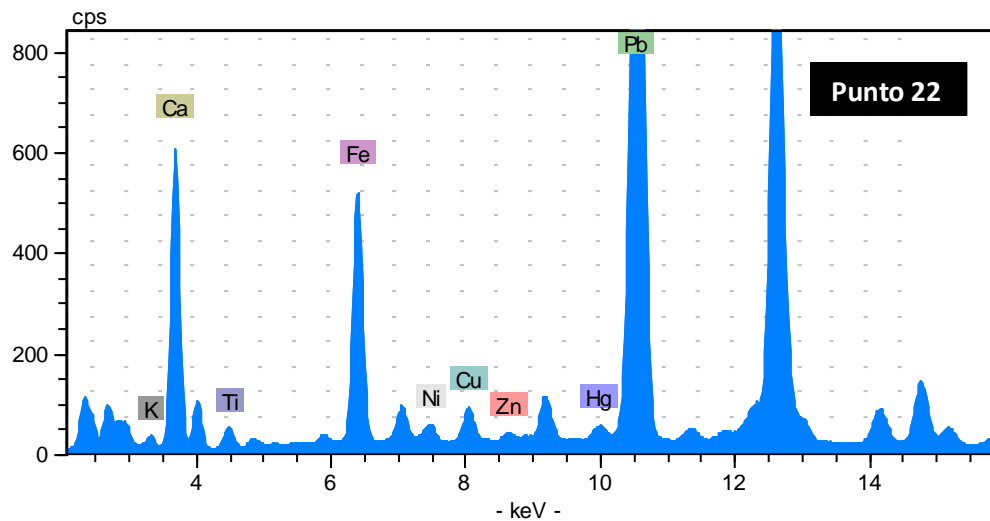


Figura 24. Espectros de FRX de diferentes puntos de la obra (ver Tabla 9). La escala de intensidad de los espectros fue modificada para una mayor claridad de los elementos mostrados.
[Continúa en la página siguiente]

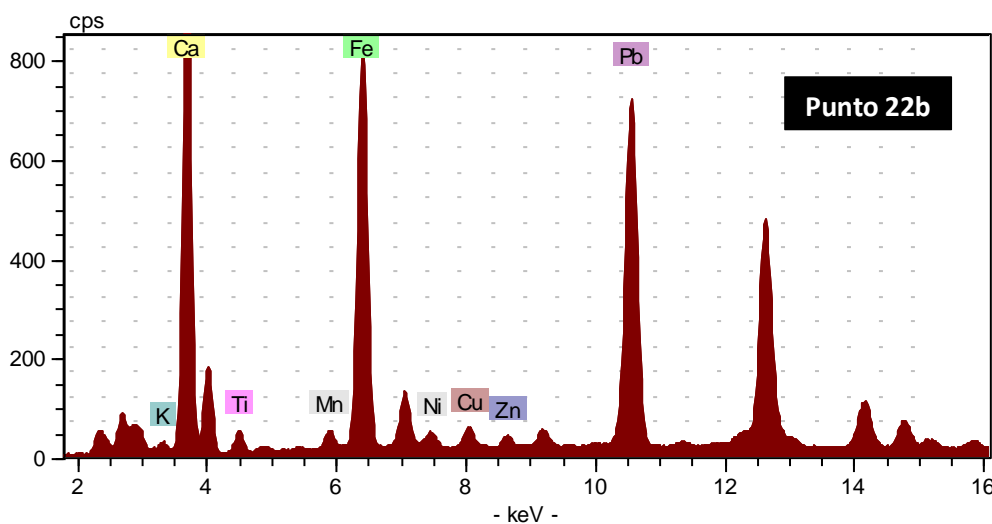
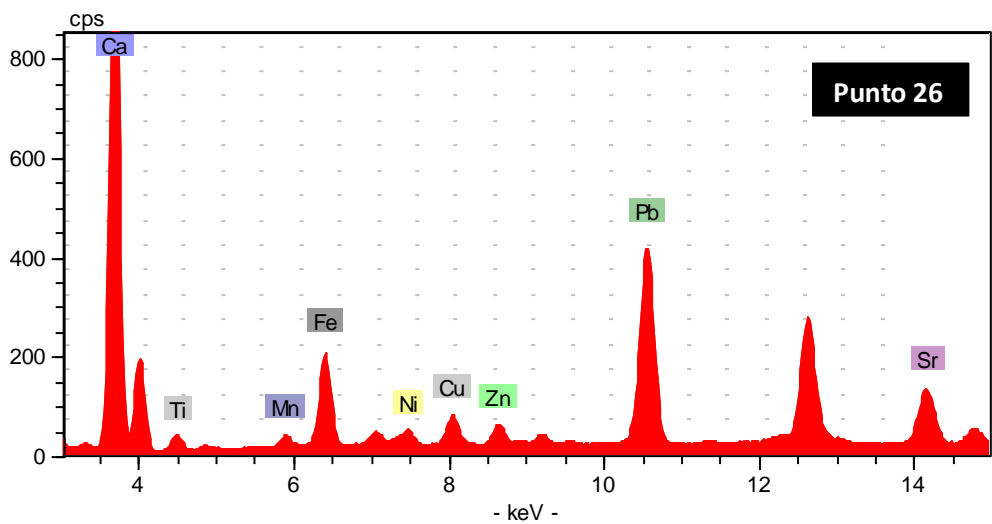
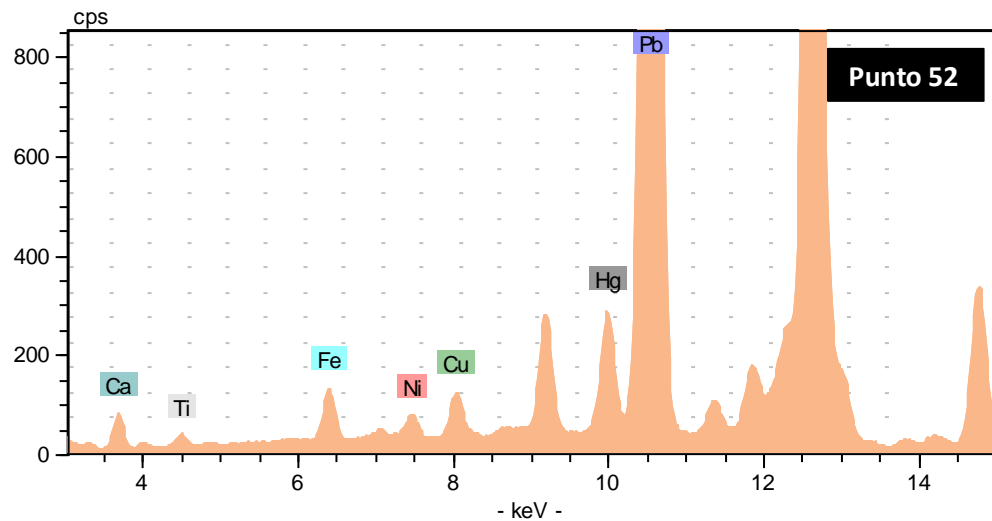


Figura 24. Espectros de FRX de diferentes puntos de la obra (ver Tabla 9). La escala de intensidad de los espectros fue modificada para una mayor claridad de los elementos mostrados. *[Continuación]*

Tabla 16. Pigmentos y materiales originales propuestos en base a los resultados del análisis por FRX.

| COLOR | ELEMENTOS REPRESENTATIVOS | PIGMENTOS Y MATERIALES PROPUESTOS | ESPECTRO DE FRX REPRESENTATIVO (ver Figura 24) |
|-------------------------|----------------------------------|--|---|
| Blanco | Pb | Blanco de plomo | 33 |
| | Ca | Calcita | 18 |
| Azul | Cu | Azurita | 22 |
| Verde | Cu | Malaquita / resinato de cobre | 79 |
| Amarillo | Pb, Sn | Amarillo de plomo y estaño (tipo 1 o 2) | 28 |
| Rojo | Hg, S | Bermellón (artificial) | 52 |
| | Pb | Rojo de plomo (minio) | 26 |
| Marrones | Fe (posiblemente Al, K, Si) | Ocres | 22b |
| Otros materiales | Ca, S | Yeso | 48 |

5.1.4 Análisis *in situ* usando microespectroscopía Raman

El análisis Raman *in situ* también evidenció la presencia de diversos componentes, incluyendo bermellón, blanco de plomo, sulfato de calcio (yeso) y amarillo de plomo-estaño. Sin embargo, la elevada fluorescencia Raman sólo permitió observar estos detalles en una cantidad reducida de espectros obtenidos. Por otro lado, los pigmentos de cobre no se pudieron diferenciar fácilmente con esta técnica, puesto que el fenómeno de fluorescencia no ayuda a la asignación de la identidad de dichos compuestos al ser mayor que la intensidad de las señales de los pigmentos.

Los puntos analizados fueron los mismos que los puntos numerados en la Figura 16. De esta forma, se pudo realizar una comparación con los posibles pigmentos y materiales analizados por FRX anteriormente. En la Figura 25 se muestran algunos espectros Raman con los que lograron evidenciar la presencia de los materiales descritos en la Tabla 17.

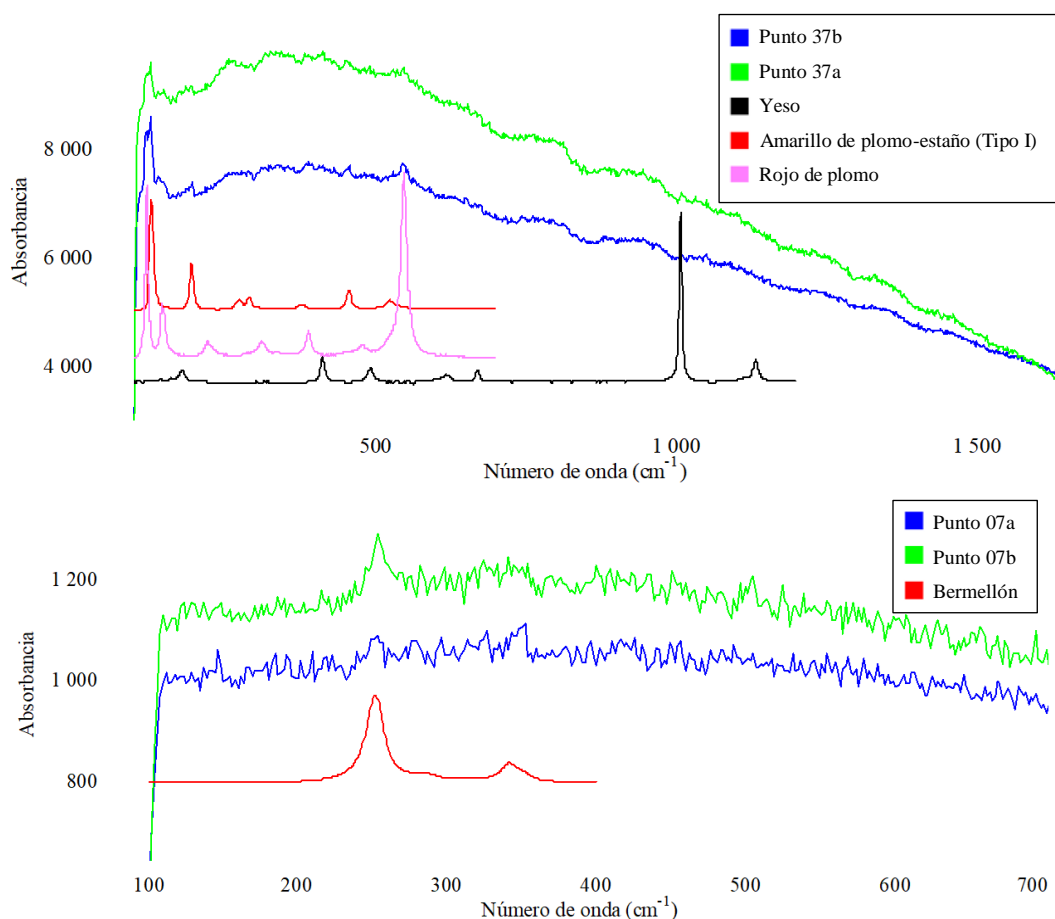


Figura 25. Arriba: espectros Raman obtenidos del punto 37, en los que se puede observar la presencia de yeso, amarillo de plomo-estaño y rojo de plomo. Abajo: espectros Raman obtenidos del punto 7, en los que se evidencia la presencia de bermellón.

Tabla 17. Pigmentos confirmados con el análisis Raman portátil (*in situ*).

| PIGMENTOS | PUNTOS ANALIZADOS | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 7 | 32 | 37 | 39 | 43 | 50 | 67 | 73 | 74 | 80 | 81 | 84 |
| Amarillo de plomo-estaño (tipo I) | • | | • | • | • | | | | | | | | |
| Bermellón | | • | | | | • | • | • | • | • | • | • | • |
| Rojo de plomo | | | | • | | | | | | | | | |
| Yeso | | | | • | | | | | | | | | |

La espectroscopía Raman *in situ* permitió identificar fácilmente la presencia de amarillo de plomo-estaño, bermellón y blanco de plomo. Sin embargo, no se identificaron otros compuestos debido a que la relación señal/ruido fue muy baja para cada caso. Se logró identificar yeso en un solo punto, por lo que fue necesario comprobar la presencia de este material en las micromuestras obtenidas.

5.2 Análisis de micromuestras obtenidas

Se examinaron las micromuestras SC1 – SC16 mediante microscopía óptica en el Laboratorio de Investigación Científica y Análisis del Museo Winterthur. El microscopio se encontraba acoplado a una fuente de luz visible y ultravioleta (365, 405 y 485 nm). Las fotografías de luz visible de las dieciséis micromuestras montadas en resina se muestran en la Figura 26.

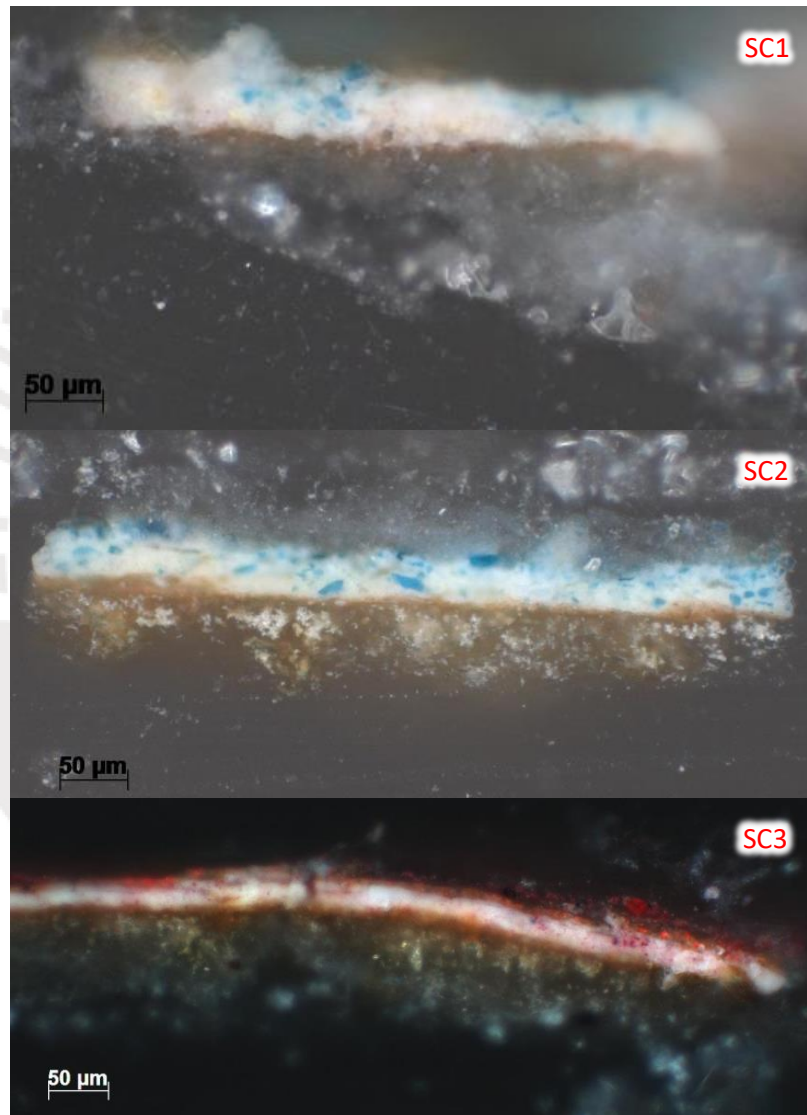


Figura 26. Fotografías de las micromuestras montadas en resina, observadas con el microscopio óptico. *[Continúa en la siguiente página]*

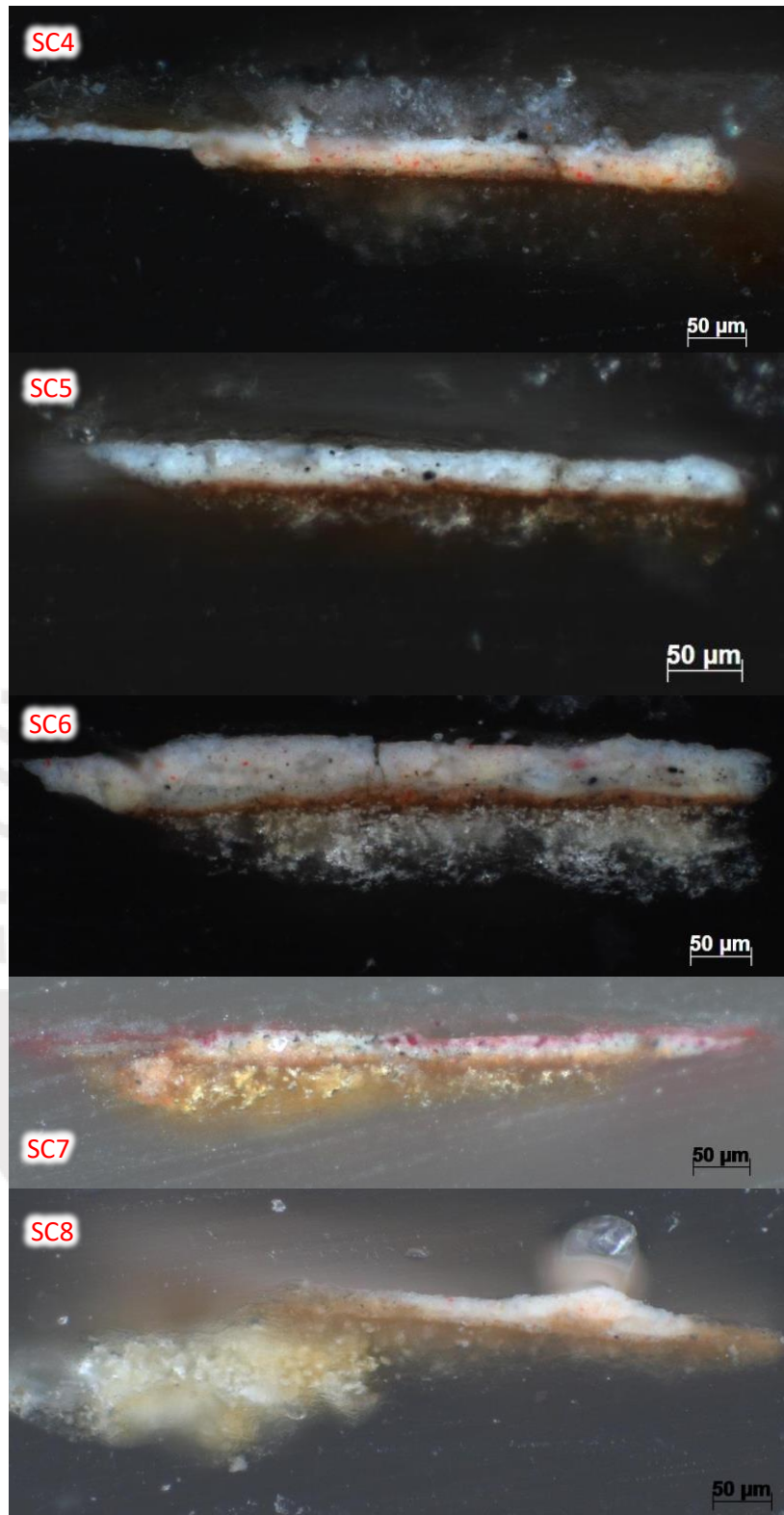


Figura 26. Fotografías de las micromuestras montadas en resina, observadas con el microscopio óptico. *[Continúa en la siguiente página]*

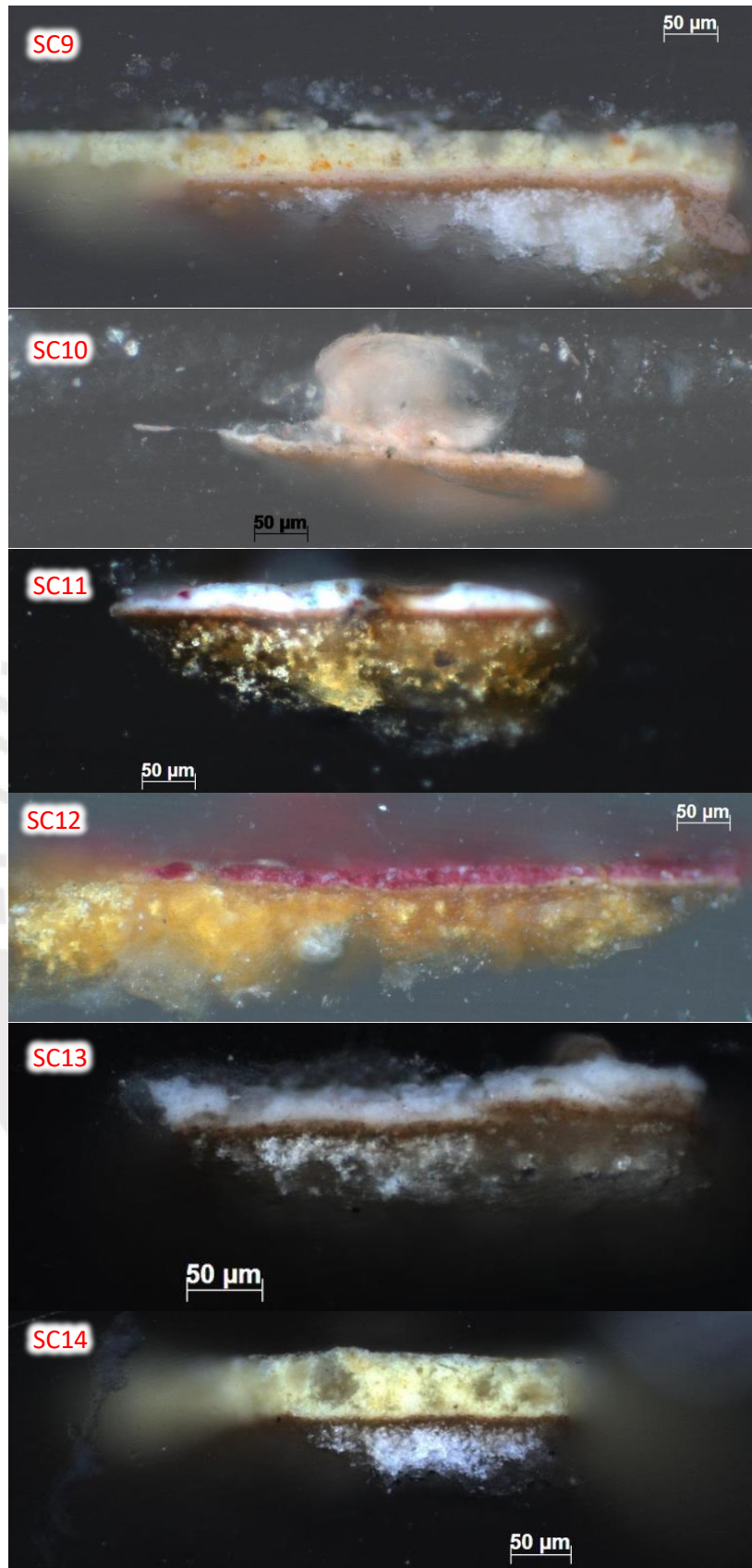


Figura 26. Fotografías de las micromuestras montadas en resina, observadas con el microscopio óptico. *[Continúa en la siguiente página]*

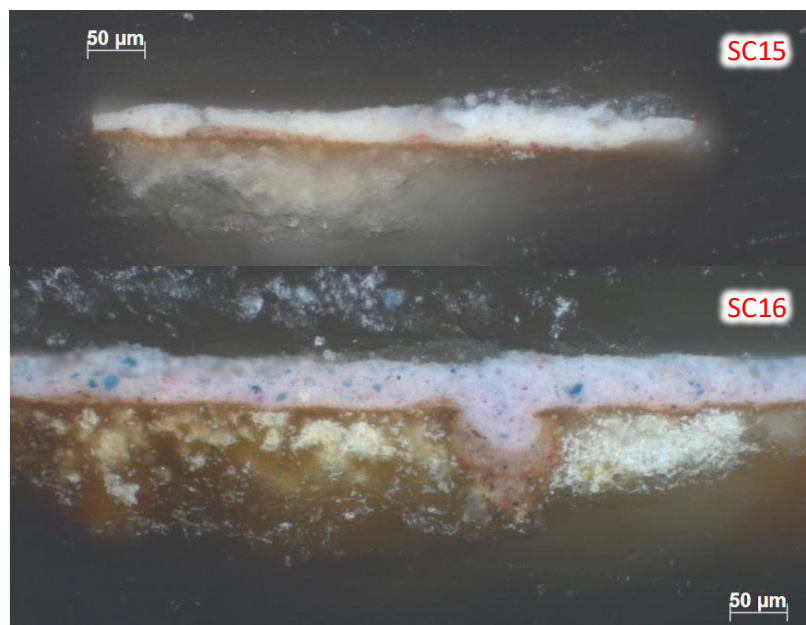


Figura 26. Fotografías de las micromuestras montadas en resina, observadas con el microscopio óptico. [Continuación]

De todas las micromuestras, tres de ellas (SC3, SC7 y SC9) presentan dos capas pictóricas y corresponden a zonas en las cuales se aprecia una coloración roja. Las trece micromuestras restantes presentan una sola capa pictórica. Todas las micromuestras presentan una capa intermedia más oscura (la cual llamamos “imprimación”) entre la capa de preparación y la(s) pictórica(s), la cual fue visualizada con mayor claridad al ser expuesta a luz de 405 nm.

Existen pigmentos que pueden ser rápidamente identificados debido a su tamaño, forma y color de grano. La azurita natural presenta cristales azules característicos, cuyos tamaños pueden ser muy variables. Según un estudio reciente la azurita disponible comercialmente puede tener partículas entre 4,5 µm hasta 110 µm.^[82] Se encontraron cristales de azurita (con tamaños que oscilan entre 4 a 14 µm) en las micromuestras SC1, SC2, SC11 y SC16, pero no se pudo observar ningún pigmento verde a pesar que la capa pictórica de esas muestras era dicho color.

En la Figura 27 se presenta la micromuestra SC4, vista bajo luz ultravioleta a 365, 405 y 485 nm. Como se puede observar, en las fotografías con luz UV se puede diferenciar mejor la capa de “imprimación” como una línea delgada de color oscuro, el barniz es claramente visible y la capa de preparación presenta límites bien definidos. Esta micromuestra presenta dos capas pictóricas, las cuales son señaladas en la Figura 27. La capa pictórica superior es de color blanco, mientras que la inferior es de color amarillento con varios puntos rojos.

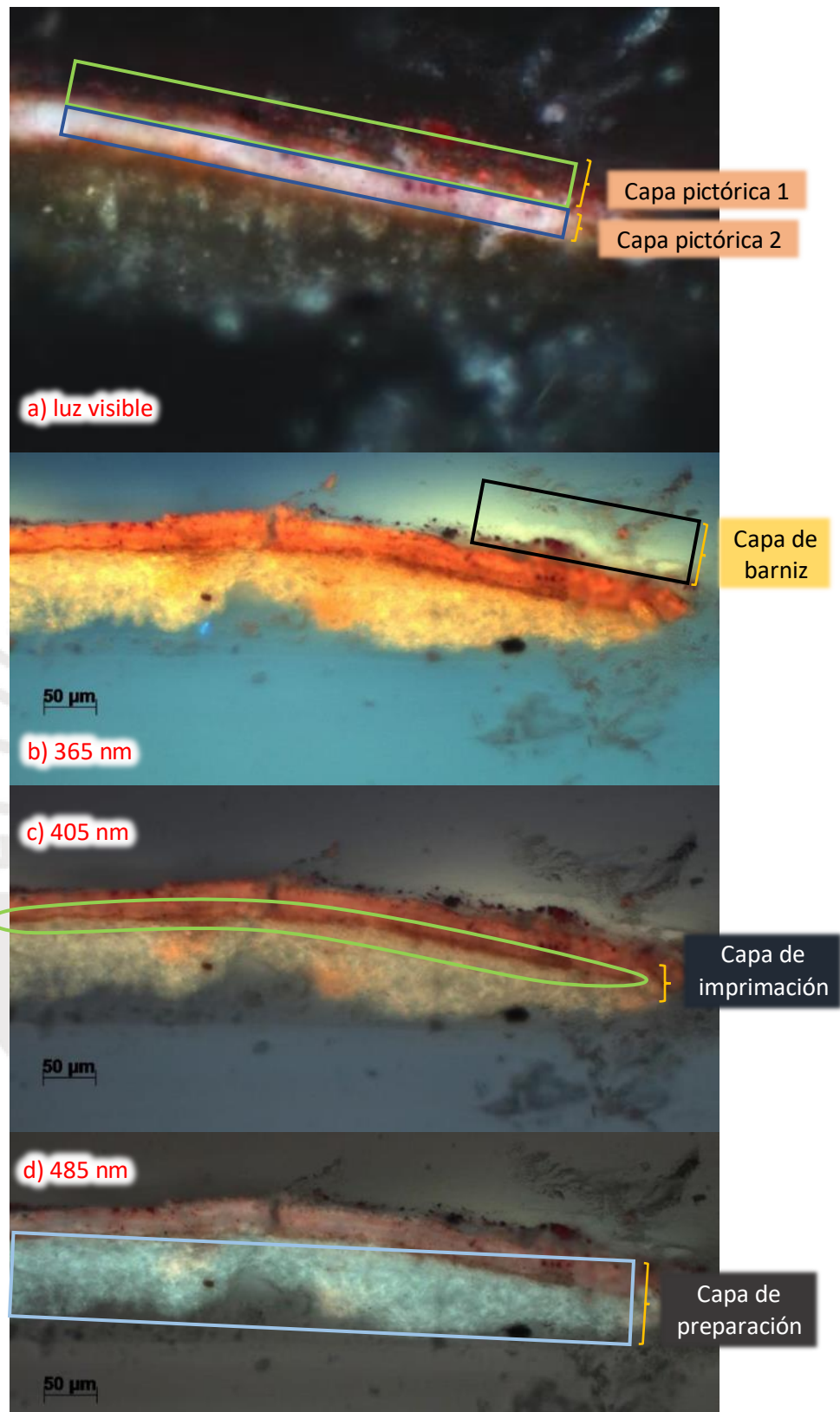


Figura 27. Fotografías de la micromuestra SC3 vista al microscopio óptico, con varias fuentes de excitación. En la ampliación de la fotografía con luz visible se observan dos pictóricas: la capa superior es de color rojo, y la inferior tiene un color blanco.

La micromuestra SC14 (mostrada en la Figura 26) presenta tonalidades amarillas claras y oscuras debido a la presencia de amarillo de plomo y estaño en la capa pictórica, de forma relativamente circular. Era necesario determinar con exactitud si estas manchas se debían a la presencia de un jabón de plomo, o si sólo se trataban de agujeros producidos durante el proceso de pulido de la micromuestra en resina. Este análisis se realizó mediante SEM-EDS y Raman.

5.2.1 Análisis de micromuestras por SEM-EDS

Se estudiaron siete micromuestras montadas en resina mediante SEM-EDS, de las cuales SC1, SC5, SC6 Y SC11 fueron analizadas en el Laboratorio de Investigación Científica y Análisis del Museo Winterthur, mientras que las micromuestras SC8, SC14 y SC16 fueron analizadas en la PUCP.

Se observó la presencia de una inclusión de calcio en la capa pictórica de la micromuestra SC11, cuyas imágenes ópticas y SEM se muestran en la en la Figura 28. En este ejemplo es posible observar un área oscura en mitad de la capa pictórica. El análisis EDS de este punto demostró la presencia de calcio, por lo que se trataría de una inclusión de calcio (posiblemente carbonato de calcio).

Se realizó un análisis puntual de la micromuestra SC14 en las zonas más oscuras y sus alrededores (más claros) para determinar la presencia de jabones de plomo en la pintura. Se observó que la intensidad de los pigmentos en las zonas más oscuras era considerablemente menor a los que se encontraban en los alrededores. Esto puede ser indicativo de un agujero en la muestra, puesto que en la formación de un jabón de plomo no se debería perder la intensidad de las señales de los pigmentos. En la Figura 29 se muestran los puntos que fueron analizados mediante esta técnica, mientras que en la Figura 30 se muestran los espectros EDS en los cuales es posible observar la diferencia entre la composición de los puntos analizados. En el punto EDS 8 se observó la presencia de estaño y plomo (indicativo de amarillo de plomo-estaño), así como otros elementos; en el punto EDS 2 no se observó la presencia de estaño mientras que la intensidad de las señales de los otros elementos disminuyó.

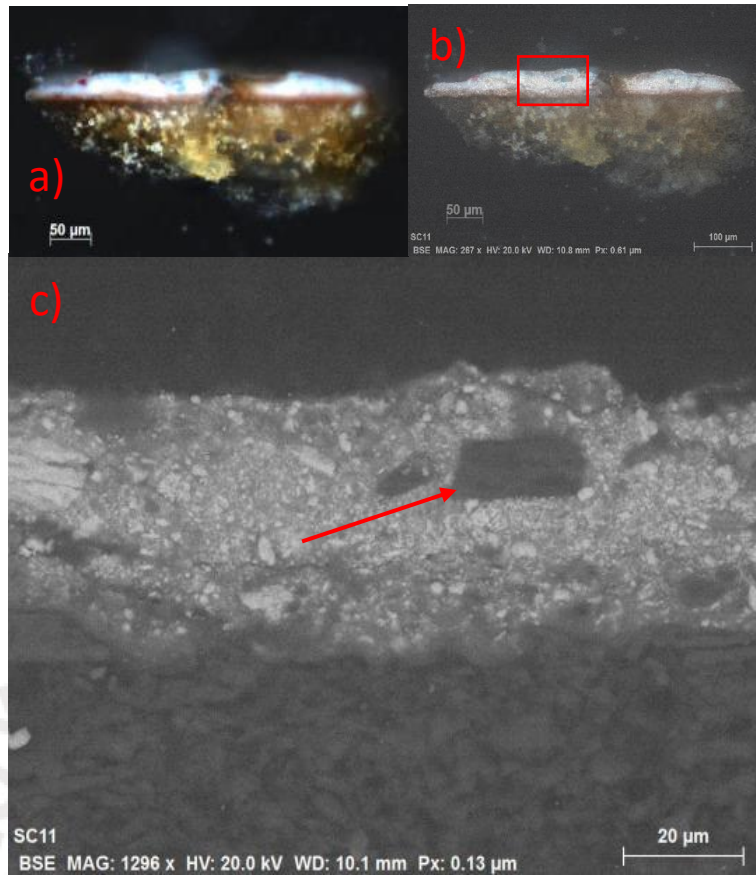


Figura 28. a) Imagen óptica de la micromuestra SC11. b) Imagen SEM con una magnificación de 267X solapada con la imagen óptica. c) Imagen SEM de la zona encerrada por un rectángulo en b), con una magnificación de 1296X.

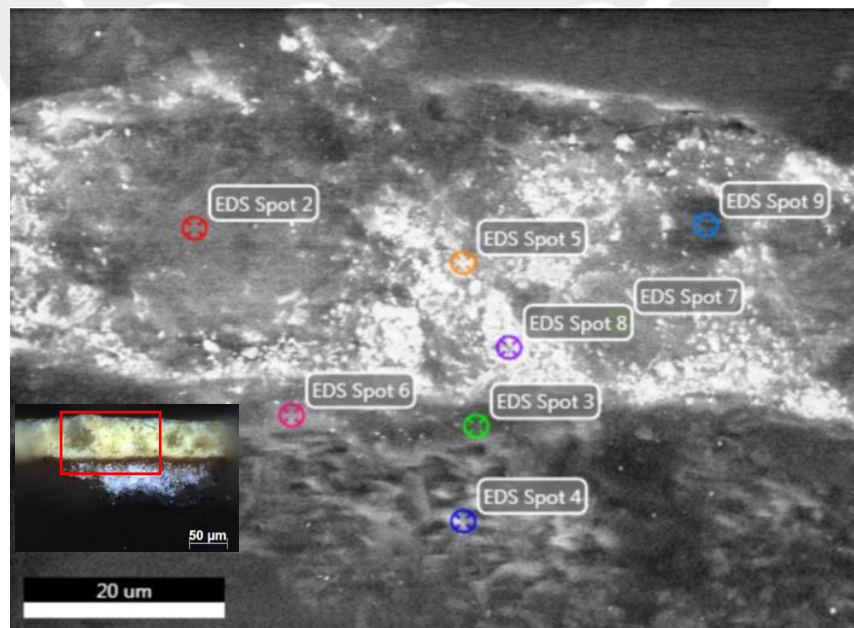


Figura 29. Imagen SEM de la micromuestra SC14 en la que se muestran los puntos EDS analizados.

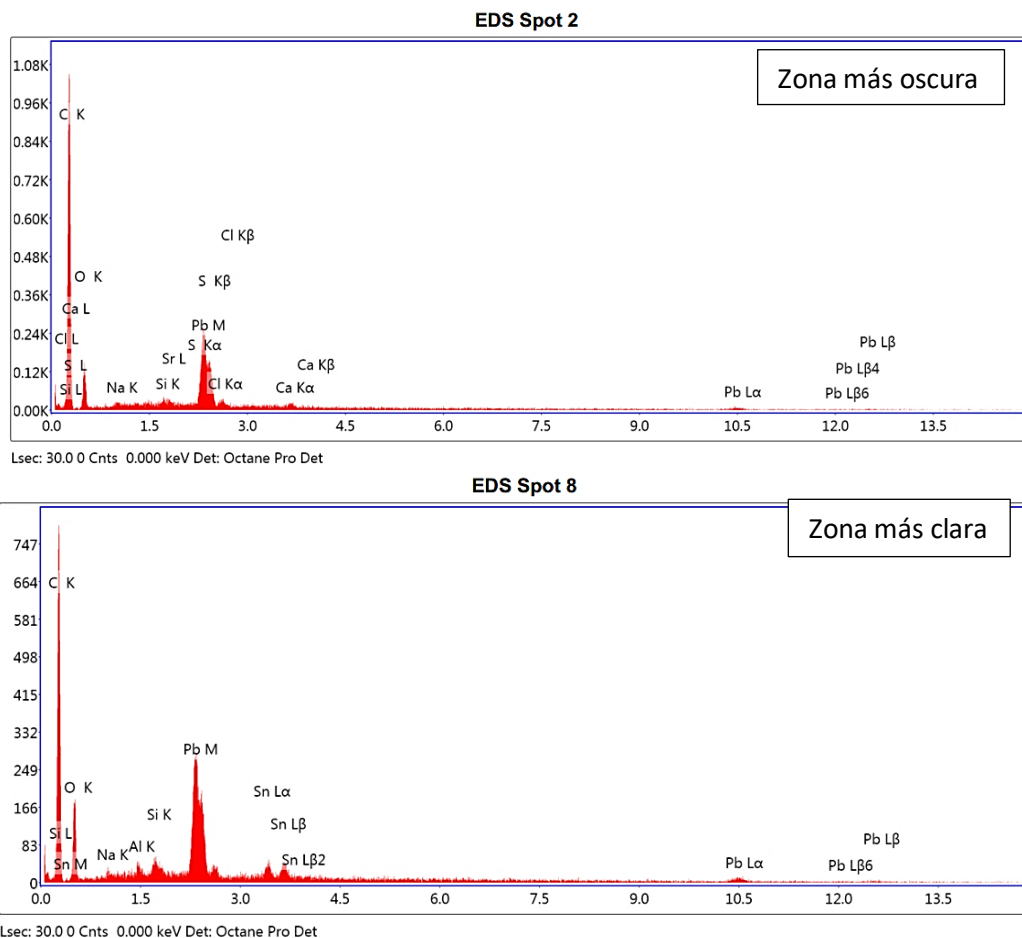


Figura 30. Espectros EDS de los puntos 2 y 8 de la micromuestra SC14.

Se analizó la micromuestra SC16, la cual presentaba una zona de la capa pictórica deformada, generando una intrusión en la capa de preparación. En la Figura 31 se puede observar la imagen SEM de esta micromuestra, donde esta intrusión es claramente visible. Además, en la imagen SEM ampliada se pudo observar una pequeña diferencia entre los tonos de gris (separadas ambas zonas con una línea discontinua amarilla). Se tomaron varios puntos para análisis EDS en ambas zonas: 1, 2 y 5 en la zona superior, y 3, 4 y 6 en la zona inferior. En los puntos EDS 3, 4 y 6 (zona inferior) se pudieron apreciar grandes señales de silicio y aluminio, mientras que en los puntos EDS 1, 2 y 5 no se pudo obtener el mismo resultado. En la Figura 32 se muestran los espectros EDS de los puntos 4 y 5 analizados para esta micromuestra. La presencia de silicio y aluminio podrían indicar la presencia de arcilla. Esto sería coherente con el color observado en todas las micromuestras, ya que la arcilla puede adquirir diversas tonalidades según las impurezas o iones metálicos que pueda contener en su estructura.^[83]

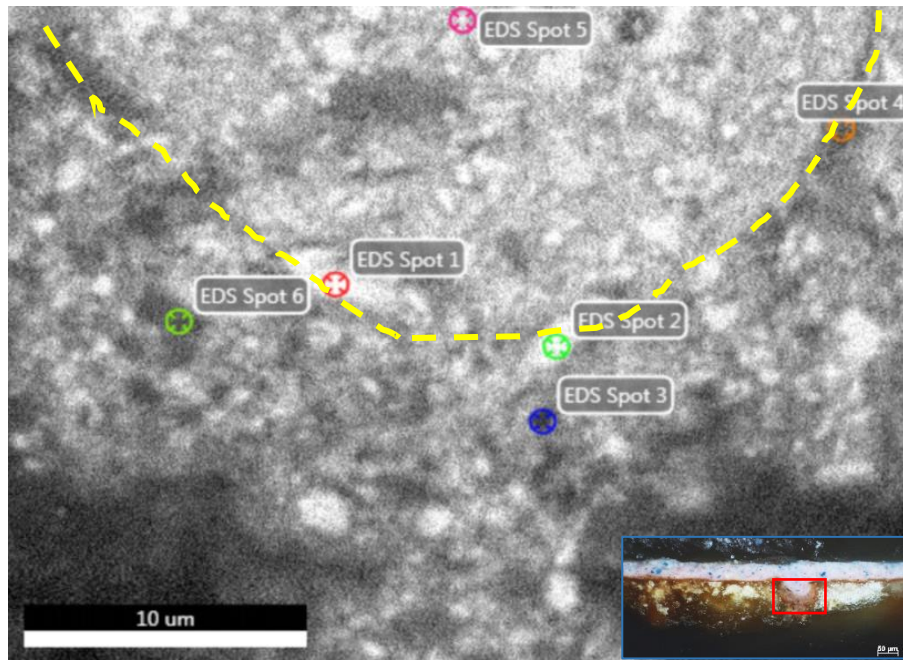


Figura 31. Imagen SEM de una sección de la micromuestra SC16. Se encerró en un rectángulo rojo el área en el que se realizaron análisis EDS puntuales. Abajo: puntos EDS analizados. La línea discontinua amarilla separa dos zonas con una ligera diferencia en los tonos de gris.

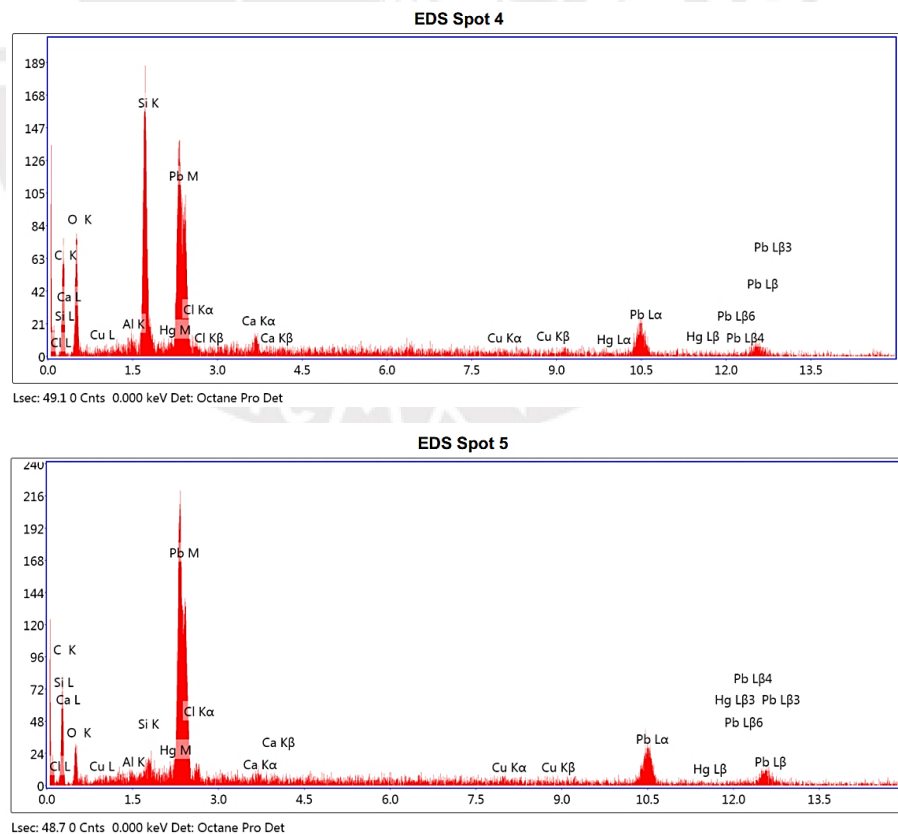


Figura 32. Espectros EDS de los puntos 4 y 5 de la micromuestra SC16.

Se realizó el análisis por SEM de micromuestra SC6 mediante un mapeo elemental de área, el cual se muestra en la Figura 33. Se observó claramente que el contenido de silicio, aluminio, hierro y potasio se hallaba concentrado en una franja central. Esta característica también fue observada en las micromuestras SC 1 y SC5.

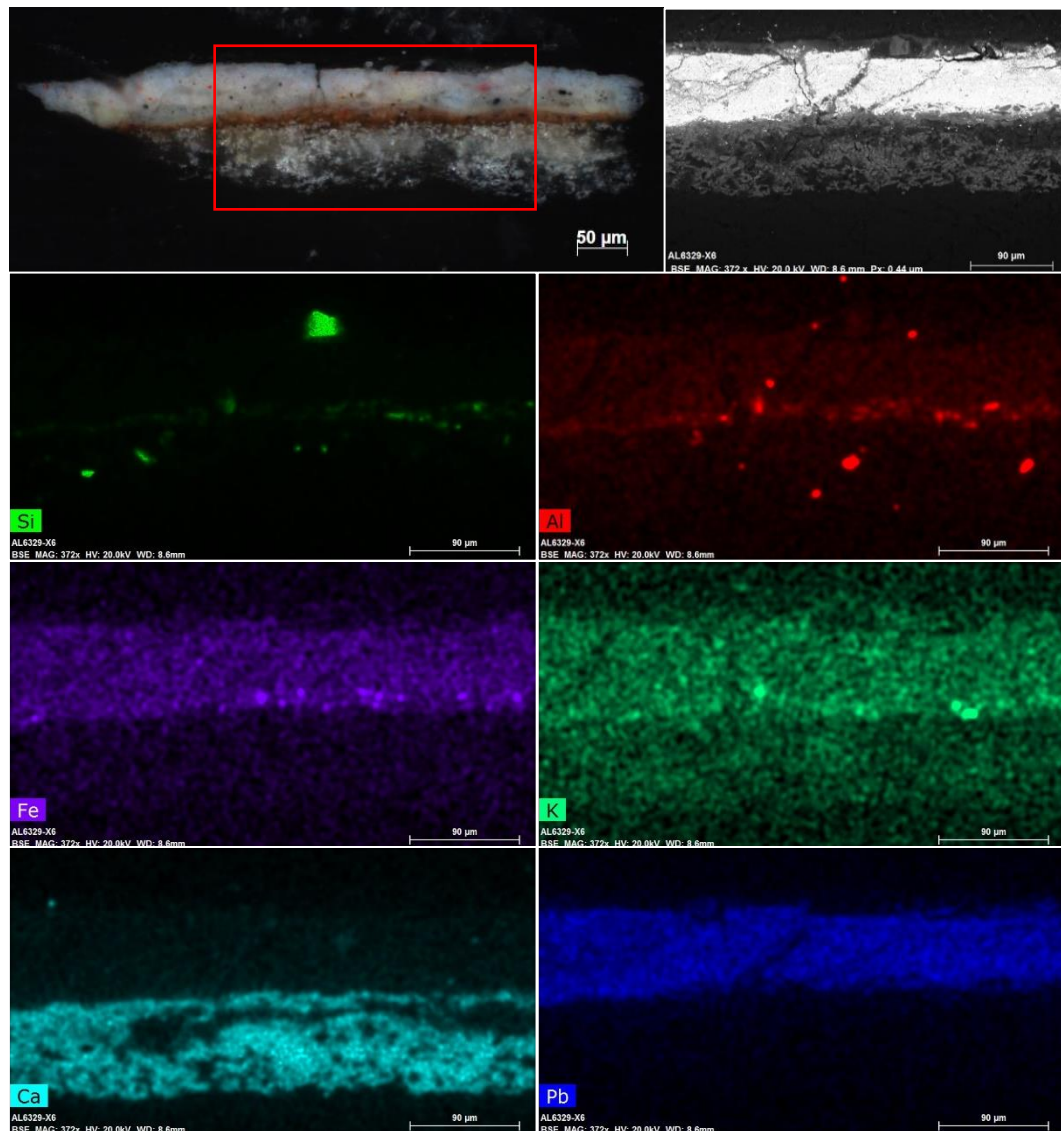


Figura 33. Mapeo elemental de la micromuestra SC6. La primera imagen corresponde a la fotografía con luz visible de la micromuestra, mientras que la segunda corresponde a la imagen por electrones retrodispersados de la zona encerrada con un rectángulo rojo.

Debido al color marrón observado en la fotografía con luz visible, y la presencia en la mayor parte de las micromuestras analizadas, resultaba muy probable que esta zona se tratase de una capa de imprimación compuesta por un ocre o una arcilla, quien le daría una tonalidad particular a toda la obra. Sin embargo, el grosor de dicha capa es muy pequeño en comparación a las observadas comúnmente en otras obras de arte. Puede existir la

posibilidad de que Bitti haya utilizado la técnica de *primuerset* en su trabajo (se mencionó previamente en la sección 3.4.2), pero no se puede descartar que esta capa sea producto de la migración y acumulación de los pigmentos presentes en las capas pictóricas hacia la zona inferior debido a la presencia de ácidos grasos libres.

5.2.2 Identificación de materiales por espectroscopía Raman

Hasta el momento no se había encontrado la identidad de los posibles pigmentos orgánicos ni se logró explicar el origen de las tonalidades verdosas en la pintura a partir del análisis elemental. Por ello, se analizaron por microespectroscopía Raman las dieciséis micromuestras montadas en resina (SC1 – SC16), enfocando el láser en puntos de interés de diferentes colores.

Un caso interesante se vio con el análisis del punto SC6, el cual fue obtenido de la unión entre la mano del personaje P6 (color gris) y su túnica (azul-verdoso). En el análisis de una zona ligeramente amarilla de dicha micromuestra se encontró amarillo de plomo-estaño, junto a bermellón (Figura 34). Es posible que el artista haya utilizado una mezcla de estos pigmentos para darle una tonalidad rosada a la piel de los personajes.

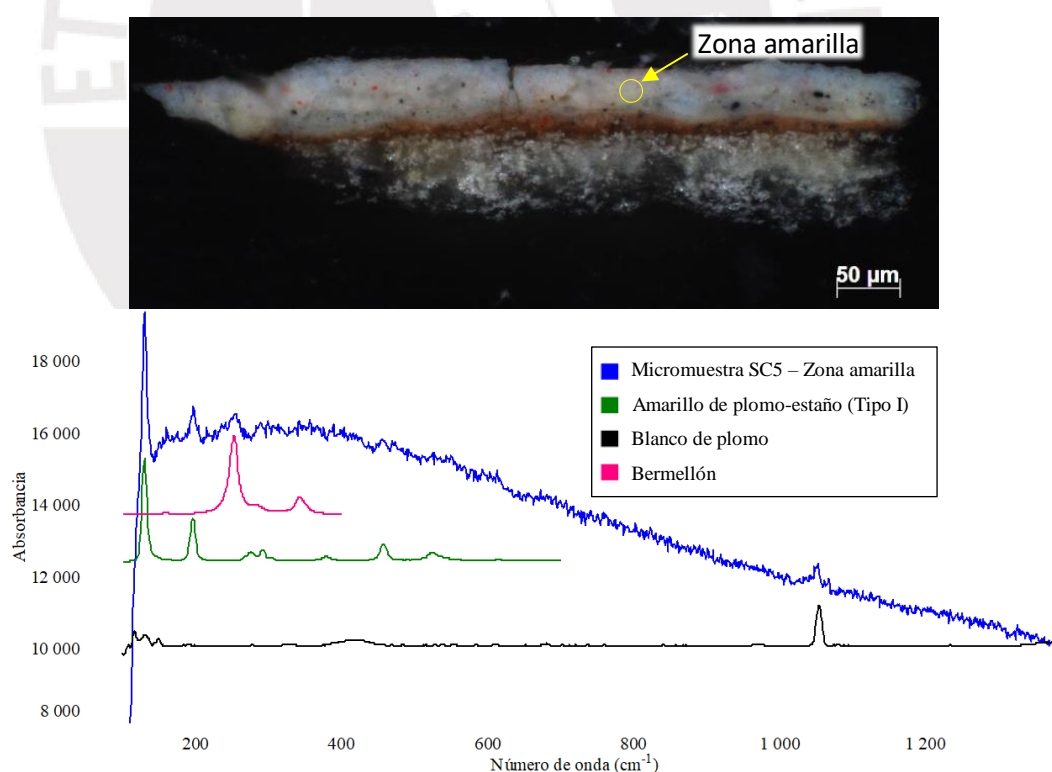


Figura 34. Espectro Raman de una zona amarilla de la micromuestra SC6. Se observa la presencia de bermellón, amarillo de plomo-estaño (tipo I) y blanco de plomo.

En la Tabla 18 se muestran los compuestos que han podido ser determinados mediante el análisis por microscopía óptica y microespectroscopía Raman de las micromuestras. Estos análisis se realizaron con un microscopio Raman Renishaw In-Via, en el Laboratorio de Investigación Científica y Análisis del Museo Winterthur. Con asterisco (*) se muestran los materiales confirmados posteriormente mediante SEM-EDS. Entre los diferentes compuestos encontrados mediante esta técnica, no se pudo encontrar un pigmento de cobre diferente a la azurita. Esto puede ser indicativo de que, como se discutió antes, los colores verdes hayan sido generados por la mezcla de azurita con algún ocre amarillo. Esta hipótesis se refuerza con el mapeo elemental realizado previamente, en el que se encuentra un contenido relativamente elevado de hierro en las capas pictóricas de las muestras.

Tabla 18. Principales componentes encontrados en las micromuestras analizadas.

| Punto | Color | PIGMENTOS Y MATERIALES | | | | |
|-------|--------------------|------------------------|--------------------------|-----------|-----------------|------|
| | | Azurita | Amarillo de plomo-estaño | Bermellón | Blanco de plomo | Yeso |
| 1 | Verde | • | | | • | • |
| 2 | Verde | • | | | • | • |
| 3 | Rojo | | | • | • | • |
| 4 | Rosado | | • | • | • | • |
| 5 | Azul grisáceo | | | | • | • |
| 6 | Rosado | | • | • | • | • |
| 7 | Marrón-rojizo | | | | | • |
| 8 | Rosado | | | • | • | •(*) |
| 9 | Amarillo | | • | • | • | • |
| 10 | Rosado | | | • | • | •(*) |
| 11 | Verde | • | | | • | • |
| 12 | Rojo oscuro-carmín | | | | • | •(*) |
| 13 | Rosado pálido | | | | • | • |
| 14 | Amarillo | | • | | •(*) | •(*) |
| 15 | Blanco | | | • | • | • |
| 16 | Verde/anaranjado | • | | | • | • |

5.2.3 Identificación de barnices y aglutinantes lipídicos por GC-MS

5.2.3.1 Análisis de barnices

En el caso de los barnices se pudieron observar múltiples componentes presentes en los cromatogramas. El análisis en el modo SCAN permitió el análisis y la identificación de varios de estos componentes utilizando los espectros de masas para realizar la comparación con la base de datos del NIST, así como con las referencias en la literatura.^[84,85] Los cromatogramas obtenidos mediante el modo SCAN para las resinas estudiadas se muestra en la Figura 35.

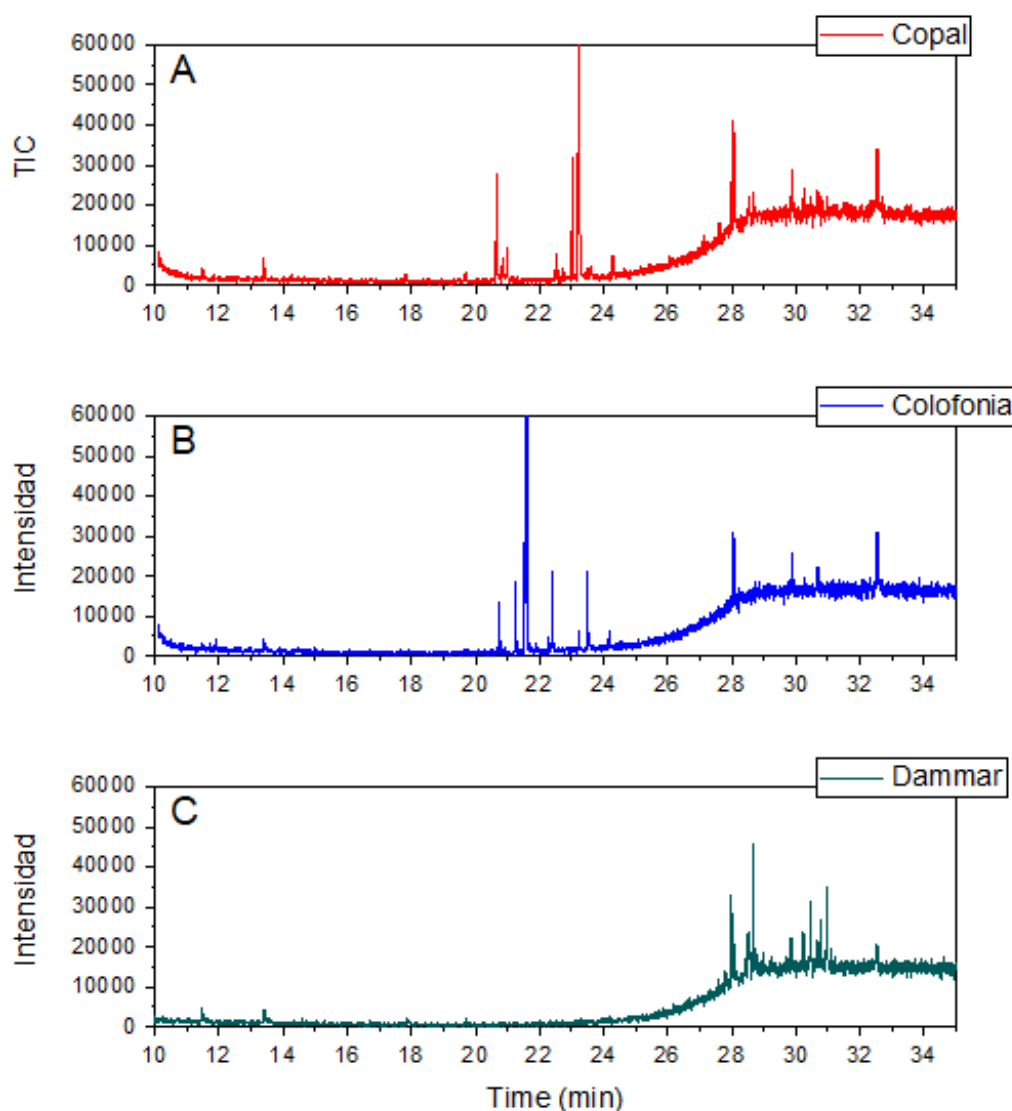


Figura 35. Cromatogramas de las resinas estudiadas como referencia, usando el modo SCAN del equipo: A) Copal, B) Colofonia y C) Dammar.

Si bien es cierto que el modo SCAN puede analizar un amplio rango de fragmentos de diferentes pesos moleculares, suele presentar una sensibilidad bastante baja. Esto es particularmente notorio cuando se cuenta con componentes en el cromatograma con una alta intensidad, la cual efectivamente “enmascara” a las demás.

Cada marcador tuvo un tiempo de retención particular y separado de los demás. En diferentes experimentos se observó que el tiempo de retención varió a pesar de haber mantenido constantes los parámetros de la corrida cromatográfica. Este fenómeno se puede deber a múltiples factores, entre los que se encuentran el constante desgaste de la columna, la acumulación de compuestos introducidos en otros experimentos y la variación en la composición de la mezcla inyectada (ya que pasa un tiempo desde el momento en que es preparada hasta que ingresa al equipo). Lo que sí se pudo apreciar fue que la relación entre

tiempos de retención se mantuvo; es decir, todas las señales analizadas tuvieron un corrimiento similar en el tiempo. En la Tabla 19 se muestran los iones que fueron utilizados para identificar a los compuestos presentes en las resinas, así como sus tiempos de retención usando la columna Agilent DB-5ms y los parámetros referidos en la Tabla 12.

Tabla 19. Iones utilizados para la identificación de resinas.^[86]

| COLUMNA USADA | COMPUESTO | ION PARTICULAR (M/Z) | TIEMPO DE RETENCIÓN (minutos) |
|--------------------------------------|--|----------------------|-------------------------------|
| Agilent DB-5ms (análisis de resinas) | 6-metil dehidrodehidroabietato (Colofonia) | 237 | 21,531 |
| | dimetil 8(17),E-13-labdadien-15,19-dioato (Copal) | 289 | 23,225 |
| | ácido 20-hidroxi-3,4-seco-4(28),24-damaren-3-oico (Dammar) | 385 | 27,977 |

A partir de la información obtenida se estudiaron varias micromuestras de pintura disponibles usando el modo SIM del equipo, permitiendo que el analizador de masas seleccione sólo los fragmentos con m/z 237, 289 y 385. El tiempo de retención de los componentes tuvo ciertas variaciones (siendo este ligeramente reducido tras cada corrida). A pesar de que este modo tiene una mayor sensibilidad que el modo SCAN, la relación señal/ruido en las señales no fue suficiente para determinar la resina presente en varias de las muestras. Fue posible determinar la presencia de colofonia en tres de las muestras analizadas, cuyos cromatogramas se exponen en la Figura 36. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resinas identificadas en las micromuestras estudiadas de la obra El Señor de la Caída.

| MICROMUESTRA ANALIZADA | RESINA IDENTIFICADA |
|------------------------|-------------------------|
| M3 | No se logró identificar |
| M4 | Colofonia |
| M6 | Colofonia |
| M9 | No se logró identificar |
| M12 | No se logró identificar |
| M13 | No se logró identificar |
| M16 | Colofonia |

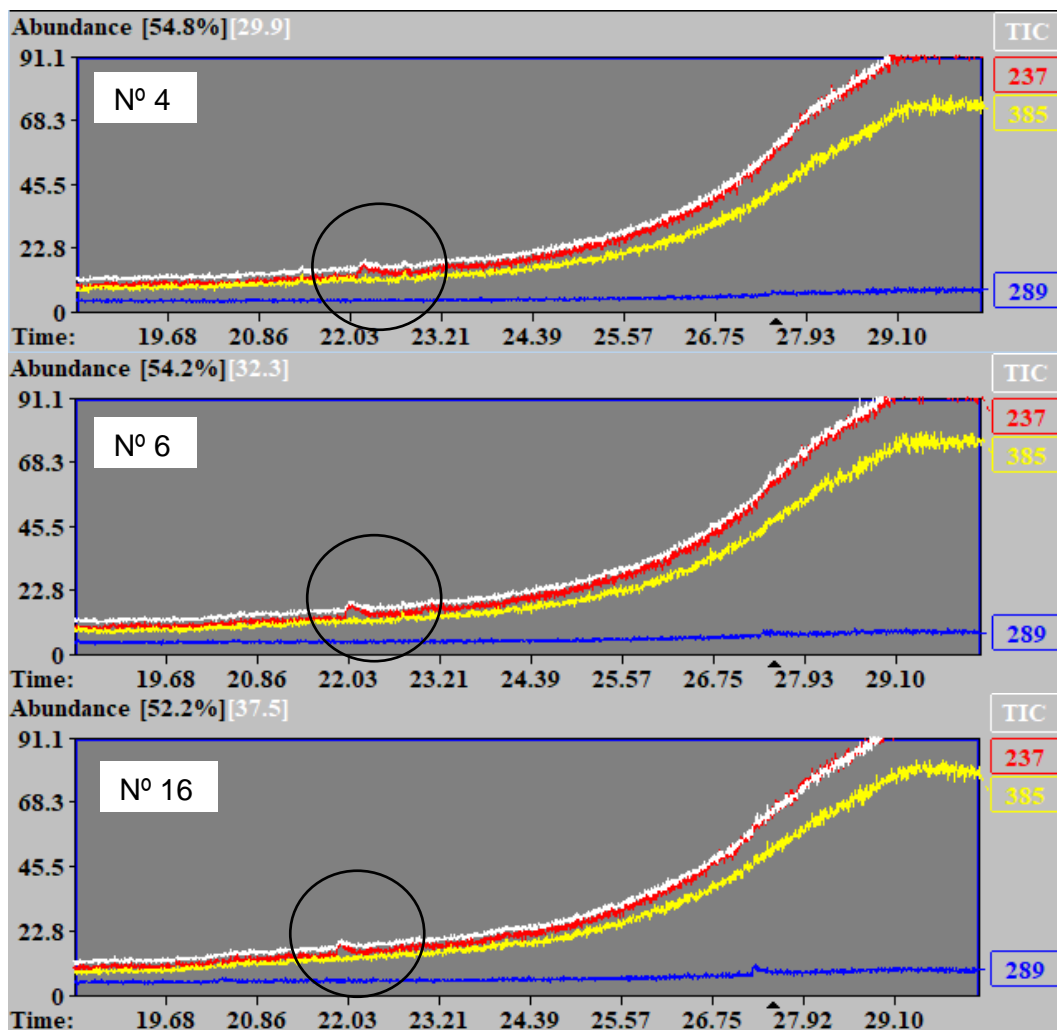


Figura 36. Cromatogramas del análisis de resinas en las micromuestras de los puntos M4, M6 y M16. Los espectros mostrados corresponden a los m/z seleccionados: 237 (rojo), 385 (amarillo), 289 (azul) e iones totales (blanco). Los círculos negros evidencian la señal correspondiente al 6-metil dehidrodehidroabietato ($m/z = 237$), presente en la colofonia.

Si bien es cierto que sólo se analizó un número reducido de micromuestras, la identificación de colofonia como componente del barniz estaría de acuerdo con el contexto artístico de una obra del siglo XVI.

5.2.3.2 Análisis de aceites

Se observó que los ácidos grasos tenían como iones comunes a los $m/z = 55$ y $m/z = 74$ (Tabla 21). Este último fragmento presentó una señal más intensa, por lo que fue usado para realizar la cuantificación. Para evitar la aparición de errores aleatorios, como diferencias en inyección o variaciones en la respuesta del equipo a cada corrida cromatográfica, se utilizó un estándar interno.

Tabla 21. Iones característicos de los ácidos grasos estudiados.

| COMPUESTO | ION PARTICULAR (M/Z) | IONES COMUNES (M/Z) |
|---------------------------------|----------------------|---------------------|
| Ácido palmítico, metil éster | 270 | 55, 74 |
| Ácido esteárico, metil éster | 298 | 55, 74 |
| Ácido tridecanoico, metil éster | 197 | 55, 74 |

Fue necesario verificar que la respuesta del equipo fuese lineal para poder realizar el análisis mediante la relación entre áreas de los metil ésteres de ácidos grasos. ^[67,87] Las curvas de calibración generadas a partir del análisis de los estándares de ácidos grasos descritos en la Tabla 10 se muestran en la Figura 37.

Como se observa, existe una fuerte tendencia lineal, además que las líneas de tendencia pasan muy cerca al origen. Se realizó la prueba de falta de ajuste para cada curva de calibración, y se determinó que efectivamente estas curvas cumplían con la linealidad requerida al ser menor que la tabulada para el valor de F hallado a un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). En base al método descrito en la literatura ^[88,89] se calcularon los límites de detección y cuantificación como $3s_0/\sqrt{n}$ y $10s_0/\sqrt{n}$, respectivamente, donde s_0 es el la desviación estándar de las áreas halladas en los blancos de análisis. Los parámetros estadísticos calculados se muestran en la Tabla 22.

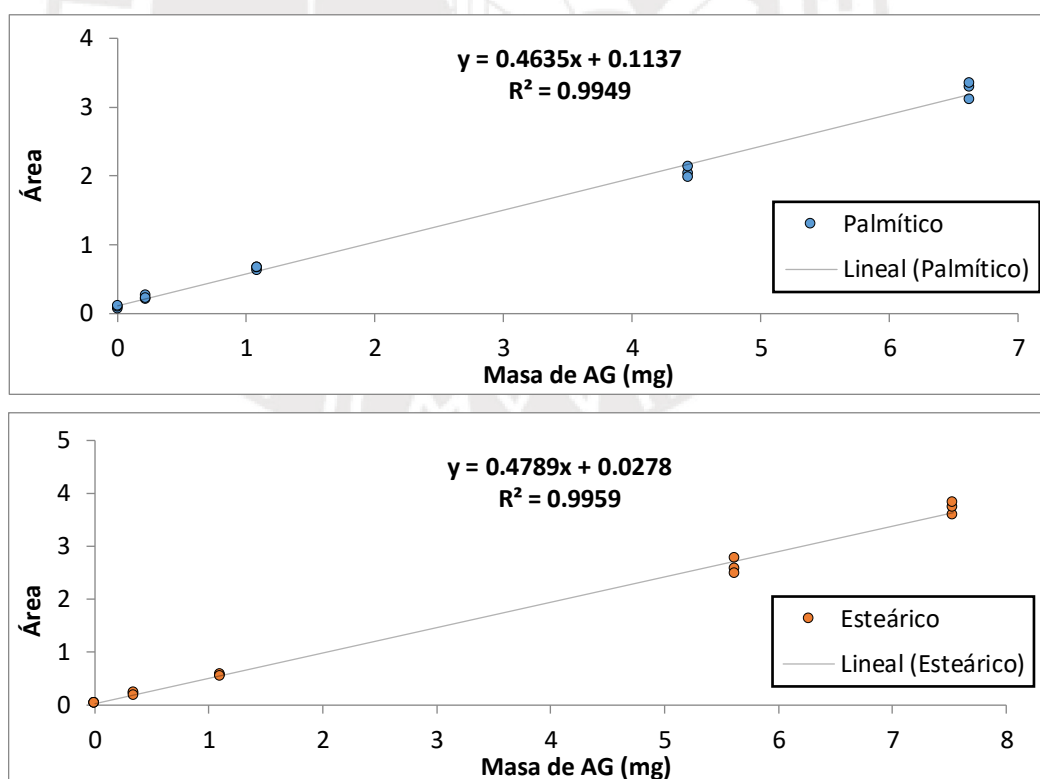


Figura 37. Curvas de calibración de los ácidos grasos palmítico (arriba) y esteárico (abajo), obtenidas para la verificación de la linealidad del método usado.

Tabla 22. Validación del método analítico usado para el análisis de ácidos grasos derivatizados mediante la prueba de falta de ajuste, y otros parámetros estadísticos calculados.

| PARÁMETRO | ÁCIDO GRASO | |
|---|---|-----------|
| | PALMÍTICO | ESTEÁRICO |
| Intercepto (mg) | 0,1137 | 0,0278 |
| Pendiente | 0,4635 | 0,4789 |
| Coefficiente de determinación (R^2) | 0,9949 | 0,9959 |
| Límite de detección (mg) | 0,0514 | 0,0625 |
| Límite de cuantificación (mg) | 0,2626 | 0,1051 |
| Prueba de falta de ajuste | F calculado | 1,4979 |
| | F tabulado | 3,7083 |
| | ¿Es lineal? ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$) | Sí |
| | | Sí |

Se analizaron cinco micromuestras de pintura, así como muestras de aceite de linaza disponibles en tiendas de materiales artísticos, las cuales figuran en la Tabla 23. Las muestras de aceite de linaza fueron tomadas de las zonas más envejecidas (como la tapa de la botella), las cuales presentaron un aspecto gelatinoso. Se observó que la relación P/S de dichas muestras se encontró en el rango de 0,8 a 1,6. A excepción de la muestra M15, el cual tiene un valor atípico y fuera del rango aceptado para el aceite de linaza (0,9 – 1,8) se confirma la presencia de este aceite en la obra.

Tabla 23. Valores promedio de la relación de ácidos palmítico/esteárico en las muestras analizadas.

| MUESTRA | RELACIÓN P/S |
|---|--------------|
| Aceite de linaza envejecido (Papelería de Artes de la PUCP) | 1,6 |
| Aceite de linaza (Papelería de Artes de la PUCP) | 1,6 |
| Aceite de linaza (marca van Dyck) | 1,6 |
| M8 | 1,5 |
| M12 | 1,5 |
| M14 | 1,1 |
| M15 | 0,8 |
| M16 | 1,4 |

5.2.4 Identificación de pigmentos orgánicos por MALDI-MS

En base a las fotografías de luz visible de la micromuestra SC12 se pudo observar que el pigmento utilizado no correspondía a ninguno de los rojos detectables por las técnicas discutidas en las secciones anteriores. Se tuvo la sospecha de que en esta zona se había utilizado una laca orgánica, como cochinilla, para obtener dicho color. Por ello, se estudió el extracto metanólico de la micromuestra M12 mediante MALDI-MS. Al analizar el

estándar de ácido carmínico en metanol con la matriz 9-aminoacridina se observaron iones $[M-H]^-$ con una masa y un error de m/z muy cercanos a los reportados en la literatura para un estándar de cochinilla, los cuales se muestran en la Tabla 24.^[58] En el caso del ion con $m/z = 313,0354$ (ácido flavokermésico) no hubo diferencia alguna con la reportada en la referencia (ver Figura 38).

Tabla 24. Iones identificados mediante MALDI-MS en una muestra de ácido carmínico con 9-aminoacridina.

| COMPUESTO | M/Z EXPERIMENTAL | M/Z REPORTADO [58] | DIFERENCIA DE M/Z REPORTADA [58] |
|----------------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------|
| Ácido carmínico | 491,08240 – 491,08292 | 491,0840 | +0.000899 |
| Ácido kermésico | 329,02948 – 329,02963 | 329,0301 | -0,000201 |
| Ácido flavokermésico | 313,0354 | 313,0354 | 0,000000 |

Se realizó un experimento de espectrometría de masas en tándem usando los parámetros descritos previamente en la Tabla 14. Al analizar la muestra de ácido carmínico se encontró que ésta tenía una distribución de fragmentos parcialmente consistente con el espectro de masas reportado en la base de datos consultada (Figura 39).^[90] Es posible que el ion $m/z = 221, 21651$ se trate de un artefacto del espectro de masas, cuyo origen pueda deberse a la saturación del amplificador de detección o a una sobrecarga del transformador de señal analógica a digital.^[91] Esto sería consistente con la alta intensidad de las señales y con el aparente aumento del valor m/z en cada escaneo.

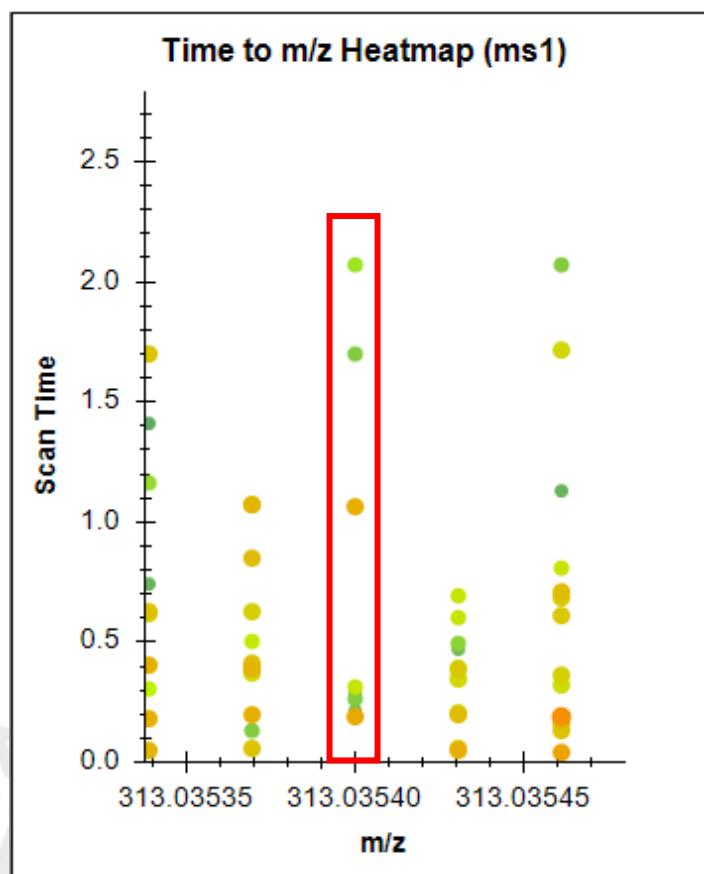


Figura 38. Ampliación del mapa de iones observado en la muestra de ácido carmínico. Se observan, encerrados en un rectángulo rojo, los iones con $m/z = 313,0354$ correspondientes al ácido flavokermésico.

La fragmentación parcial que se observa en el espectro de masas puede tener diversas causas, entre las que se encontraría una energía de colisiones insuficiente para generar todos los iones observados en la referencia. Con relación a los iones con una elevada intensidad encontrados en el rango de $m/z = [221,2 - 221,3]$

Tal como se ve en la Figura 40, la diferencia entre los ácidos carmínico y kermésico es la presencia de una glucosa. El ácido carmínico ha sido sintetizado en el laboratorio desde hace varios años^[92] y se ha demostrado que el enlace entre la antraquinona y la glucosa es muy resistente en medios ácidos,^[93] pero sufre una fotodegradación significativa en medios básicos (especialmente con la exposición a luz con una longitud de onda de 254 nm).^[94] Puesto que la 9-aminoacridina es una matriz básica, y el láser MALDI tiene una longitud de onda de 355 nm, es posible que algunos de los fragmentos observados correspondan a productos de degradación del ácido carmínico.

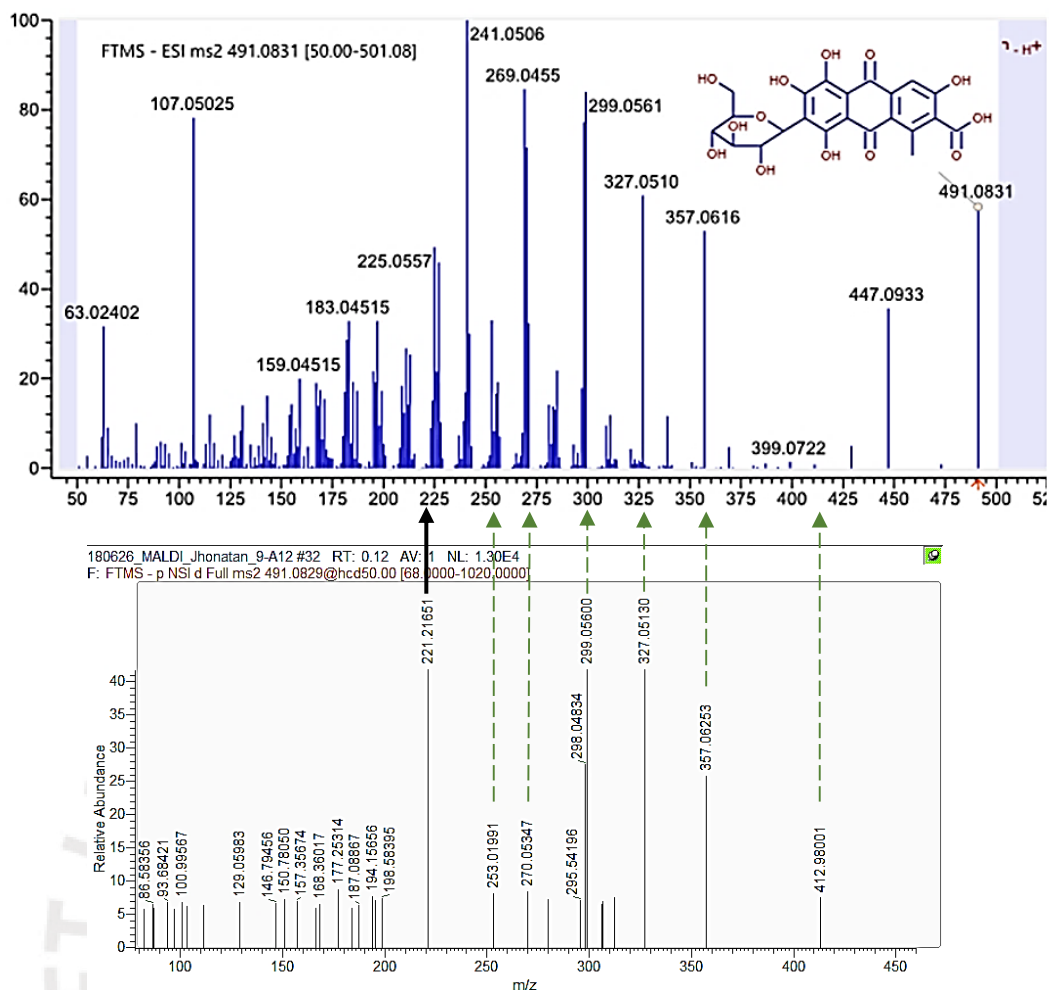


Figura 39. Comparación entre el patrón de fragmentación observado en un espectro de masas de tándem en una base de datos (arriba) ^[90] y el espectro de masas obtenido experimentalmente (abajo).

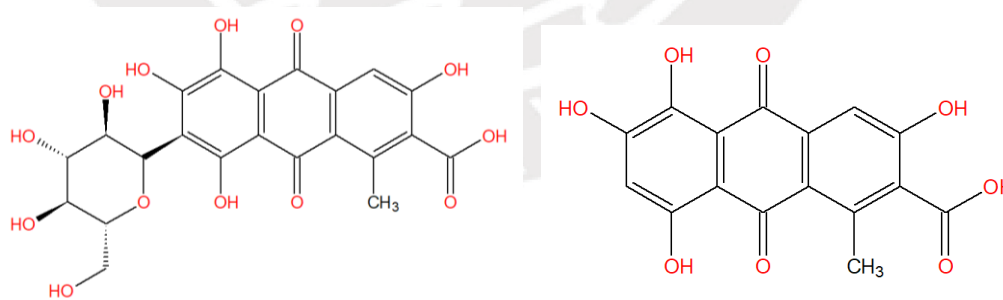


Figura 40. Estructuras del ácido carmínico (izquierda) y kermésico (derecha).

Al analizar el extracto de pintura en metanol con la matriz 9-aminoacridina se pudieron hallar los mismos iones $[M-H]^-$ encontrados en el estándar de ácido carmínico, pero con una intensidad con uno o dos órdenes de magnitud menor. Los espectros de masa de estos puntos se muestran en las Figuras 41-44. Este resultado puede deberse al uso de una

cantidad elevada de metanol durante la extracción y a la falta de un paso de concentración por evaporación del solvente, o también a la distribución no uniforme del analito en la matriz durante la aplicación sobre la placa metálica.

Si bien es cierto que la intensidad de los iones es baja, la exactitud de los iones hallados sugiere que, efectivamente, se tiene la presencia de un colorante orgánico de origen animal. Tampoco se encontró el ion $m/z = 256,16$ reportado en la información suplementaria de la referencia consultada,^[55] por lo que el uso de una laca vegetal roja (*Rubia tinctorum*) es poco probable. Esto abre la posibilidad de que se haya usado cochinilla (la cual era muy utilizada en América como colorante natural desde el siglo X)^[95], más no se descarta el uso de kermes (el cual es un insecto que produce una laca roja, utilizada en Europa desde la antigüedad).^[96,97] Es necesario, por tanto, realizar un análisis más exhaustivo para poder identificar el origen exacto de la laca roja animal.



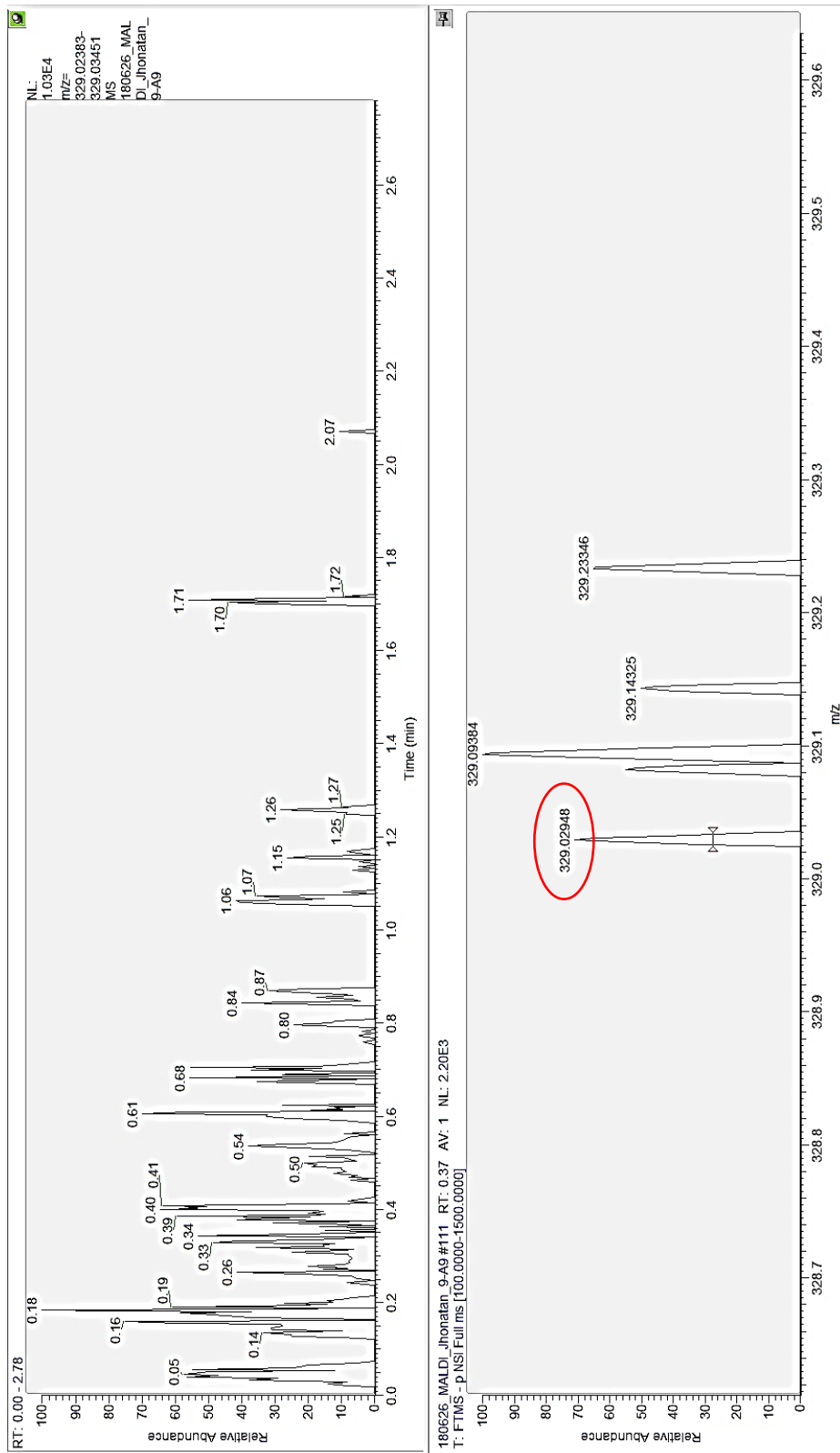


Figura 41. Espectro de masas ampliado de la muestra de ácido carmínico en metanol. Se observa el ion $m/z = 329,02948$, correspondiente al ácido kermésico, en gran parte de la muestra.

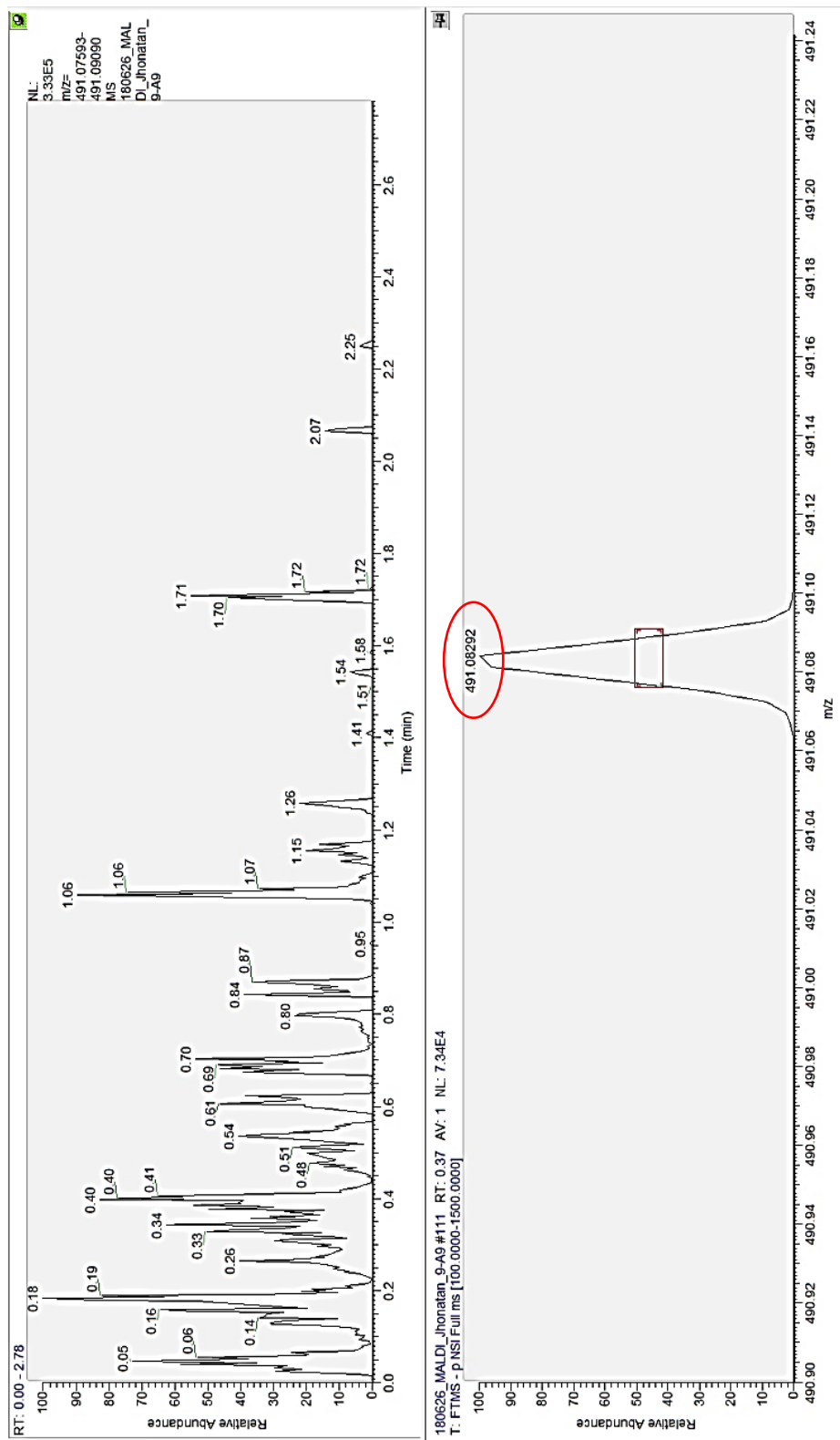


Figura 42. Espectro de masas ampliado de la muestra de ácido carmínico en metanol. Se observa el ion $m/z = 491,08292$, correspondiente al ácido carmínico, en gran parte de la muestra.

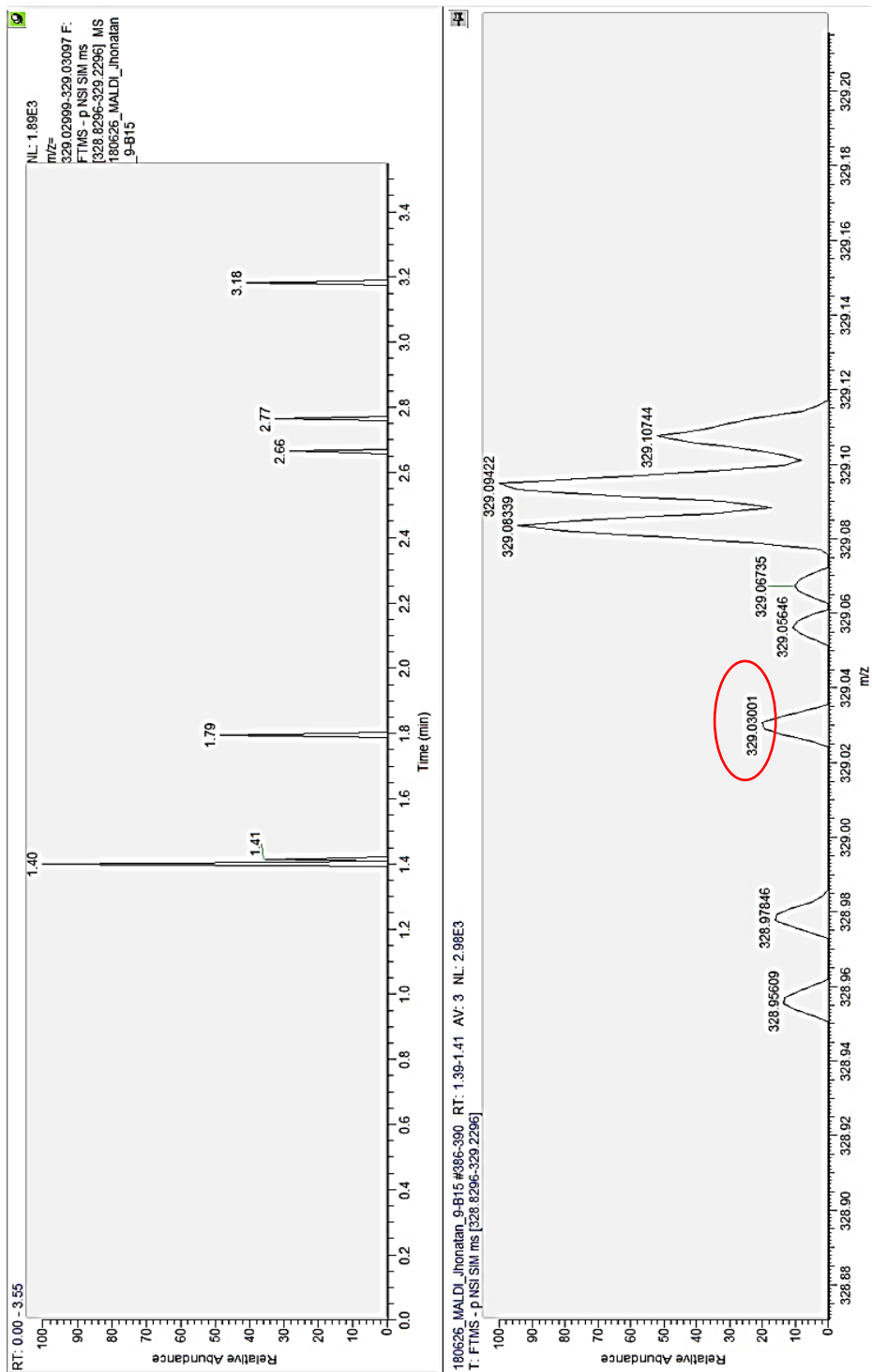


Figura 43. Espectro de masas ampliado de la micromuestra M12 en metanol. Se observa el ion $m/z = 329,03001$, correspondiente al ácido kermésico, en pocas zonas de la muestra.

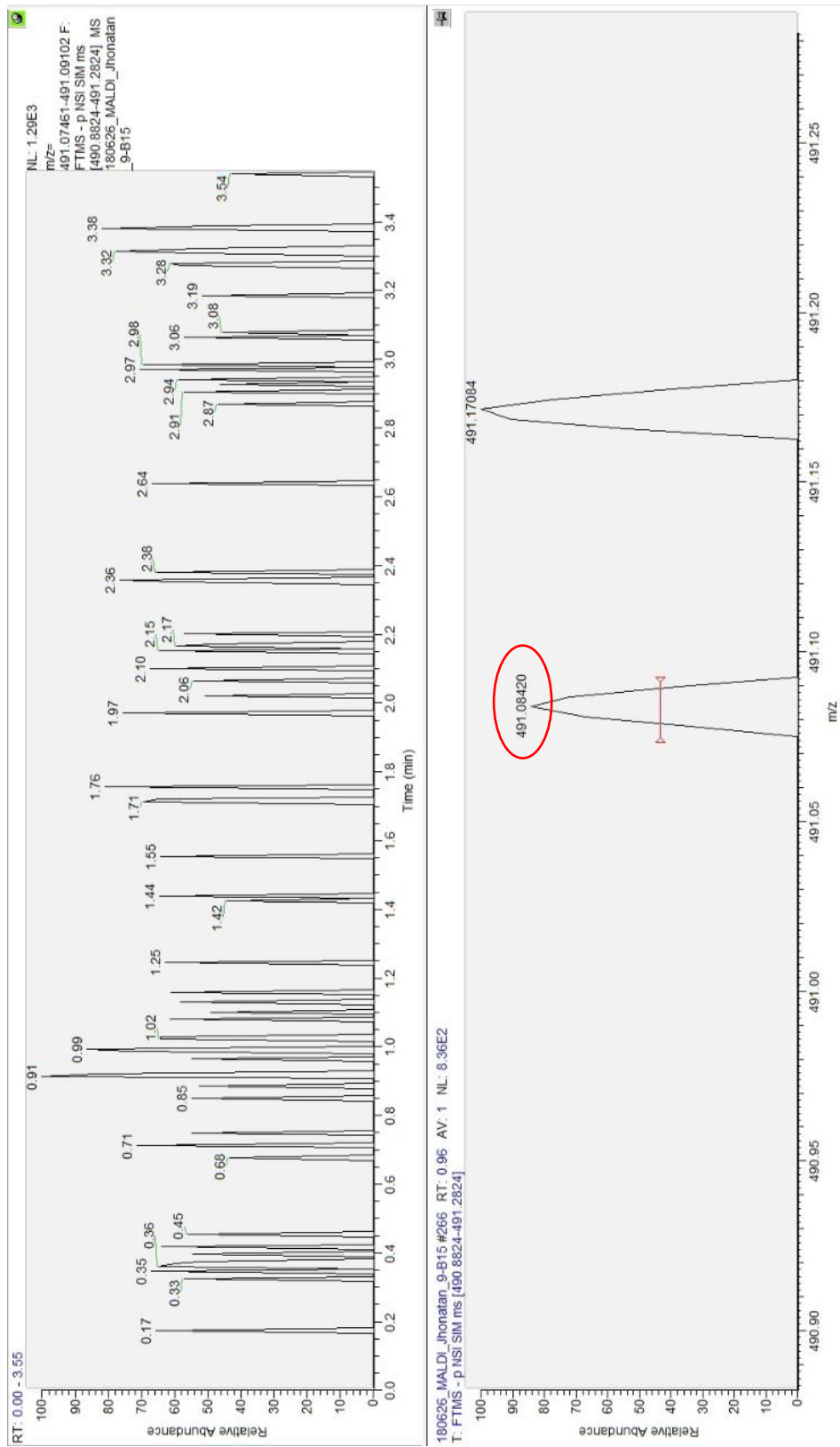


Figura 44. Espectro de masas ampliado de la micromuestra M12 en metanol. Se observa el ion $m/z=491,08420$, correspondiente al ácido carmínico, en gran parte de la muestra.

5.2.5 Evaluación de material proteico mediante tinción con Ponceau S

La micromuestra M16 fue tratada con Ponceau S al 3%. Se observó una fuerte coloración rosada en prácticamente toda la muestra, pero debido a su reducido tamaño fue difícil identificar una diferencia de tonos entre los colores presentes, tal como se observa en la Figura 45.

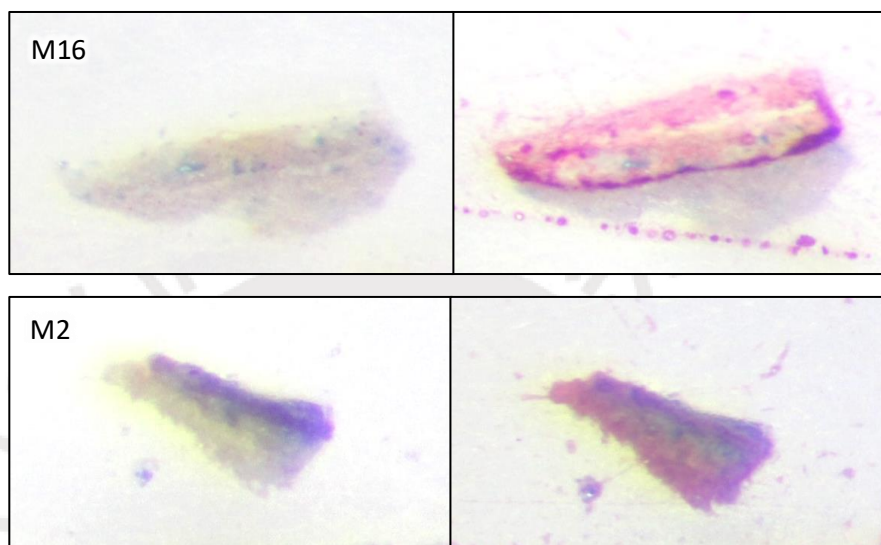


Figura 45. Columna izquierda: micromuestras de los puntos M16 y M2 vistas al microscopio. Columna derecha: micromuestras M16 y M2 al ser tratadas con Ponceau S con dos concentraciones distintas.

En la bibliografía consultada ^[73,98] se menciona que este agente de tinción es especialmente útil para detectar la presencia de yema de huevo y cola animal. Al parecer la concentración de la solución de tinción puede afectar notablemente los resultados obtenidos. En el caso de la micromuestra M2, la cual fue tratada con una solución de Ponceau S más concentrada, se observó que su capa de preparación se coloreó con un color rojizo intenso. En el tratamiento de la muestra M16, por el contrario, no se observó ninguna coloración en la capa de preparación, quizá por la menor concentración de la solución, pero sí una intensa coloración violácea y rosada de la capa delgada central y la capa superior.

El resultado de las tinciones realizadas sugiere la presencia de material proteico. Sin embargo, no es posible afirmar si se trata de cola animal o yema de huevo puesto que las coloraciones no permiten apreciar esta diferencia. Por ello, resulta necesario realizar un análisis más profundo de este material, probablemente por GC-MS, para proponer su identidad con mayor seguridad.

6. CONCLUSIONES

A partir de los análisis realizados con fluorescencia de rayos X, espectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido se logró caracterizar los principales materiales presentes en la obra. En general se observa un uso extensivo de blanco de plomo, azurita, bermellón y amarillo de plomo y estaño, así como yeso en la capa de preparación. El autor utilizó entre una y dos capas pictóricas, así como una capa de imprimación coloreada de tono marrón, cuya composición de hierro y aluminio revela la presencia de una tierra (ocre) o arcilla. Debido al grosor de dicha capa, se discutió la posibilidad de que el autor haya utilizado la técnica de *primuerset* en esta etapa de la preparación del soporte. Las coloraciones verdes fueron producto de la mezcla de azurita con un pigmento amarillo (posiblemente un ocre) pero en ningún caso se observó malaquita u otro pigmento verde de cobre.

El análisis por reflectancia infrarroja permitió observar con facilidad las craqueladuras de la obra, así como algunos trazos en la zona de la cruz central. En base a la fuerte absorción de esta radiación en algunas zonas de la obra se propuso el uso de ocre y negros de hueso, pero el segundo no pudo ser confirmado por las técnicas usadas.

El aceite de linaza, cuya presencia como aglutinante lipídico fue confirmada usando la relación entre los ácidos grasos palmítico y esteárico (P/S) en GC-MS, en presencia de blanco de plomo puede ser el origen de la elevada fluorescencia de color azulada de la obra al ser expuesta a luz ultravioleta. Así mismo, se identificó la presencia de resina colofonia en tres de las micromuestras analizadas por GC-MS, pero no es posible determinar si el barniz es original o si fue añadido en una época posterior. Mediante espectrometría de masas por ionización MALDI fue posible demostrar la presencia de una laca roja orgánica de origen animal. Dado el contexto geográfico e histórico en que se cree se creó la obra, esta laca podría ser cochinilla. Sin embargo, no se ha descartado el uso de kermes. Este punto puede ser explorado en trabajos futuros, ya que podría revelar más información sobre el origen de los materiales usados en dicha época y sobre la paleta del autor.

El estudio de micromuestras mediante tinciones sugieren el uso de material proteico en la obra, como pueden ser colas animales y huevo, lo cual sería consistente con lo que se esperaría para una pintura sobre tabla del siglo XVI, aunque es necesario confirmar estos materiales mediante otras técnicas.

A excepción de las zonas en las que se encontraron materiales que evidenciarían retoques o intervenciones posteriores con materiales modernos, todos los materiales hallados concuerdan con aquellos que los reportados en otras obras del siglo XVI. Este análisis contribuye a la comprensión de los materiales y técnicas utilizadas por el autor de la obra, con las cuales es posible realizar comparaciones con otras obras atribuidas a Bernardo Bitti.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Estabridis Cárdenas, R. La Obra de Bernardo Bitti en San Pedro de Lima. En *Redescubramos Lima: Iglesia de San Pedro*; Lima: Banco de Crédito, **1996**; pp. 18-23.
- [2] Querejazu Leyton, P. La «Madona del pajarito» de Bernardo Bitti: tratamiento de conservación y restauración. *Conserva*, **2001**, N.º 5, pp. 81-94.
- [3] Grupp, F.; Mercado de Grupp, Z. Bernardo Bitti : padre de la pintura virreinal americana. *Persona y cultura. Año 8, No. 8*. Arequipa: Universidad Católica San Pablo, **2010**, pp. 114-123.
- [4] Solórzano, Mónica. **2012**. La Coronación de la Virgen por la Santísima Trinidad de Bernardo Bitti en el arte peruano virreinal. Tesis de maestría en Historia, Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- [5] De Mesa, J.; Gisbert, T. El Hermano Bernardo Bitti - Escultor. *Actas las II Jornadas Andalucía y América*, **1983**, Vol. 2, pp. 411-427.
- [6] Bruquetas, R. Técnicas y materiales en la pintura limeña de la primera mitad del siglo XVII : Angelino Medoro y su entorno. *Goya*. Madrid, **2009**, pp. 144-161.
- [7] Martín García, L. Técnicas analíticas aplicadas a la conservación de Bienes Muebles: El estudio estratigráfico de películas pictóricas. *Boletín del Inst. Andaluz Patrim. Histórico*, **1996**, 16, pp. 30-37.
- [8] Mayer, L. Traditional Artists' Varnishes. http://www.conservation-wiki.com/wiki/IL:_Traditional_Artists%27_Varnishes (Acceso: 3 de julio de 2018).
- [9] Palet i Casas, A. *Tratado de pintura: color, pigmentos y ensayo*; Barcelona: Edicions de la Universitat de Barcelona, **2002**; Vol. 56.
- [10] Stols-Witlox, M.J.N. **2014**. Historical recipes for preparatory layers for oil paintings in manuals, manuscripts and handbooks in North West Europe, 1550-1900: analysis and reconstructions. Tesis doctoral, Amsterdam: University of Amsterdam.
- [11] Dunkerton, J.; Spring, M.; Billinge, R.; Kalinina, K.; Morrison, R.; Macaro, G.; Peggie, D.; Roy, A. Titian's Painting Technique before 1540. *National Gallery Technical Bulletin*. **2013**, pp. 4-31.
- [12] Dunkerton, J.; Spring, M. The development of painting on coloured surfaces in sixteenth-century Italy. *Stud. Conserv.*, **1998**, 43, pp. 120-130.
- [13] Popescu, C. M.; Dobeles, G.; Rossinskaja, G.; Dizhbite, T.; Vasile, C. Degradation

of lime wood painting supports. Evaluation of changes in the structure of aged lime wood by different physico-chemical methods. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2007**, 79, pp. 71-77.

- [14] Unger, A.; Schniewind, A. P.; Unger, W. *Conservation of Wood Artifacts: A Handbook*; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, **2001**.
- [15] Bruquetas, R.; Carrassón, A.; Kuon, A.; Fiorentino, C.; Gómez, M.; Estabridis, R. Materials and techniques in viceregal paintings and sculpture in Lima : 16th and 17th centuries. Ponencia presentada en *ICOM-CC Lisbon meeting*; Lisboa, **2011**.
- [16] Doerner, M. *The Materials of the Artist and their use in Painting*; New York: First Harvest, **1984**.
- [17] Uzielli, L.; Véliz, Z.; Wadum, J.; Walker, P. History of panel-making techniques in Central Italy. Ponencia presentada en *The structural conservation of panel paintings - Proceedings of a symposium at the J. Paul Getty Museum*; **1998**; Vol. 2, pp. 109-185.
- [18] Webster, S. V. Materiales, modelos y mercado de la pintura en Quito, 1550-1650. *Procesos: revista ecuatoriana de historia*. Quito, **2016**, pp. 37-64.
- [19] Rawle, A. The importance of particle sizing to the coatings industry. Part 1 : Particle size measurement. *Adv. Colour Sci. Technol.*, **2002**, 5 (1), pp. 1-12.
- [20] Gueli, A. M.; Bonfiglio, G.; Pasquale, S.; Troja, S. O. Effect of particle size on pigments colour. *Color Res. Appl.*, **2017**, 42 (2), pp. 236-243.
- [21] Scicolone, G. C. *Restauración de la pintura contemporánea: de las técnicas de intervención tradicionales a las nuevas metodologías*; Guipúzcoa: Nerea, **2002**.
- [22] Douma M. (curador). History of Pigments.
<http://www.webexhibits.org/pigments/intro/history.html> (Acceso: 13 de junio de 2018).
- [23] Kühn, H. Lead-Tin Yellow. *Stud. Conserv.*, **1968**, 13 (1), pp. 7-33.
- [24] Keune, K.; Kramer, R. P.; Huijbregts, Z.; Schellen, H. L.; Stappers, M. H. L.; van Eikema Hommes, M. H. Pigment Degradation in Oil Paint Induced by Indoor Climate: Comparison of Visual and Computational Backscattered Electron Images. *Microsc. Microanal.*, **2016**, pp. 1-10.
- [25] Atkins, P.; De Paula, J. *Physical Chemistry*, novena ed.; Nueva York: W. H. Freeman and Company, **2010**.
- [26] Reilly, D.; Ensslin, N.; Smith, Hastings, J.; Kreiner, S. *Passive Nondestructive Assay of Nuclear Materials*; Washington: U.S. Nuclear Regulatory Commission, **1991**.
- [27] Banwell, C. N. *The fundamental of molecular spectroscopy*, Tercera ed.; Londres:

McGraw-Hill, **1983**.

- [28] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, Stanley, R. *Principios De Análisis Instrumental*, sexta ed.; Santa Fe: CENGAGE Learning, **2008**.
- [29] Gilbert W. Castellan. *Physical Chemistry*, tercera ed.; Reading: Addison-Wesley, **1983**.
- [30] Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, octava ed.; Nueva York: W. H. Freeman and Company, **2010**.
- [31] Douma M. (curador). Visible & Beyond.
<http://www.webexhibits.org/pigments/intro/visible.html> (Acceso: 10 de febrero de 2018).
- [32] ISO (International Organisation of Standardisation). *ISO 21348-2007 Space environment (natural and artificial). Process for determining solar irradiances*; **2007**.
- [33] Mairinger, F. Chapter 2 UV-, IR- and X-ray imaging. *Compr. Anal. Chem.*, **2004**, 42, pp. 15-71.
- [34] de la Rie, E. R. Fluorescence of paint and varnish layers (part I). *Stud. Conserv.*, **1982**, 27 (1), pp. 1-7.
- [35] Carcelén, L. A.; González Mozo, A. Uso de la luz ultravioleta para el estudio del estado de conservación de la pintura de caballete. Ponencia presentada en *Investigación en conservación y restauración : II Congreso del Grupo Español del IIC*; Museu Nacional d'Art de Catalunya, Ed.; Barcelona, **2005**; pp. 1-12.
- [36] de la Rie, E. R. Fluorescence of Paint and Varnish Layers (Part III). *Stud. Conserv.*, **1982**, 27 (3), p. 102.
- [37] Delaney, J. K.; Zeibel, J. G.; Thoury, M.; Littleton, R.; Palmer, M.; Morales, K. M.; de la Rie, E. R.; Hoenigswald, A. Visible and Infrared Imaging Spectroscopy of Picasso's Harlequin Musician: Mapping and Identification of Artist Materials in Situ. *Appl. Spectrosc.*, **2010**, 64 (6), pp. 584-594.
- [38] Delaney, J. K.; Thoury, M.; Zeibel, J. G.; Ricciardi, P.; Morales, K. M.; Dooley, K. A. Visible and infrared imaging spectroscopy of paintings and improved reflectography. *Herit. Sci.*, **2016**, 4 (6), pp. 1-10.
- [39] Mansfield, J. R.; Attas, M.; Majzels, C.; Cloutis, E.; Collins, C.; Mantsch, H. H. Near infrared spectroscopic reflectance imaging: A new tool in art conservation. *Vib. Spectrosc.*, **2002**, 28 (1), pp. 59-66.
- [40] Wetzel, D. L. Near-infrared reflectance analysis. *Anal. Chem.*, **1983**, 55 (12), p. 1165A-1176A.
- [41] Smith, G. D.; Nunan, E.; Walker, C.; Kushel, D. Inexpensive, near-infrared

- imaging of artwork using a night-vision webcam for chemistry-of-art courses. *J. Chem. Educ.*, **2009**, 86 (12), pp. 1382-1388.
- [42] Tuschel, D. Selecting an Excitation Wavelength for Raman Spectroscopy. *Spectroscopy*, **2016**, 31 (3), pp. 14-23.
- [43] Desnica, V.; Škarić, K.; Jembrih-Simbuerger, D.; Fazinić, S.; Jakšić, M.; Mudronja, D.; Pavličić, M.; Peranić, I.; Schreiner, M. Portable XRF as a valuable device for preliminary in situ pigment investigation of wooden inventory in the Trski Vrh Church in Croatia. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, **2008**, 92 (1), pp. 19-23.
- [44] Bruker AXS. Introduction to X-Ray Fluorescence Analysis (XRF) <https://my.bruker.com/acton/attachment/2655/f-08f9/0/-/-/-/Introduction%2520to%2520XRF.pdf> (Acceso: 13 de noviembre de 2017).
- [45] Dik, J.; Janssens, K.; Van Der Snickt, G.; van der Loeff, L.; Rickers, K.; Cotte, M. Visualization of a Lost Painting by Vincent van Gogh Using Synchrotron Radiation Based X-ray Fluorescence Elemental Mapping. *Anal. Chem.*, **2008**, 80 (16), pp. 6436-6442.
- [46] Rochow, T. G.; Rochow, E. G. *An introduction to microscopy by means of light, electrons, X-rays, or ultrasound*; Press, P., Ed.; New York, **1978**; Vol. 2.
- [47] Egerton, R. F. *Physical Principles of Electron Microscopy*; Springer International Publishing, **2016**.
- [48] de Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass spectrometry: Principles and applications*, tercera ed.; Chippenham: Wiley-Interscience, **2007**.
- [49] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, Stanley, R. *Fundamentos de Química Analítica*, octava ed.; México, D.F.: Thomson Brooks/Cole, **2005**.
- [50] Cooksy, A. *Thermodynamics, Statistical Mechanics, and Kinetics*; Boston: Pearson Education, **2014**.
- [51] Poole, C. F. *The Essence of Chromatography*; Amsterdam: Elsevier Science B. V., **2003**.
- [52] Cole, R. B. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, segunda ed.; Hoboken: Wiley-Interscience, **2010**.
- [53] Kuckova, S.; Nemeč, I.; Hýnek, R.; Hradilova, J.; Grygar, T. Analysis of organic colouring and binding components in colour layer of art works. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 382 (2), pp. 275-282.
- [54] Perry, J. J.; Brown, L.; Jurneczko, E.; Ludkin, E.; Singer, B. W. Identifying the plant origin of artists' yellow lake pigments by electrospray mass spectrometry. *Archaeometry*, **2011**, 53 (1), pp. 164-177.

- [55] Sabatini, F.; Lluveras-Tenorio, A.; Degano, I.; Kuckova, S.; Krizova, I.; Colombini, M. P. A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Method for the Identification of Anthraquinones: the Case of Historical Lakes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2016**, *27* (11), pp. 1824-1834.
- [56] Gosetti, F.; Chiuminatto, U.; Mazzucco, E.; Mastroianni, R.; Marengo, E. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. *Food Chem.*, **2015**, *167*, pp. 454-462.
- [57] Serrano, A.; Sousa, M. M.; Hallett, J.; Lopes, J. A.; Oliveira, M. C. Analysis of natural red dyes (cochineal) in textiles of historical importance using HPLC and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *401* (2), pp. 735-743.
- [58] Lech, K.; Witkoś, K.; Wileńska, B.; Jarosz, M. Identification of unknown colorants in pre-Columbian textiles dyed with American cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, *407* (3), pp. 855-867.
- [59] Melo, M. J.; Claro, A. Bright light: Microspectrofluorimetry for the characterization of lake pigments and dyes in works of art. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43* (6), pp. 857-866.
- [60] Lluveras, A.; Bonaduce, I.; Andreotti, A.; Colombini, M. P. GC/MS analytical procedure for the characterization of glycerolipids, natural waxes, terpenoid resins, proteinaceous and polysaccharide materials in the same paint microsample avoiding interferences from inorganic media. *Anal. Chem.*, **2010**, *82* (1), pp. 376-386.
- [61] Andreotti, A.; Bonaduce, M.; Colombini, M. P.; Gautier, G.; Modugno, F.; Ribechini, E. Combined GC/MS analytical procedure for the characterization of glycerolipid, waxy, resinous, and proteinaceous materials in a unique paint microsample. *Anal. Chem.*, **2006**, *78* (13), pp. 4490-4500.
- [62] Colombini, M. P.; Modugno, F.; Giannarelli, S.; Fuoco, R.; Matteini, M. GC-MS characterization of paint varnishes. *Microchem. J.*, **2000**, *67* (1-3), pp. 385-396.
- [63] Boon, J. J. Investigating Fluidizing Dripping Pink Commercial Paint on Van Hemert's Seven-Series Works from 1990–1995. En *Issues in Contemporary Oil Paint*; Nueva York: Springer, **2014**; pp. 227-246.
- [64] Cartoni, G.; Russo, M. V.; Spinelli, F.; Talarico, F. Characterisation of fresh and aged terpenic resins by micro-FTIR and GC-MS analyses of varnishes in XVI-XVII centuries paintings. *Ann. Chim.*, **2003**, *93* (11), pp. 849-861.

- [65] Marinach, C.; Papillon, M. C.; Pepe, C. Identification of binding media in works of art by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Cult. Herit.*, **2004**, *5* (2), pp. 231-240.
- [66] Colombini, M. P.; Modugno, F.; Giacomelli, M.; Francesconi, S. Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *846* (1-2), pp. 113-124.
- [67] Manzano, E.; Rodríguez-Simón, L. R.; Navas, N.; Checa-Moreno, R.; Romero-Gámez, M.; Capitan-Vallvey, L. F. Study of the GC-MS determination of the palmitic-stearic acid ratio for the characterisation of drying oil in painting: La Encarnación by Alonso Cano as a case study. *Talanta*, **2011**, *84* (4), pp. 1148-1154.
- [68] Bonaduce, I.; Carlyle, L.; Colombini, M. P.; Duce, C.; Ferrari, C.; Ribechini, E.; Selleri, P.; Tiné, M. R. New Insights into the Ageing of Linseed Oil Paint Binder: A Qualitative and Quantitative Analytical Study. *PLoS One*, **2012**, *7* (11).
- [69] Mills, J. S. The Gas Chromatographic Examination of Paint Media. Part 1. Fatty Acid Composition and Identification of Dried Oil Films. *Stud. Conserv.*, **1966**, *11* (2), p. 92.
- [70] Kouloumpi, E.; Lawson, G.; Pavlidis, V. The contribution of gas chromatography to the resynthesis of the post-Byzantine artist's technique. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387* (3), pp. 803-812.
- [71] Mills, J. S.; White, R. *The Organic Chemistry of Museum Objects*; Londres: Butterworth & Co, **1987**.
- [72] Colombini, M. P.; Modugno, F. *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*; John Wiley & Sons, **2009**.
- [73] Sandu, I. C. A.; Schäfer, S.; Magrini, D.; Bracci, S.; Roque, C. a. Cross-Section and Staining-Based Techniques for Investigating Organic Materials in Painted and Polychrome Works of Art: A Review. *Microsc. Microanal.*, **2012**, *18* (04), pp. 860-875.
- [74] Valencia, Rafael. **2018**. Empleo de técnicas no invasivas y microdestructivas para la caracterización química de dos lienzos de la Capilla San Francisco de Borja (Iglesia San Pedro de Lima). Tesis de maestría en Química, Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- [75] White, R.; Pilc, J. Analyses of Paint Media. *Natl. Gall. Tech. Bull.*, **1996**, *17*, pp. 89-103.
- [76] ASTM International. ASTM D5974-15 Standard Test Methods for Fatty and

Rosin Acids in Tall Oil Fractionation Products by Capillary Gas Chromatography. West Conshohocken, PA, **2015**.

- [77] Schilling, M. R.; Keeney, J.; Leamer, T. Characterization of Alkyd Paint Media By Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Stud. Conserv.*, **2004**, *49* (sup2), pp. 197-201.
- [78] Zou, Y.; Wu, H. Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters Using Three Types of Capillary GC columns. Agilent Technologies, **2017**.
- [79] Attas, M.; Cloutis, E.; Collins, C.; Goltz, D.; Majzels, C.; Mansfield, J. R.; Mantsch, H. H. Near-infrared spectroscopic imaging in art conservation: investigation of drawing constituents. *J. Cult. Herit.*, **2003**, *4* (2), pp. 127-136.
- [80] Fotakis, C.; Anglos, D.; Zafiropulos, V.; Georgiou, S.; Tornari, V. *Lasers in the Preservation of Cultural Heritage: Principles and Applications*; Boca Raton: Taylor & Francis, **2006**.
- [81] Douma M. (curador). Vermilion - Pigments through the Ages. <http://www.webexhibits.org/pigments/individ/overview/vermilion.html> (Acceso: 16 de febrero de 2018).
- [82] Han, K.; Nam, J. Y.; Ji, J. E.; Kang, D. I.; Lee, H.; Baek, N.; Song, Y.; Yang, I. S. Existence of nanoparticles in azurite and malachite pigments – Raman spectroscopy and X-ray diffraction studies. *Dye. Pigment.*, **2016**, *133* (July), pp. 232-237.
- [83] Domínguez, J. M.; Schifter, I. I. ¿Qué son las arcillas? En *Las Arcillas: El Barro Noble*; México, D.F.: Fondo de Cultura Económica, **1995**.
- [84] Scalarone, D.; Lazzari, M.; Chiantore, O. Ageing behavior and pyrolytic characterization of diterpenic resins used as art materials: colophony and Venice turpentine. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2002**, *64* (2), pp. 345-361.
- [85] Romero-Noguera, J.; Bolívar-Galiano, F. C.; Ramos-López, J. M.; Fernández-Vivas, M. A.; Martín-Sánchez, I. Study of biodeterioration of diterpenic varnishes used in art painting: Colophony and Venetian turpentine. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **2008**, *62* (4), pp. 427-433.
- [86] Heginbotham, A.; Khanjian, H.; Rivenc, R.; Schilling, M. A procedure for the efficient and simultaneous analysis of Asian and European lacquers in furniture of mixed origin. Ponencia presentada en *15th triennial conference, New Delhi, 22-26 September 2008: preprints/ICOM Committee for Conservation*; **2008**; pp. 1100-1108.
- [87] Poole, C. F. *Gas Chromatography*; Massachusetts: Elsevier Inc., **2012**.
- [88] Magnusson, B.; Ornemark, U. (eds.). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of*

Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.

- [89] Ziegel, E. R. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; **2004**; Vol. 46.
- [90] HighChem LLC. Carminic Acid MS/MS spectra.
[https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference\\$1327/T4129%23Standard/Recalibrated/419842](https://www.mzcloud.org/DataViewer#/Main/reference$1327/T4129%23Standard/Recalibrated/419842) (Acceso: 28 de junio de 2018).
- [91] Mathur, R.; O'Connor, P. B. Artifacts in Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2009**, *23* (4), pp. 523-529.
- [92] Allevi, P.; Anastasia, M.; Bingham, S.; Ciuffreda, P.; Fiecchi, A.; Cighetti, G.; Muir, M.; Scala, A.; Tyman, J. Synthesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal. *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. 1*, **1998**, N.º 3, pp. 575-582.
- [93] Damant, A. P. Food colourants. En *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*; Oxford: Woodhead Publishing Limited, **2011**; Vol. 2, pp. 252-305.
- [94] Jørgensen, K.; Skibsted, L. H. Light sensitivity of cochineal. Quantum yields for photodegradation of carminic acid and conjugate bases in aqueous solution. *Food Chem.*, **1991**, *40* (1), pp. 25-34.
- [95] Ramírez-Puebla, S. T.; Rosenblueth, M.; Chávez-Moreno, C. K.; Catanho Pereira de Lyra, M. C.; Tecante, A.; Martínez-Romero, E. Molecular Phylogeny of the Genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and Identification of the Symbiotic Bacteria. *Environ. Entomol.*, **2010**, *39* (4), pp. 1178-1183.
- [96] Barnett, J. R.; Miller, S.; Pearce, E. Colour and art: A brief history of pigments. *Opt. Laser Technol.*, **2006**, *38* (4-6), pp. 445-453.
- [97] Schweppe, H.; Roosen-Runge, H. Carmine - Cochineal Carmine and Kermes Carmine. En *Artists' Pigments: a Handbook of their History and Characteristics*; s/l: Archetype Publications, **1986**.
- [98] Johnson, M.; Packard, E. Methods used for the identification of binding media in Italian paintings of the fifteenth and sixteenth centuries. *Stud. Conserv.*, **1971**, *16* (4), pp. 145-164.