

**Aplicaciones de la espectroscopía SERS
(Surface-Enhanced Raman Scattering)
a la detección de
pigmentos orgánicos naturales
en objetos del Patrimonio Cultural**

*C. Domingo, M.V. Cañamares, Z. Jurasekova,
E. del Puerto, S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos*

Instituto de Estructura de la Materia, CSIC

Serrano 123, 28006 Madrid

Publicado en:

"Plasmónica: detección sobre nanoestructuras metálicas", P. Sevilla (Ed.),
Sociedad Española de Óptica, Madrid 2010. ISBN: 978-84-693-2183-6
pp. 197-230

Introducción

1. Estado del arte en la detección de PCON: otras técnicas y SERS

2. Resumen de los resultados obtenidos en el Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Madrid

2.1 SERS de antraquinonas

2.1.1 Alizarina

2.1.2 Ácido carmínico

2.2 SERS de curcuminoides

2.2.1 Curcumina

2.3 SERS de flavonoides

2.4 Determinación SERS de antraquinonas y flavonoides en fibras textiles teñidas

2.4.1 Dispositivo experimental, y espectros SERS de disoluciones mezclas de PCON

2.4.2 Espectros SERS en muestras patrón y en una muestra arqueológica

2.4.2.1 Fibras teñidas con antraquinonas

2.4.2.2 Fibras teñidas con flavonoides

3. Resumen y conclusiones

Agradecimientos

Referencias

Introducción

La espectroscopía Raman, cuyas prestaciones se han visto considerablemente mejoradas en los últimos 15 años debido a la introducción de técnicas de microscopía (que han sido posibles gracias a importantes avances tecnológicos en filtros ópticos y detectores de alta sensibilidad), se ha convertido en una técnica de identificación molecular de gran utilidad en el campo del Patrimonio Cultural [1]. Al igual que la más conocida espectroscopía Infrarroja, la espectroscopía Raman proporciona información sobre los compuestos moleculares presentes en la muestra bajo estudio, ampliando por ello la información acerca de la presencia de elementos químicos que suministran otras técnicas espectroscópicas tales como XRF, SEM-EDX, PIXE y LIBS utilizadas habitualmente en el análisis de objetos artísticos [2]. Hoy en día podemos encontrar la técnica de microscopía Raman en los departamentos de Conservación y Restauración de los más importantes Museos y Bibliotecas de todo el mundo, utilizándose como técnica no destructiva (incluso *in situ*) para diagnóstico de diferentes materiales que van desde los pigmentos inorgánicos hasta los biomateriales, en objetos artísticos tan diferentes como manuscritos, pinturas, textiles, cerámicas, vidrios, esculturas, monumentos, e incluso momias o cañones hundidos. La información que se obtiene puede resultar decisiva para la datación y autenticación de las obras artísticas, y ayuda a determinar los cambios físicos y/o químicos que han contribuido a su deterioro a través de la identificación de los productos de degradación de los materiales originales.

De entre todos los materiales de interés en el Patrimonio Cultural, vamos a referirnos aquí a los pigmentos y colorantes orgánicos naturales (PCON) que han sido utilizados desde la antigüedad y cuya correcta identificación supone un verdadero reto. De hecho desde 1982 se celebra anualmente un Congreso (“Dyes in History and Art”, DHA) en el que se reúnen historiadores, conservadores y científicos de distintos campos a la búsqueda de mejores métodos de caracterización de colorantes orgánicos naturales que, preferiblemente, sean no destructivos o micro destructivos y que puedan aplicarse *in situ*. En lo referente a una exitosa aplicación de la espectroscopía Raman a la caracterización de estos materiales, nos encontramos con dos graves problemas, ya que los colorantes orgánicos naturales: a) presentan una elevada fluorescencia cuando son iluminados por los láseres visibles utilizados para excitar el efecto Raman y b) están en muy bajas concentraciones en las obras de arte debido a su alto poder de tinción. Ambas situaciones resultan críticas para la espectroscopía Raman ya que, por una parte, la emisión de fluorescencia de los compuestos es muchísimo más intensa que la dispersión Raman y oculta por completo el espectro Raman, y por otra parte, la baja sensibilidad de la técnica Raman no permite la detección de cantidades tan pequeñas como las utilizadas de PCON.

Existe otra técnica Raman no convencional [3] denominada en inglés *Surface-Enhanced Raman Scattering*, (SERS), o espectroscopía Raman intensificada por superficies metálicas nanoestructuradas, que puede superar los dos inconvenientes mencionados anteriormente ya que, la intensidad de los espectros Raman de

moléculas adsorbidas o muy próximas a tales superficies puede aumentar hasta 6 órdenes de magnitud (o más en el caso de Resonancia Raman) respecto de la intensidad de los correspondientes espectros en ausencia del metal. Además, en estas condiciones, la fluorescencia molecular se atenúa de modo muy considerable, ya que no es intensificada como lo es el espectro Raman.

En otros capítulos de este libro se explican los fundamentos teóricos de la espectroscopía SERS, basada en la excitación de los plasmones superficiales localizados que soportan las nanoestructuras metálicas utilizadas, así como los mecanismos electromagnético y químico (o de transferencia de carga) responsables de la enorme intensificación que se observa en los espectros Raman de moléculas adsorbidas o próximas a dichas superficies metálicas nanoestructuradas. También se describen los métodos experimentales del SERS y los diferentes tipos de sustratos. En las páginas siguientes de este capítulo presentaremos, en primer lugar, el estado del arte de la aplicación de la espectroscopía SERS a la caracterización de pigmentos y colorantes orgánicos naturales, tanto en el laboratorio como en muestras reales. Después resumiremos algunos de los resultados más destacados obtenidos en nuestro grupo del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC en Madrid en los últimos años, referentes a la caracterización SERS de los miembros más representativos de las dos familias de pigmentos orgánicos naturales más empleadas en obras del Patrimonio Cultural, las antraquinonas (rojas) y los flavonoides (amarillos), así como la curcumina, de la familia de los curcuminoides. Se hará especial mención de un método pionero puesto a punto en nuestro grupo, en el que, tras la producción de nanopartículas de plata “sobre la fibra teñida” mediante fotorreducción con láser, se puede detectar el espectro SERS de los colorantes empleados para teñir la fibra (excitando con el mismo láser), sin necesidad de llevar a cabo ni la hidrólisis del complejo que el colorante forma con el mordiente utilizado en la tinción, ni extracción química alguna.

1. Estado del arte en la detección de PCON: otras técnicas y SERS

Ya hemos dicho que la detección de PCON en objetos artísticos supone un gran reto para investigadores y conservadores. Cuando se emplean para teñir fibras o como pigmentos en obras de arte, se encuentran en forma de complejos insolubles con aluminio o con otros iones metálicos procedentes del mordiente utilizado, por lo que se requiere hidrolizar el complejo antes de aplicar técnicas analíticas para determinación del colorante. Las técnicas más utilizadas son técnicas de cromatografía, fundamentalmente HPLC, acopladas a diferentes sistemas de detección (espectroscopía UV-visible, fluorescencia, espectrometría de masas, etc.) [4-6]. Estos métodos se usan también para medidas cuantitativas, si bien hay que tener en cuenta que los resultados que se obtienen dependen del proceso de hidrólisis empleado así como de los disolventes utilizados para llevar a cabo la extracción química. Las técnicas cromatográficas tienen la desventaja de que son destructivas y requieren una cantidad relativamente grande de muestra, de la que no siempre se dispone cuando se trata con obras de arte. El hecho es que hay un gran interés en desarrollar e implementar técnicas no- o micro-destructivas para detección de

PCON, y que, a ser posible permitan la detección “en la fibra/pieza artística” sin necesidad de que haya que tomar muestra de la misma. También es interesante detectar los productos de degradación de los PCON, ya que muchos de ellos son lábiles, y obtener información sobre la interacción de los mismos con los medios ligantes que se utilizan para ser utilizados como pinturas, etc.

La microespectroscopía Raman, que es de gran utilidad en el análisis de pigmentos inorgánicos [7] y muchos pigmentos orgánicos sintéticos [8-11] utilizados en obras del Patrimonio Cultural, no lo es tanto cuando se trata de detectar PCON por los motivos ya expuestos: su alta fluorescencia y su baja concentración en las muestras teñidas. Existen unos pocos métodos que pueden eliminar o reducir el enorme fondo debido a la fluorescencia que aparece en la detección convencional Raman de PCON. Así, se puede utilizar un láser de mayor longitud de onda (en el infrarrojo próximo) y utilizar detección interferométrica (FT-Raman) [12] o cambiar ligeramente la longitud de onda del láser de excitación y aplicar después tratamientos matemáticos a los espectros obtenidos, tal y como se propone en los métodos de “*shift-excitation Raman difference spectroscopy*” (SERDS) y “*subtracted shifted Raman spectroscopy*” (SSRS) [13]. Si se utiliza alguna de estos dos métodos, es posible trabajar en condiciones de resonancia Raman (con láser de excitación a 532 nm) con la correspondiente ventaja de aumento de la señal Raman. De este modo se han detectado recientemente colorantes y lacas orgánicos [14].

La espectroscopía SERS que, como hemos dicho, presenta ventajas para detectar PCON, se descubrió en 1974 [3] y durante sus primeros 30 años de vida fue únicamente utilizada en estudios exploratorios de dos de ellos, en concreto, la alizarina (AZ) [15] (roja) y la emodina [16] (amarilla). Sin embargo, a partir de 2004 [17, 18] han empezado a aparecer publicaciones con resultados de aplicación sistemática de la espectroscopía SERS al estudio y caracterización de PCON y algunos de los desarrollos llevados a cabo en el laboratorio se han podido transferir de modo eficaz a la detección de varios de ellos en objetos artísticos pertenecientes a colecciones de renombrados museos [19-21]. Han sido varias las estrategias llevadas a cabo en los últimos siete años en nuestro grupo de investigación de Madrid, y en otros 2-3 grupos en USA, hasta conseguir que la técnica SERS pueda considerarse una técnica micro-destructiva, con posibilidades de ser aplicada *in situ* y con una sensibilidad que, al menos en estudios de laboratorio, se aproxima bastante a la de los métodos cromatográficos habitualmente utilizados para detección de PCON. Más aún, en dos aproximaciones distintas publicadas recientemente [22-24] se ha demostrado que el análisis mediante SERS presenta la importante ventaja adicional de que no requiere que la muestra sea sometida a tratamientos químicos previos tales como los procedimientos usuales de hidrólisis y extracción que son necesarios para los análisis por cromatografía.

Es tal el interés despertado por los últimos resultados, que algunos “titulares” presentan a la espectroscopía SERS como la técnica que “está permitiendo a los conservadores re-escribir secciones de la historia del arte” y que “potencialmente puede cambiar la comprensión de la historia humana” [25]. Conviene no quedarse en los titulares y, celebrando los éxitos alcanzados hasta el momento y mirando con relativo optimismo al futuro, ser conscientes de las limitaciones de la técnica, que las

tiene, y de que estamos todavía lejos de que sea una realidad su utilización de modo rutinario (afortunadamente, en el mismo artículo [25] también se habla de estas limitaciones). Hay que seguir investigando y mejorando los procedimientos, porque queda mucho camino por recorrer si se quiere que, realmente, la espectroscopía SERS sea una técnica de amplia utilización en los museos, bibliotecas e instituciones semejantes relacionadas con el patrimonio Cultural. Y, en cualquier caso, no se trata de que sea “la panacea” que desplace a las demás técnicas, sino una técnica más que puede colaborar con el resto de manera eficaz para desvelar la historia de las obras del Patrimonio Cultural y proporcionar datos para su mejor restauración y conservación.

Para llegar a esta situación tan prometedora en que nos encontramos, han sido necesarios muchos trabajos de investigación en el laboratorio sobre PCON puros, con metodologías encaminadas a determinar las condiciones experimentales (longitud de onda del láser de excitación, tipo de sustrato SERS, pH de las disoluciones, etc.) que dan los mejores espectros SERS para cada compuesto molecular, estableciéndose en ocasiones los límites de concentración detectable. Las “variables experimentales” son tales porque la espectroscopía SERS se basa en la excitación resonante (por el láser utilizado) de los plasmones superficiales localizados que soportan las nanopartículas metálicas. Las propiedades (absorción) de esos plasmones dependen de la morfología (tamaño y forma) de las mismas, que cambia en función del método de preparación de los sustratos SERS (coloides, islotes, etc.). Será también necesario establecer la longitud de onda del láser más adecuada para cada tipo de sustratos. Y, además, las propiedades físico-químicas de las superficies metálicas nanoestructuradas juegan también un papel nada despreciable en la intensificación SERS y en la orientación de las especies moleculares respecto de la superficie, por lo que es también necesario llevar a cabo estudios sistemáticos variando el agente reductor (en los coloides), así como la concentración y el pH de las disoluciones de la molécula bajo estudio. Son, pues, muchas las variables a tener en cuenta y, por lo tanto, muy laboriosos los trabajos de investigación que se han realizado.

La mayor parte de los estudios SERS de PCON se refieren a antraquinonas (alizarina (AZ) [17, 18], purpurina (PUR) [18], ácido carmínico [26], ácido lacáico [27]) y flavonoides [28-31], aunque también se han estudiado los espectros SERS de la curcumina [32] y de varios alcaloides [33, 34]. En algunos de estos estudios se han realizado además predicciones teóricas de los espectros Raman de los correspondientes compuestos, que ayudan en la asignación vibracional de los espectros Raman y SERS experimentalmente obtenidos. Asimismo se han publicado espectros SERS de otros PCON (naftoquinonas, colorantes liquénicos [35], colorantes extraídos del palo de brasil [35, 36] y carotenoides [37]) no pertenecientes a las familias antes mencionadas.

En cuanto a los sustratos SERS utilizados, la mayoría de los estudios se han realizado utilizando coloides de plata reducidos con citrato [16, 18-22, 28-35, 37-40], hidroxilamina [17, 26, 27, 32] o borohidruro [39], pero también se han utilizado otros sustratos: electrodos [15, 31], Ag-Al₂O₃ [41], espejos Tollens [35, 41], películas de islotes de plata evaporados en vacío [35, 42] o depositados mediante haz

de electrones [36], películas de plata sobre nanoesferas [43] y nanopartículas de plata obtenidas “en la muestra” mediante fotorreducción con láser [23, 24, 44].

También se han publicado experimentos “*proof-of-concept*” en muestras reales de obras de arte, ya sea realizando tratamientos previos de hidrólisis y extracción [21, 30, 33], solo hidrólisis [35] o sin tratamientos previos [19, 22-24]. Y en cuanto a los materiales de los objetos de estudio reales, tanto en estos últimos experimentos como en otros casos [21, 30, 33] se trataba de muestras textiles teñidas, si bien también se ha realizado detección SERS de PCON en otros materiales [20, 36, 40, 42].

La espectroscopía SERS, además de permitir la identificación de los compuestos moleculares, en este caso PCON, proporciona información estructural adicional de gran interés acerca de las especies moleculares presentes en el medio y su orientación con respecto a la superficie metálica nanoestructurada [16, 17, 26, 32]. Y más aún, tratando de simular el efecto que agentes ligantes tales como el huevo que se aplica en las pinturas de tempera, pueden tener sobre los propios pigmentos, se ha utilizado la técnica SERS para estudiar la interacción entre la alizarina y ovoalbúmina [38]. Los datos SERS acerca de la interacción permiten dar una explicación plausible del cambio de color observado en el pigmento en presencia de ovoalbúmina.

2. Resumen de los resultados obtenidos en el Instituto de Estructura de la Materia, CSIC, Madrid

2.1 SERS de antraquinonas

2.1.1 Alizarina

La alizarina se extrae de las raíces del árbol *Rubia tinctorum* y los egipcios ya lo empleaban en el tinte de telas, los romanos lo emplearon en los frescos de Pompeya, y Carlomagno promovió el cultivo de dicho árbol en Europa. Se han encontrado desde manuscritos (972, certificado de matrimonio del emperador Theophanum) hasta acuarelas (1850, J.M.W. Turner), en los que se emplea alizarina para obtener, sobre todo, el color rojo. Probablemente, las causas por las que la utilización de alizarina ha sido tan extendida sean, el intenso y brillante color que proporciona, y la lenta pérdida de coloración con el tiempo. El origen de estas propiedades está relacionado con la forma de laca con la que viene aplicado. Para obtener la laca, el pigmento se mezcla con un soporte inorgánico denominado mordiente que le da una mayor estabilidad. El mordiente contiene elementos metálicos como Cu, Cr, Fe o Al con los que la alizarina forma complejos cuya coloración depende del metal y de las condiciones de reacción. Aunque la laca se emplea pura en la elaboración de vidriados, para su uso en pintura es necesario mezclarla con un ligante y/o dispersante, como por ejemplo, aceite, goma o clara de huevo, materiales que podrían ser la causa de las variaciones de color que han llegado hasta nuestros días y que es necesario caracterizar simultáneamente con el colorante. Es muy fluorescente

y prácticamente insoluble en agua, pero estos “inconvenientes” no son realmente tales para su estudio mediante espectroscopía SERS.

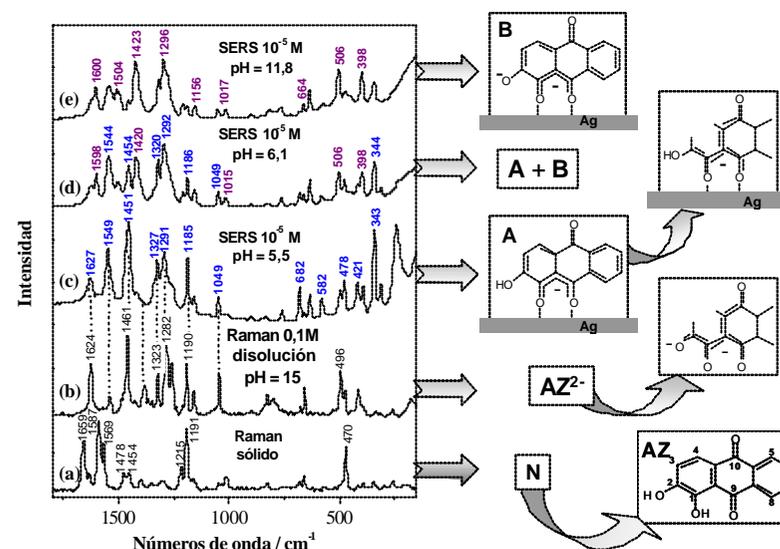


Figura 1. Espectros Raman y SERS de alizarina, sobre coloides de plata de hidroxilamina, excitados a 1064 nm, en las condiciones indicadas, así como las diferentes especies moleculares que dan lugar a los mismos. (Adaptada de [45])

Como ilustración, en la Fig. 1 se presentan espectros Raman excitados a 1064 nm de alizarina en polvo (a) y en disolución acuosa alcalina (b), y los espectros SERS de alizarina utilizando coloides metálicos preparados por reducción con hidroxilamina, a concentración fija y tres valores de pH (c-e). Como paso previo a la interpretación de los espectros SERS se llevaron a cabo estudios de espectroscopía de absorción UV-vis de las correspondientes soluciones, de los que se deduce la existencia de varias formas iónicas de AZ. Las bandas de los espectros SERS de AZ pueden ser asignadas a vibraciones de las mismas [17] lo que permite concluir que no es la forma neutra N de la alizarina (bandas características señaladas en Fig. 1 a) la que se adsorbe sobre la superficie de plata, sino especies aniónicas (monoaniónica A - bandas marcadas en Fig. 1 c - a pH ácido, dianiónica B - bandas marcadas en Fig. 1 e - a pH básico y mezcla A+B a pH intermedio - Fig. 1 c -). El comportamiento de la alizarina en la superficie metálica es distinto del observado en la disolución acuosa, si bien, como puede observarse en las estructuras moleculares de la Fig. 1, la forma A da lugar a una deslocalización electrónica en el anillo muy similar a la de la especie AZ²⁻ que es la que se forma en disolución acuosa alcalina (1b).

En la Fig. 2 se ilustra el efecto sobre los espectros SERS de alizarina del cambio de concentración, a excitación láser fija a 514 nm, así como de cambio de longitud

de onda del láser, manteniendo fija la concentración. En todos los casos se mantiene el pH fijo a 6,1. Los resultados indican que las bandas correspondientes a la especie A se intensifican por efecto de resonancia electrónica cuando el espectro es excitado con láser de menor longitud de onda (514 nm). Y que es la especie B la que primero se adsorbe, ya que es su espectro SERS el que se observa a muy bajas concentraciones de alizarina. Parece que la forma neutra se aproxima a la superficie cuando esta ya se encuentra recubierta con las especies aniónicas, es decir cuando se aumenta bastante la concentración.

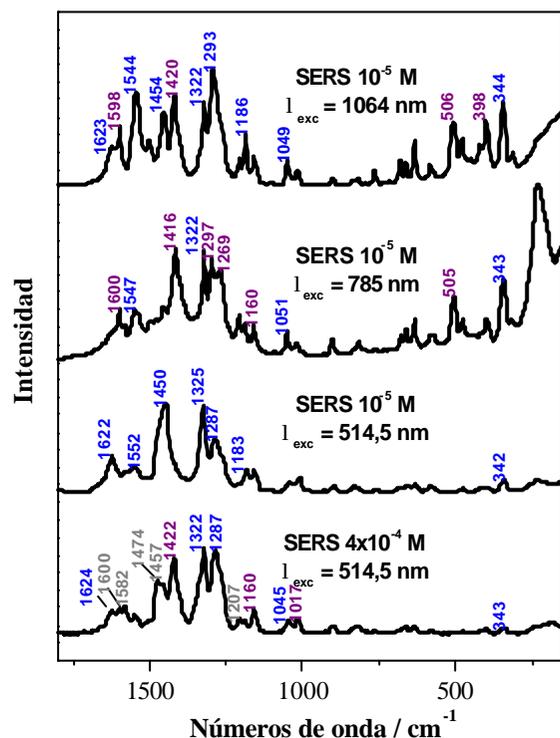


Figura 2. Espectros SERS de alizarina, sobre coloides de plata de hidroxilamina, excitados a varias longitudes de onda y a las concentraciones indicadas. (Adaptada de [45])

A partir de los resultados anteriores, se pudieron también interpretar los espectros SERS del complejo AZ-ovoalbúmina, y concluir que es la forma neutra N la responsable de la interacción [38]. En la Fig. 3 se presentan los espectros correspondientes, observándose especialmente en el espectro diferencia (3d) que al formarse el complejo, disminuyen de intensidad las bandas correspondientes a la forma N de la alizarina, si bien hay pequeños cambios de posición debidos a las interacciones intermoleculares resultado de la nueva organización molecular sobre la plata.

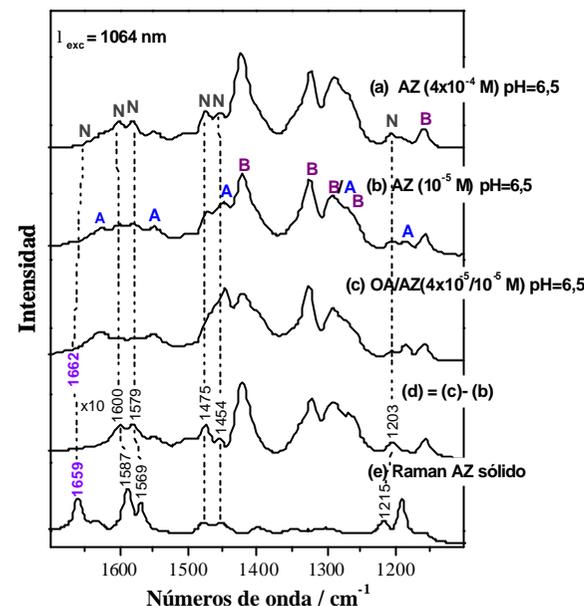


Figura 3. (a, b): Espectros SERS de alizarina sobre coloides de plata de citrato. (c) Espectro SERS del complejo Ovoalbúmina/alizarina (d). Espectro diferencia entre c y b. (e) Espectro Raman de la alizarina sólida. Se indican las condiciones experimentales de concentración y pH.[38] (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

2.1.2 Ácido carmínico

El ácido carmínico (AC) es el agente colorante del carmín que se extrae del cuerpo desecado de la hembra de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), un insecto que vive en las hojas de algunos cactus. Este pigmento es de origen americano y se sabe de su utilización en Méjico y Perú antes de la llegada de Colón. El primer envío de cochinilla a Europa se produjo en 1523, y durante varios siglos la cochinilla fue, junto con el oro y la plata, uno de los materiales más valiosos exportados de América. Su utilidad era la de colorante textil.

De los estudios SERS llevados a cabo siguiendo un protocolo análogo al aplicado para la caracterización de la alizarina, es decir, variando tipo de coloides metálicos (distintos agentes reductores), concentración, pH y utilizando láseres de distintas longitudes de onda [26], se ha podido deducir que la interacción del ácido carmínico con la superficie de plata es más débil que en el caso de la alizarina. En los espectros de absorción UV-vis de AC en agua, se encuentran las formas mono-, di- y trianiónicas del AC, según el valor de pH. De los espectros SERS se infiere que a pH ácido el AC interacciona con la superficie metálica a través de los grupos ceto e hidroxilo en posiciones 1 y 9 de la especie monoaniónica (la numeración de los átomos de los anillos aromáticos es como en la Fig. 1). La segunda ionización parece ocurrir

en posición 1, produciéndose cambios muy claros en los espectros hasta pH 7. Para mayores pH se produce la tercera ionización en las posiciones 2 ó 4. También se pueden explicar las diferencias observadas en los espectros SERS dependiendo de que los coloides sean de citrato o de hidroxilamina, en función de los contraiones presentes en el medio resultantes del proceso de reducción y que modifican las propiedades químico físicas de las superficies. Además, no se observa que ninguna de las especies iónicas muestre resonancia electrónica a las longitudes de onda de los láseres utilizados. La Fig 4 ilustra algunos de los espectros SERS obtenidos que tienen mucha menos riqueza de bandas que los de la alizarina, y son, globalmente, bastante más débiles.

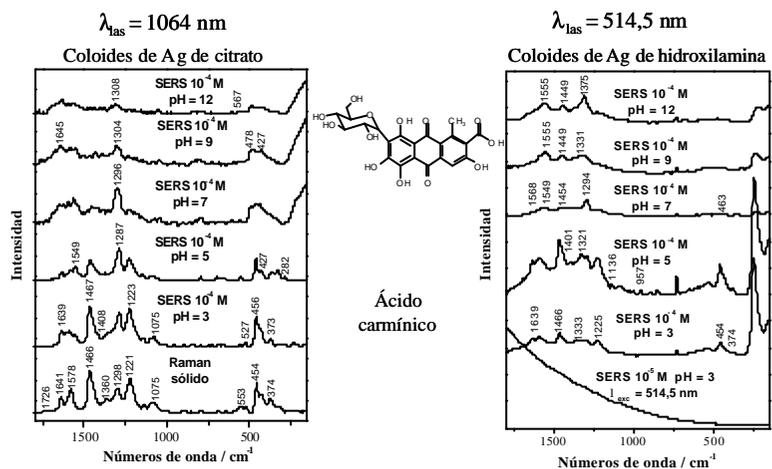


Figura 4. Espectros SERS del ácido carmínico, en las condiciones indicadas, comparados con el espectro Raman del sólido. (Adaptada de [45])

Paralelamente a los estudios SERS de alizarina y ácido carmínico, hemos estudiado otra alternativa para la eliminación de la fluorescencia, de manera que pueda emplearse la espectroscopía Raman convencional para la identificación de pigmentos fluorescentes. Se trata de emplear una matriz polimérica - Zr-Ormosil (*Organic Modified Silicates*) con zirconio en nuestro caso - con una gran afinidad química por las moléculas de los pigmentos orgánicos, lo que da lugar a que estos se incorporen a dicha matriz. Además hemos encontrado que, dado que es mucho mayor la afinidad de la alizarina que la del ácido carmínico por el Zr, este método permite separar selectivamente AZ de AC en una mezcla de ambos, puesto que la primera se incorpora a la matriz mediante la formación de un complejo de la AZ con el Ormosil a través de la interacción con el Zr. Precisamente la identificación de pigmentos orgánicos con estructuras bastante similares en una muestra con mezcla de ellos es uno de los problemas de más difícil solución en el campo de la arqueometría. El estudio de los espectros Raman del complejo y su comparación con los espectros SERS de la alizarina a diferentes pH, permiten concluir que es la forma monoaniónica A de la alizarina la que participa en el complejo AZ-Zr-Ormosil [46].

2.2 SERS de curcuminoides

2.2.1 Curcumina

La curcumina (CU) es un colorante natural procedente de la cúrcuma, especie obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre cultivada principalmente en la India y utilizada desde la antigüedad para diversas aplicaciones, entre ellas como pigmento. Su estructura puede verse en la Fig. 5.

Para la caracterización de los espectros SERS de la curcumina se siguió un protocolo análogo al utilizado para las antraquinonas, identificándose además en este caso sus productos de degradación [32]. La Fig. 5 muestra algunos de los espectros obtenidos. La curcumina se descompone en disolución acuosa al aumentar el pH y la degradación se intensifica en presencia de superficies metálicas nanoestructuradas que catalizan el proceso. Se distinguen dos etapas en la degradación. Mientras que en el espectro SERS a pH 4 aún se reconoce la estructura de bandas a 1600 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de los enlaces C=C de la molécula, a pH 6 se observan bandas asignables a nuevas especies fenólicas más pequeñas y ricas en grupos carboxilato que resultan de la ruptura de la cadena interanillos. En la siguiente etapa, a pH aún mayores, se aprecia la aparición de productos resultado de la polimerización de los anteriores.

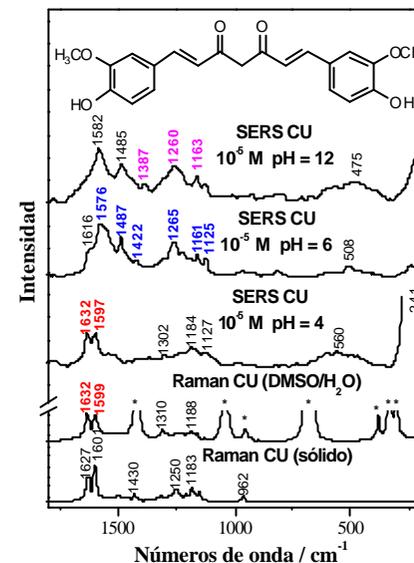


Figura 5. Espectros Raman y SERS de la curcumina en las condiciones indicadas. *: bandas del disolvente DMSO. (Adaptada de [45])

Es muy interesante que seamos capaces de detectar mediante SERS productos de degradación de los pigmentos orgánicos, puesto que la detección de pigmentos

lábil, tales como la curcumina o algunos flavonoides, en muestras reales, es prácticamente imposible si la muestra ha estado expuesta a condiciones en las que los pigmentos se han degradado, lo cual es más que probable. En este caso es la detección de productos de degradación la que nos proporciona información sobre los pigmentos originales.

2.3 SERS de flavonoides

Los flavonoides son polifenoles naturales de origen vegetal cuyo esqueleto carbonoso está formado por dos anillos bencénicos, A y B, unidos por una cadena lineal de tres carbonos, como puede verse en la Fig.6. Se subdividen en categorías o familias (flavonoles, flavonas, etc.) Nosotros hemos estudiado mediante SERS los que se muestran en la Fig. 6. Además de su interés como tintes orgánicos naturales, son muy estimados en el campo de la medicina y la salud por sus propiedades antioxidantes.

Los espectros de absorción Visible-UV de estas moléculas en disolución acuosa presentan dos bandas características: la banda I (300-385 nm) correspondiente al anillo B y la banda II (240-285 nm) correspondiente al anillo A. El perfil espectral de absorción de los flavonoides individuales depende del número y posición de los grupos OH, de modo que se pueden identificar, con bastante precisión, las diferentes familias.

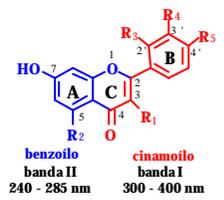
 <p>benzoino banda II 240 - 285 nm</p> <p>cinamoino banda I 300 - 400 nm</p>	Posición de grupos OH
Flavonoles	
Quercetina (QUC)	3, 5, 7, 3', 4'
Fisetina (FIS)	3, 7, 3', 4'
Morina (MOR)	3, 5, 7, 2', 4'
Camferol (KPF)	3, 5, 7, 4'
Galangina (GAL)	3, 5, 7
Flavonas	
Luteolina (LUT)	5, 7, 3', 4'
Apigenina (APG)	5, 7, 4'
Flavanonas	
Taxifolina (TAX) (no C2=C3)	3, 5, 7, 3', 4'
Flavonoles	
Catequina (CAT) (no C2=C3, no C4=O)	3, 5, 7, 3', 4'

Figura 6. Estructura molecular de los flavonoides estudiados mediante espectroscopía SERS

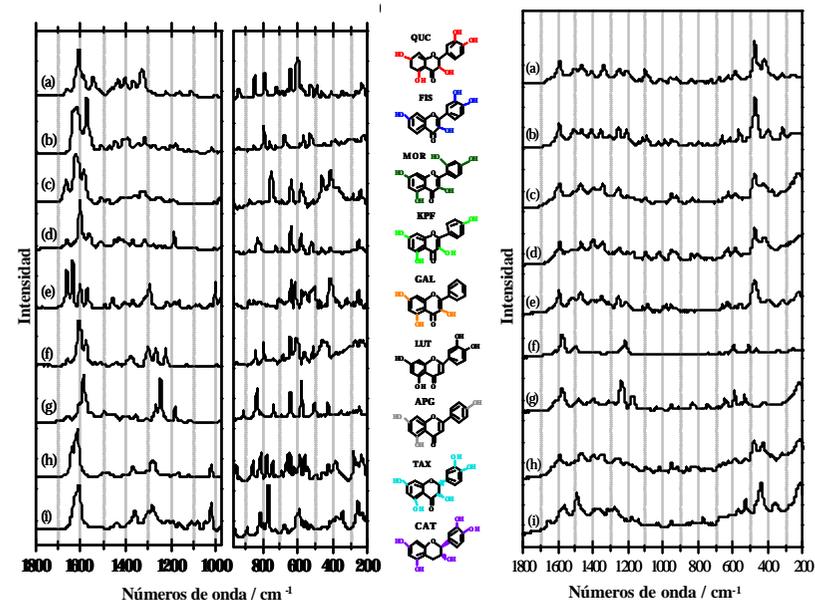


Figura 7. Izquierda: espectros Raman de los flavonoides sólidos (1064 nm). Derecha: espectros SERS de disoluciones 10^{-5} M de los flavonoides, sobre coloides de plata de citrato (785 nm). Normalizados a la banda ~ 1600 cm^{-1} (izquierda, región $1800-1000$ cm^{-1} y derecha.) y ~ 640 cm^{-1} (izquierda, región $950-200$ cm^{-1}).

Para la obtención e interpretación de los espectros SERS de los flavonoides [29, 47, 48] se ha seguido el mismo protocolo de estudio que para los otros pigmentos orgánicos naturales. La Fig. 7 ilustra los espectros Raman y SERS de los flavonoides estudiados. Los espectros Raman en la zona por debajo de 1000 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de esqueleto, de ahí que en esa zona se distingan precisamente la taxifolina y, sobre todo, la catequina del resto, dada su diferente estructura básica (falta de doble enlace entre C2 y C3, y en la catequina, además, ausencia del grupo C4=O). Los espectros Raman de los flavonoides estudiados presentan las mayores diferencias en la zona $1000-1400$ cm^{-1} , que corresponde precisamente a las vibraciones d(O-H) y ν (C-O). Los espectros SERS sobre coloides de Ag difieren mucho de los espectros Raman de los sólidos, lo que pone de manifiesto que los flavonoides sufren cambios en su estructura cuando se adsorben sobre la plata nanoestructurada. El estudio y la asignación de los espectros nos permite identificar dos partes más lábiles en la estructura de los flavonoides: la parte del anillo B con dos grupos OH en posición orto y que es similar al catecol, y el anillo C, especialmente en los casos en que hay un grupo OH en posición a con respecto al grupo ceto. La apigenina no tiene ninguna de estas dos partes más lábiles y es por ello que su degradación sobre las superficies metálicas es menor. El proceso de degradación de los flavonoides que se deduce de sus espectros SERS sobre plata, y que incluye una fase de polimerización de los productos primarios de la degradación,

es similar al previamente observado en nuestro grupo, con la misma técnica SERS, para otros polifenoles, como el catecol o el ácido gálico [49-51]. Y los productos de degradación aquí determinados concuerdan con los que parecen haberse identificado en la foto-oxidación de los flavonoides.

En la Fig. 8 se presentan los espectros SERS de uno de los flavonoides más "fugitivos" (la quercetina) y uno de los más "permanentes" (la luteolina), excitados con distintos láseres. Los cambios observados se deben a que, al igual que ocurría en el caso de la alizarina con los espectros de sus formas aniónicas, aquí son los espectros de los diferentes productos de degradación los que se ven selectivamente intensificados por resonancia electrónica.

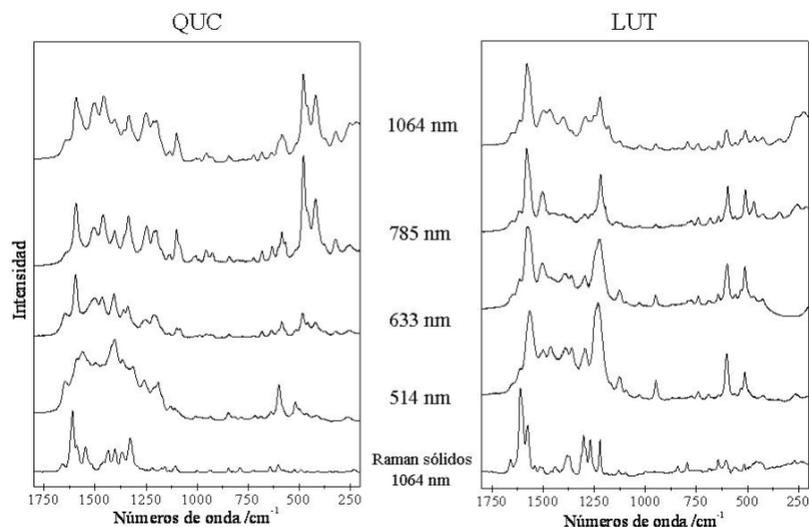


Figura 8. Espectros SERS de quercetina (QUC) y luteolina (LUT) sobre coloides de plata, excitados con láseres a 1064, 785, 633 y 514 nm. Comparación con espectros Raman de los sólidos excitados a 1064 nm. (Adaptada de [45])

Y como ilustración de espectros SERS de PCON sobre distintos coloides, en la Fig. 9 pueden verse los correspondientes a una disolución 10^{-5} M de quercetina, excitados a 1064 nm. Como indicador de la efectividad intensificadora de cada uno de ellos (para la QUC) se ha utilizado la intensidad de la banda a 1104 cm^{-1} relativa a la banda de las tensiones de enlace de todos los grupos OH, a 3500 cm^{-1} (no se muestra aquí). Se eligió dicha banda porque su posición y su perfil espectral se mantienen constantes. De acuerdo con la representación de la parte derecha de la Fig. 9, el coloides de plata de citrato resulta ser el más eficaz, mientras que el de oro de citrato no da intensificación alguna. Como consecuencia de estos resultados, los estudios de los espectros SERS de los flavonoides se realizaron utilizando fundamentalmente coloides AgC y, en algún caso, AgH.

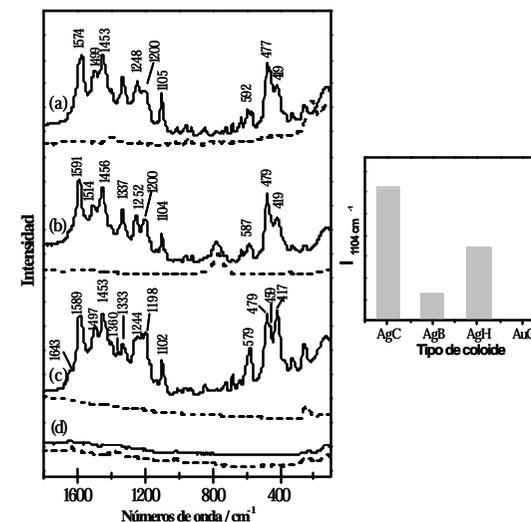


Figura 9. Izquierda: Espectros SERS de quercetina (QUC) 10^{-5} M, a 1064 nm, sobre coloides de plata utilizando distintos reductores: a) citrato (AgC); b) borohidruro (AgB); c) hidroxilamina (AgH). D) coloides de oro con citrato como reductor (AuC). Espectros normalizados a la banda $1574\text{-}1591 \text{ cm}^{-1}$. Los espectros de línea discontinua corresponden a los espectros de los respectivos coloides. Derecha: Intensidad de la banda a 1104 cm^{-1} (relativa a la banda a 3500 cm^{-1}) para los cuatro casos. [48]

Una discusión completa de los espectros SERS de todos los flavonoides estudiados, así como los productos de degradación-polimerización de algunos de ellos que dan lugar a la aparición de bandas en los espectros SERS, puede encontrarse en [48].

2.4 Determinación SERS de antraquinonas y flavonoides en fibras textiles teñidas

La posibilidad de disponer de diferentes muestras "patrón" de fibras textiles (seda, lana, lino) teñidas con antraquinonas o flavonoides, según recetas originales antiguas, nos incitó a intentar la detección SERS de los PCON en dichas fibras utilizando un nuevo método de producción e inmovilización de nanopartículas metálicas que había sido puesto a punto en nuestro grupo, y su utilidad demostrada para detección de AZ en diferentes soportes "probetas de laboratorio" [44]. El reto era, además de adaptar el método para ser aplicado a muestras muy pequeñas de fibras textiles, la detección de los PCON mordentados, es decir, sin llevar a cabo hidrólisis previa del complejo con el mordiente, ni una extracción química del colorante. Tal posibilidad estaba en entredicho, ya que era una opinión bastante extendida entre los investigadores SERS de PCON, que el pigmento unido al metal del mordiente, no daría efecto SERS [35]. La primera detección SERS exitosa de PCON en las fibras sin tratamiento alguno la realizamos en fibras teñidas con

Reseda Luteola L. que contiene flavonoides [23], pasando después a demostrar la utilidad del método para detección de antraquinonas (alizarina en muestras teñidas con *Rubia tinctorum* y en una muestra arqueológica, y ácido carmínico en muestras teñidas con cochinilla) [24]. Asimismo detectamos flavonoides en muestras teñidas con extractos de plantas utilizadas fundamentalmente en América Central y América del Sur. Los resultados obtenidos se presentarán en el apartado 2.4.2, tras describir los espectros SERS de muestras control de PCON.

2.4.1 Dispositivo experimental, y espectros SERS de disoluciones mezclas de PCON

El método de producción e inmovilización de nanopartículas de plata mediante fotorreducción (AgF) con láser a 514 nm, puesto a punto en nuestro laboratorio para ser empleado *en la fibra*, es todavía “bastante artesanal” y se requiere adquirir un buen entrenamiento (con buenas maestras!). Pero los resultados tan satisfactorios que hemos obtenido deben animar a mejorar y estandarizar lo más posible el procedimiento para que pueda llegar a ser aplicado de forma casi rutinaria sobre muestras reales del patrimonio Cultural.

El primer paso consiste en obtener los espectros SERS sobre AgF de PCON en disolución, ya sea de compuestos puros o mezclas, que sirvan como referencias para la subsiguiente identificación de PCON en fibras u otros soportes teñidos. Como ya hemos dicho, los espectros SERS dependen, entre otras cosas, de las propiedades físico-químicas de la interfase que rodea a las nanopartículas metálicas, y esa interfase es distinta si se trata de coloides obtenidos mediante reducción química o de nanopartículas obtenidas mediante fotorreducción. De ahí que, aunque en los apartados anteriores hemos presentado y discutido los espectros SERS de antraquinonas y flavonoides obtenidos sobre coloides preparados con distintos agentes reductores, e incluso aunque se sospeche que los cambios no van a ser espectaculares - como de hecho no lo son -, sea conveniente obtener espectros SERS sobre AgF de disoluciones de los PCON más utilizados y que suelen presentarse juntos (alizarina y purpurina entre las antraquinonas; luteolina y apigenina entre los flavonoides).

El método se basa en la reducción de la Ag^+ de una disolución acuosa de nitrato de plata, mediante irradiación con un láser de Ar^+ a 514 nm focalizado a través de un objetivo 100X en el propio microscopio Raman, acoplado a una cámara de vídeo. Se induce así la radiólisis del agua de la disolución dando lugar a especies activas que, a su vez, inducen la reducción de los iones metálicos. Una vez reducido el metal, se produce el crecimiento de las nanopartículas de plata [44]. En concreto, para los espectros de las disoluciones de PCON se partió de una disolución de nitrato de plata en agua tridestilada, en concentraciones 10^{-3} M o 10^{-2} M. Se llenó la cavidad de un porta-muestras de vidrio con pocillo con la disolución acuosa de nitrato de plata, y se tapó con un cubre-objetos de vidrio. Se dejó reposar durante 20 - 30 minutos para permitir la evaporación del agua de los bordes del cubre, evitando así el posible desplazamiento del mismo sobre el porta y la consiguiente pérdida del enfoque. Después se colocó el porta+cubre en el microscopio, a través del cual se irradió la

disolución con el haz láser a 514.5 nm, enfocando sobre la interfase cubre-disolución, de modo que las nanopartículas de Ag que se van formando quedan inmovilizadas sobre la superficie interna del cubre (como en Fig 12, pero sin colocar la fibra teñida). Para asegurar una mayor reproducibilidad se llevó a cabo un control exhaustivo del foco, sobre todo a tiempos de irradiación elevados, de forma que el láser incidiera siempre sobre la interfase entre la disolución y la superficie del cubre. Los tiempos de exposición al láser se variaron entre 5 y 100 minutos, y la potencia de salida del láser fue de unos 3 mW. A través de la cámara de vídeo se puede seguir la deposición de las nanopartículas de plata, que se ven como puntos brillantes (para los cambios con tiempos de irradiación, ver Fig. 1 de [44]).

El cubre de vidrio con la plata depositada se lavó repetidas veces con agua Milli-Q con objeto de eliminar las sales residuales. A continuación, se llenó la cavidad de otro porta-muestras con la/s disolución/es de los PCON, en las concentraciones que se indican en las Figs. 10 y 11 y se tapó con dicho cubre, con el fin de poner en contacto las nanopartículas de plata con la/s disolución/es problema. Se obtuvieron espectros SERS, con el mismo láser a 514 nm y el mismo objetivo 100 X, en distintos puntos de las nanopartículas, y cada espectro SERS final corresponde al promedio de, al menos, 5 espectros.

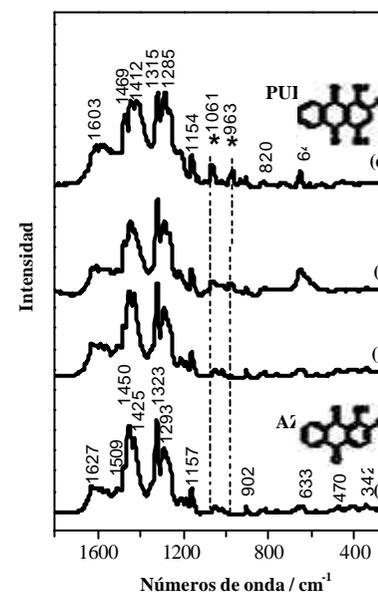


Figura 10. Espectros SERS (514 nm) de disoluciones de control de alizarina (AZ) y purpurina (PUR) sobre nanopartículas de plata obtenidas mediante fotorreducción (514 nm). Disoluciones 10^{-5} M en agua. (a) AZ; (b) mezcla PUR:AZ = 1:1; (c) mezcla PUR:AZ=10:1 y (d) PUR. (*) bandas marcadoras de PUR. Espectros normalizados a la banda ~ 1320 cm^{-1} [24]. (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

En la Fig 10 se ilustran los espectros SERS sobre AgF de disoluciones acuosas de las antraquinonas alizarina y purpurina, puras y en mezclas. El presente espectro de AZ pura se correlaciona muy bien con el obtenido sobre coloides de plata de hidroxilamina a la misma concentración (Fig. 2). Se detectan la forma A, monoaniónica (bandas características a 1627, 1450, 1323, 1047 y 342 cm^{-1}) y la neutra N (bandas a 1582, 1470, 1191 y 470 cm^{-1}). También hay una pequeña contribución de la forma B, dianiónica, identificada por las bandas intensas a 1425 cm^{-1} y $\sim 1270 \text{ cm}^{-1}$. AZ y PUR tienen unas estructuras moleculares muy semejantes (PUR tiene un grupo OH más que AZ) por lo que sus espectros son muy similares. No obstante, se pueden identificar dos bandas de PUR, a 963 y 1061 cm^{-1} , que no se solapan con bandas de AZ y que pueden considerarse como “marcadores” de PUR.

El hecho de que la sección eficaz SERS de AZ a 514 nm sea mucho mayor que la de PUR [18] justifica el que no se vea espectro de PUR en la mezcla 1:1, pero sí en la que hay 10 veces más de PUR que de AZ. Esta diferencia de secciones eficaces hay que tenerla en cuenta cuando se trata de detección SERS de PUR. Por ejemplo, en la Rubia (*Rubia tinctorum*) la relación PUR:AZ determinada por HPLC en un extracto de la planta es 1:1.5. Si tal relación se mantiene en una fibra teñida con Rubia, probablemente se detecte AZ pero no PUR.

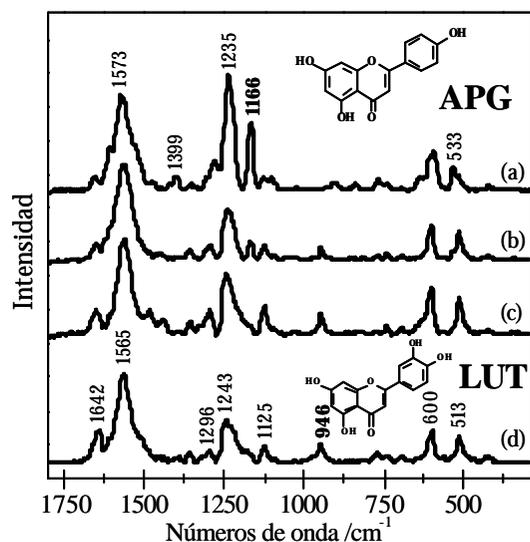


Figura 11. Espectros SERS (514 nm) de disoluciones de control de apigenina (APG) y luteolina (LUT) sobre nanopartículas de plata obtenidas mediante fotorreducción (514 nm). Disoluciones 10^{-5} M en agua. (a) APG; (b) mezcla APG:LUT = 1:1; (c) mezcla APG:LUT = 1:9 y (d) LUT. Espectros normalizados a la banda $\sim 1565\text{-}1573 \text{ cm}^{-1}$ y corregida la línea base [23]. (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

En la Fig. 11 se presentan los espectros SERS sobre AgF de disoluciones acuosas de los flavonoides apigenina (APG) y luteolina (LUT), puros y en mezclas. Estos espectros SERS sobre AgF presentan una mayor semejanza con los espectros Raman de APG y LUT sólidas que los espectros SERS sobre coloides de Ag, y, pese a que sus estructuras moleculares son muy similares, pueden identificarse algunas bandas que sirvan como marcadores. Así, el espectro SERS de APG se caracteriza por dos bandas intensas a 1235 y 1166 cm^{-1} , pero únicamente la de 1166 cm^{-1} puede considerarse como marcador de APG porque no se solapa con bandas de LUT. Por su parte, la banda de 946 cm^{-1} de la LUT, que no solapa con bandas de APG, puede considerarse marcador de LUT. Se pueden seguir estas dos bandas en la mezcla 1:1, donde las características de LUT predominan sobre las de APG. Aparentemente, la sección eficaz SERS de LUT es mayor que la de APG. Como en el caso de las antraquinonas, este hecho ha de tenerse en cuenta porque quizás impida la detección SERS de APG. Así, en la gualda (*Reseda Luteola*) la relación LUT:APG es 9:1, como en la Fig. 11c, en la que las bandas de APG están prácticamente ausentes.

2.4.2 Espectros SERS en muestras patrón y en una muestra arqueológica

En la Fig. 12 se ilustra la adaptación del método de producción e inmovilización de AgF para que queden inmovilizadas sobre la fibra teñida. La muestra de fibra teñida (filamento de unas pocas micras de grosor) se sujeta a un cubre, que se coloca sobre el pocillo de un porta que tiene la solución de nitrato de plata 10^{-3} M. El haz láser se enfoca, a través del objetivo 100X, en la interfase fibra/disolución/cubre, de manera que las nanopartículas de Ag (NPs) queden inmovilizadas sobre la fibra.

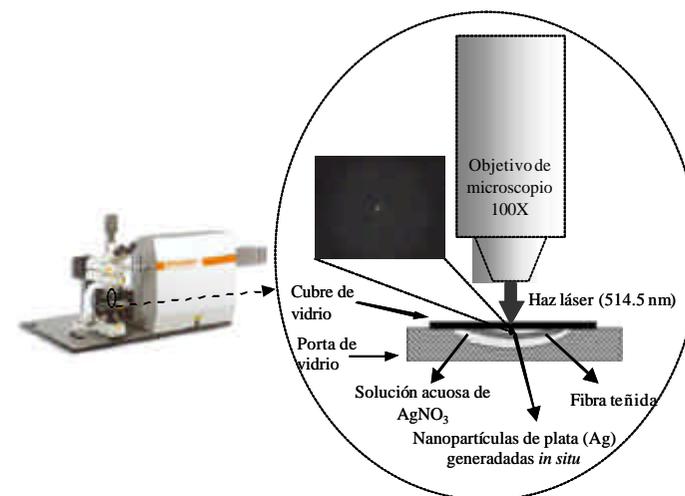


Figura 12. Microscopio Raman y esquema experimental de la producción de nanopartículas de plata mediante fotorreducción con láser de una disolución de nitrato de plata en la que se sumerge la fibra teñida. El mismo láser se utiliza posteriormente en el experimento SERS. En el cuadrado negro, micrografía correspondiente a la imagen visible a través del objetivo, en la que se aprecia el punto brillante correspondiente a las nanopartículas de plata formadas.[45]

El método que dio lugar a los mejores resultados SERS es el siguiente: primero, se enfocó el haz láser por encima de la fibra en la superficie interior del cubre-objetos, creándose las NPs. Una vez formadas las NPs, el haz del láser se enfocó en la parte más profunda del “cluster” de NPs formadas acercando el foco hacia la fibra pero evitando el contacto directo con la misma. Eso supone buscar filamentos de la fibra que no estén ni muy cerca ni muy lejos de la superficie interna del cubre-objetos. Una vez formadas e inmovilizadas las AgF, se registraron los espectros SERS en varios puntos, como en el caso de las disoluciones.

Las muestras “patrón” que hemos estudiado (fibras textiles teñidas) pertenecen a los Proyectos Europeos, catálogos y colecciones que aparecen en la Tabla 1.

Proyecto/colección	Textil	Mordiente ^a	Origen	Recetas	PCON
M.N. Vacher ¹	Lino, lana	Alumbre	Rubia Cochinilla	Mediterráneas tradicionales	Antraquinonas
EU-MODHT ²	Lana	Alumbre	Gualda	Inglesas, siglo XVIII	Flavonoides
Ana Roquero ³	Lana	Alumbre	Varios ⁴	Americanas precolombinas	Antraquinonas Flavonoides
EU-Artech ⁵	Seda, lana	Alumbre	Gualda	Holandesas, siglo XVII ⁶	Flavonoides

Tabla 1. Características de las fibras patrón teñidas en las que hemos determinado mediante SERS, con nanopartículas de plata producidas *en la fibra* por fotorreducción con láser, los PCON de los correspondiente tintes. ¹www.tallertextiltriste.com; ²www.hrp.org.uk/aboutus/whatwedo/collectionscare/monitoringthedamagetohistorictapestries.aspx; ³[52]; ⁴descripción en el texto; ⁵www.eu-artech.org; ⁶www.organic-colorants.org.

Si bien en todos los casos el mordiente utilizado fue alumbre, había diferencias en las recetas de unos casos a otros ya que en algunas muestras se utilizó además potasa, en otras había mezcla de tintes (por ejemplo, con índigo), en otros casos se utilizaron adicionalmente sales de hierro, etc. Estas variaciones en los métodos de tinción, no afectan a los espectros SERS de los PCON mordentados que obtuvimos *en las fibras*, como quedará patente en las siguientes figuras.

En cuanto a la muestra arqueológica M1, es de un tejido copto de lana y lino encontrado en una excavación en Egipto, y datado entre los siglos VI-VIII, perteneciente a la colección del Museo de Artes Decorativas de España, N° Inventario MTIB 36403 (ver Fig. 3 de [24] en colores). La decoración estilo tapicería representa animales estilizados en color rojo pardo. La muestra estudiada corresponde a la decoración. También se trataron de identificar pigmentos en la muestra M2, de otro tejido copto (N° Inventario MTIB 28162), perteneciente a la misma colección. Tanto las muestras arqueológicas como las fibras patrón, fueron estudiadas sin ser sometidas previamente a limpieza alguna.

2.4.2.1 Fibras teñidas con antraquinonas

En la Fig. 13 pueden verse los espectros SERS sobre AgF, a 514 nm, de fibras de diferentes materiales teñidas con Rubia, utilizando diferentes recetas, así como de las dos muestras arqueológicas, y de una disolución de AZ sobre AgF para una más fácil comparación.

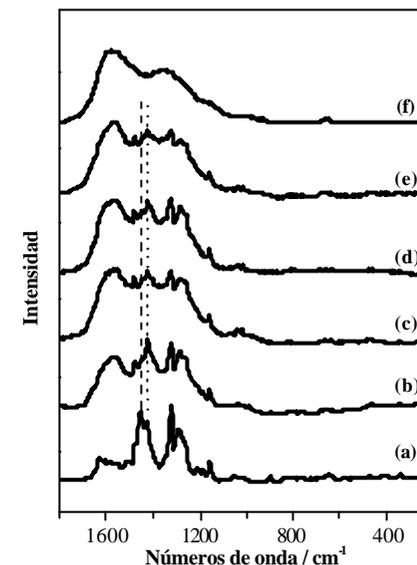


Figura 13. Espectros SERS (514 nm) sobre nanopartículas de plata obtenidas mediante fotorreducción (514 nm). (a) AZ en disolución 10^{-5} M (como Fig 10a); (b) fibra de lana teñida con Rubia, con alumbre como mordiente; (c) fibra de lino teñida con Rubia, con alumbre como mordiente y añadiendo sulfato de hierro; (d) fibra de lino teñida con Rubia e índigo; (e) muestra M1 (tejido Copto 36403); (f) muestra M2 (tejido Copto 28162), en donde únicamente se observa espectro de carbón amorfo. La línea de puntos indica la banda a 1425 cm^{-1} de la forma dianiónica de la AZ. La línea de trazos indica la banda a 1450 cm^{-1} de la forma monoaniónica de la AZ. Espectros normalizados a la banda a 1290 cm^{-1} y ligera corrección de la línea base [24] (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

Los dos componentes tintóreos principales de la Rubia son la alizarina y la purpurina. En los espectros SERS de las fibras (excepto en la muestra M2) se detecta el correspondiente a AZ, superpuesto al espectro Raman de carbono amorfo (Fig. 13f), este último fácilmente reconocible por sus dos bandas muy anchas características centradas a 1590 y 1300 cm^{-1} , aproximadamente. La presencia de carbón amorfo se debe a fotodegradación de materia orgánica en la superficie de la fibra, que no significa que la fibra se haya “quemado” con el láser, lo cual se vería en el microscopio si ocurriera. Ya hemos dicho que las fibras se utilizaron sin limpieza previa y por lo tanto, y más las provenientes de una excavación arqueológica, están

cubiertas de materia orgánica. En el caso de la muestra M2, los conservadores mencionaban el mal estado de la pieza de la que se tomó la muestra. Cuando tratamos de hacer la fotorreducción del nitrato de plata sobre ella, el carbón amorfo inicialmente formado sobre la fibra impidió la posterior inmovilización de las nanopartículas de Ag sobre la fibra y, por lo tanto, no se obtuvo espectro SERS de la misma, viéndose únicamente el espectro Raman del carbón amorfo. En las otras fibras, sí fue posible la inmovilización de las nanopartículas de Ag y, aunque también se detecta algo de C amorfo, afortunadamente la zona más intensa de 1500-1650 cm^{-1} no es crucial para la identificación de AZ (Fig. 13a). Respecto del espectro SERS de AZ observado en el resto de las fibras (Fig 13b-d), al comparar con el espectro de AZ en disolución se observa un marcado aumento de la intensidad de la banda a 1425 cm^{-1} (correspondiente a la forma dianiónica B de AZ) frente a la intensidad de la banda a 1450 cm^{-1} (correspondiente a la forma monoaniónica A de AZ). Como la forma B, que es la que participa en el quelato que la AZ forma con los iones Al^{3+} del mordiente (alumbre), no es tan resonantemente excitada por el láser a 514 nm como lo es la forma A, el aumento de intensidad de la banda asignable a la forma B debe atribuirse a que estamos detectando “el colorante mordentado” que está en la fibra. Esto echa por tierra la hipótesis de algunos investigadores [35] relativa a que los PCON mordentados no darían efecto SERS.

Puede verse que los espectros SERS obtenidos no dependen ni del material de la fibra (lana, lino), ni de los aditivos (sales de hierro, otro colorante), por lo que puede concluirse que se trata de un buen procedimiento de detectar AZ en fibras textiles teñidas.

No se observa PUR en ninguna de las fibras teñidas con Rubia. Como ya dijimos anteriormente, la menor sección eficaz SERS de la PUR comparada con la AZ apunta a la “no detección” SERS de PUR. Por otra parte, y aunque parece que el mordiente fija más la PUR en las fibras masivas (*bulk*), no se puede excluir la posibilidad de que AZ y PUR se fijen de modo diferente a la superficie de las mismas, y es ahí, en la superficie de las fibras, donde estamos realizando la detección SERS.

En cuanto a la muestra arqueológica M1 (Fig. 13e), se detecta inequívocamente AZ, lo cual es consistente con el empleo habitual de *Rubia tinctorum* en las fechas en que está datado el tejido copto correspondiente.

La Fig. 14 presenta los espectros SERS sobre AgF de una disolución de ácido carmínico, y de fibras de diferentes materiales teñidas con cochinilla. Las bandas intensas a ~ 1450 y 1310 cm^{-1} y las débiles a 750 y 450 cm^{-1} se observan también en los espectros SERS de AC en coloides de Ag de hidroxilamina (ver Fig. 2). Estas bandas, y otra $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$, aparecen aquí superpuestas a un fondo de espectro Raman de C amorfo, incluso en el AC en disolución, lo que indica una fotodegradación parcial del AC en presencia de las AgF. En el apartado 2.1.2 se dió una explicación de los caminos de deprotonación del AC, observándose como su espectro SERS presenta cambios muy considerables dependiendo de las condiciones experimentales. Comparando los espectros de la Fig. 14, y teniendo en cuenta que las

bandas a 1450 , 750 y 450 cm^{-1} disminuyen al bajar el pH, concluimos que las pequeñas diferencias en intensidades relativas observadas en (d) - fibra teñida con cochinilla e índigo - son debidas a la diferente acidez de la superficie de dicha fibra, probablemente por la existencia de un segundo colorante, el índigo.

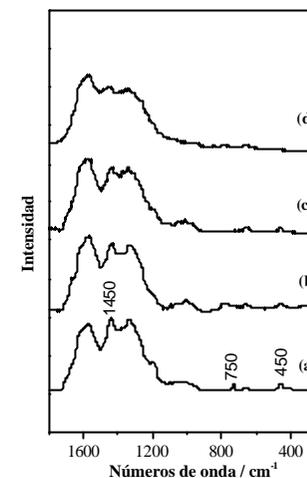


Figura 14. Espectros SERS (514 nm) sobre nanopartículas de plata obtenidas mediante fotorreducción (514 nm). (a) ácido carmínico en disolución $3 \times 10^{-4} \text{ M}$; (b) fibra de lana teñida con cochinilla; (c) fibra de lino teñida con cochinilla; (d) fibra de lino teñida con cochinilla e índigo. En todos los casos se ha utilizado alumbre como mordiente. Espectros normalizados a la banda a 1560 cm^{-1} y ligera corrección de línea base [24]. (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

2.4.2.2 Fibras teñidas con flavonoides

Hemos trabajado con dos tipos de fibras teñidas con flavonoides: I) fibras de seda o lana teñidas con gualda (*Reseda luteola*) según recetas originales europeas (Holanda siglo XVII, Inglaterra siglo XVIII), y II) fibras de lana teñidas según recetas artesanales pre-colombinas con plantas fundamentalmente utilizadas en Centroamérica y América del Sur: retama de tintoreros (*Genista tinctoria L.*); cáscara de cebolla (*Allium cepa*); chilca (*Baccharis sp.*) y fustete viejo (*Clorophora tinctoria L. Gaud.*).

I) Los principales flavonoides de la gualda son la apigenina y la luteolina. En la Fig. 15 se presentan los espectros de las fibras teñidas con gualda. En los espectros Raman, excitando a 514 nm, únicamente se ve fluorescencia (a y d). Los espectros Raman excitando a 785 nm, presentan bandas que corresponden a la seda (c) y lana (f) de las fibras, respectivamente. Pero, en presencia de AgF, y excitando a 514 nm, los espectros que se obtienen corresponden a los espectros SERS de los flavonoides de la gualda, y no se detecta nada de las proteínas de la seda o la lana. Hay una

intensificación SERS de las bandas de los flavonoides, que debe atribuirse a la formación de un complejo de transferencia de carga entre los flavonoides y la Ag, que no tiene lugar entre las proteínas y la Ag. Un análisis detallado de los espectros revela la presencia de LUT en ambas fibras, y un contenido “aparentemente” mayor de APG en la fibra de seda que en la de lana, basado en la intensidad de la banda marcadora de APG a 1166 cm^{-1} : es muy intensa en la fibra de seda (Fig. 15b), mientras que apenas se distingue en el caso de la fibra de lana (Fig. 15e). En principio, se diría que APG y LUT se fijan de diferente manera a la seda y a la lana. Pero, cuando otros investigadores han llevado a cabo una extracción química y análisis HPLC (Tabla 1⁶), determinan que el extracto en ambos materiales contiene 9(LUT):1(APG), que coincide con la relación de esos flavonoides en la gualda. Una posible explicación al hecho de que nuestros espectros SERS *en la superficie de la fibra* demuestren cantidades distintas de APG en seda y en lana, se basaría en que, dada la distinta estructura de estos materiales, existe también una diferente afinidad de los flavonoides por las diferentes partes de las cadenas polipeptídicas, que da lugar a una fijación no uniforme de los mismos en la superficie de las fibras.

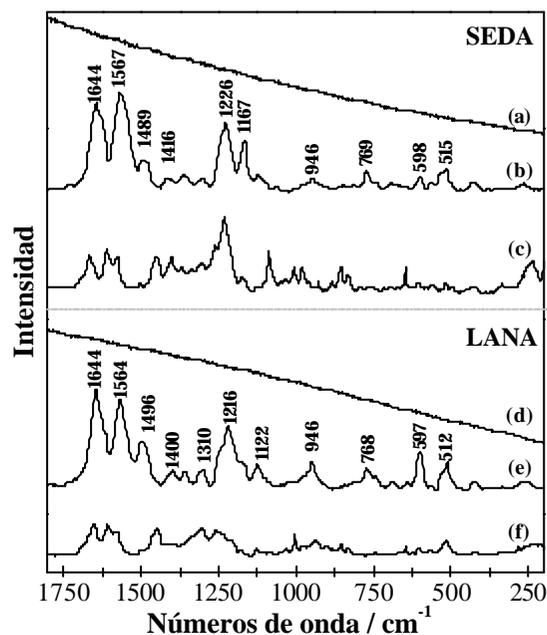


Figura 15. Espectros Raman (láser a 514nm) de fibras de seda (a) y lana (d) teñidas con gualda. (c) y (f): espectros Raman de las mismas fibras con láser a 785 nm. (b) y (e): espectros SERS de las mismas fibras (láser a 514 nm) sobre nanopartículas de plata producidas por fotorreducción (514 nm) *en la fibra*. Espectros normalizados a la banda a $1564\text{-}1567\text{ cm}^{-1}$. Los espectros SERS están corregidos de línea base [23]. (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

II) Los principales componentes (en orden decreciente) de las plantas que se han utilizado para teñir las fibras aquí estudiadas son: a) *Genista tinctoria L.*: luteolina y genisteína; b) *Allium cepa*: quercetina, camferol, isoramnetina y miricetina; c) *Baccharis sp.*: luteolina y apigenina; d) *Clorophora tinctoria L. Gaud.*: morina, camferol y maclaurina. Las correspondientes estructuras moleculares se dan en las Figs. 6 y 16. En a) y c) predominan las flavonas, y en b) y d) los flavonoles.

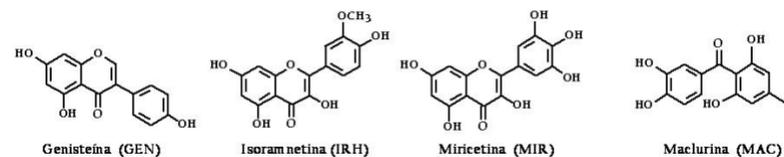


Figura 16. Estructuras de los compuestos que, junto con algunos de los flavonoides descritos en la Fig 6, están presentes como componentes principales en los colorantes de las fibras teñidas según recetas pre-colombinas. La genisteína (GEN) es isoflavona, la isoramnetina (IRH) y la miricetina (MIR) pertenecen al grupo de los flavonoles. La maclaurina (MAC) es una benzofenona (no flavonoide).

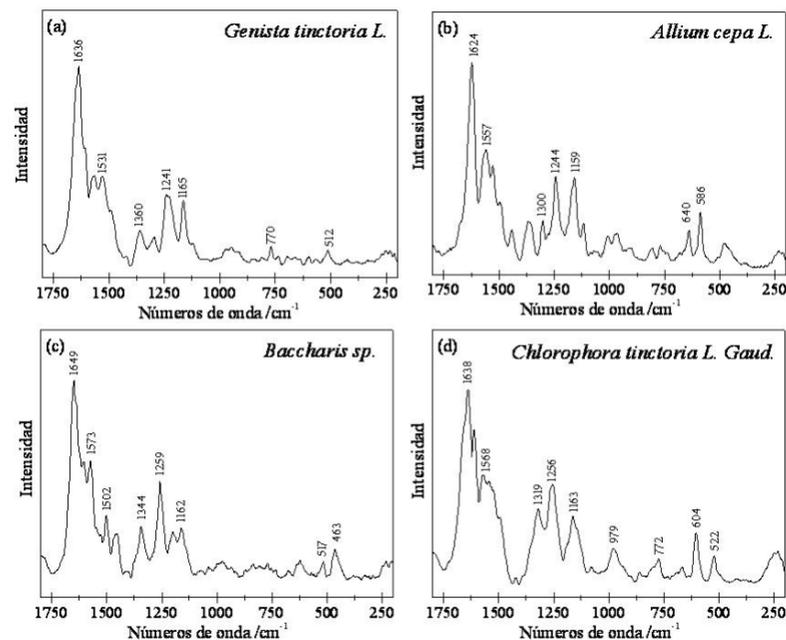


Figura 17. Espectros SERS (514 nm) con nanopartículas de plata producidas mediante fotorreducción de fibras de lana teñidas con recetas artesanales pre-colombinas, con alumbre como mordiente [52]. Plantas utilizadas para teñir: (a) hojas y flores de retama de tintoreros (*Genista tinctoria L.*); (b) cáscara de cebolla (*Allium cepa*); (c) chilca (*Baccharis sp.*); (d) fustete viejo (*Clorophora tinctoria L. Gaud.*). [24] (Adaptada y reproducida con permiso de John Wiley and Sons)

En la Fig. 17 pueden verse los espectros SERS sobre AgF de las fibras teñidas con dichas plantas. Dado que la GEN tiene una estructura muy similar a la APG, estimamos que sus espectros serán bastante similares. Así, los espectros de las Figs. 17a y 17c comparan muy satisfactoriamente con los de la Fig. 11 (APG y LUT), y se pueden identificar bandas marcadoras de LUT a 950, 600 y 520 cm^{-1} , y de APG a $\sim 1165 \text{ cm}^{-1}$. Los flavonoles, mayoritarios en los casos (b) y (d), son mucho más proclives a degradarse en presencia de Ag que las flavonas, dando lugar a productos de condensación (que tienen bandas SERS relativamente intensas en la zona 400-500 cm^{-1}) y, por lo tanto, su identificación individualizada es más problemática. No obstante, la comparación de los espectros 17b y 17d con los SERS a 514 nm de QUC [47], MOR y KPF [48], así como la presencia de bandas relativamente intensas en la zona 400-500 cm^{-1} , permiten confirmar la presencia de flavonoles en las correspondientes fibras teñidas. La región espectral 1500-1600 cm^{-1} es bastante similar en los casos a-d. Se corresponde con las vibraciones características de los grupos funcionales más directamente implicados en el complejo con los iones Al^{3+} del alumbre utilizado como mordiente. Creemos que, como en el caso de las fibras teñidas con antraquinonas, el complejo colorante-mordiente contribuye en gran manera a los espectros SERS que detectamos con nuestro método.

3. Resumen y conclusiones

A la vista de la historia y situación actual de la aplicación de la espectroscopía SERS a la detección de pigmentos y colorantes orgánicos naturales (PCON) de interés en obras del Patrimonio Cultural, presentada en el apartado 1 de este capítulo, y de los resultados de nuestro grupo de investigación en Madrid, más extensamente discutidos en el apartado 2, parece oportuno concluir que dicha técnica tiene un prometedor futuro en los departamentos de conservación y restauración de Museos y Bibliotecas. Hasta ahora se ha demostrado su tremenda utilidad, precisamente en situaciones en las que las técnicas habituales de identificación de PCON no son aplicables (muy poca cantidad de muestra, *in situ*, no tratamiento previo), pero hay todavía mucho trabajo a realizar, especialmente en lo relativo a estandarización de métodos, de manera que su aplicación a objetos de Patrimonio Cultural llegue a ser de aplicación mucho más amplia que lo es en la actualidad.

Agradecimientos

Agradecemos al MICINN (Proyectos FIS2007-63065 y CONSOLIDER CSD 2007-0058) y a la Comunidad de Madrid (MICROSERES, S2009TIC-1476) por la financiación parcial de los trabajos aquí expuestos. Agradecemos también el apoyo recibido de la Red Temática de Patrimonio Histórico y Cultural (CSIC). MVC y EdP agradecen al CSIC y al FSE 2007-2013 la concesión de sus respectivos Contratos post- y predoctoral.

Referencias

1. P. Vandenabeele, H.G.M. Edwards, L. Moens, A Decade of Raman Spectroscopy in Art and Archaeology, *Chemical Reviews* **107** (2007), 675-686.
2. G. Bitossi, R. Giorgi, M. Mauro, B. Salvadori, L. Dei, Spectroscopic techniques in Cultural Heritage Conservation: A Survey, *Applied Spectroscopy Reviews* **40** (2005), 187-228.
3. M. Fleischmann, P. J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman-Spectra of Pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* **26** (1974), 163-166.
4. E. de Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U. A. T. Brinkman, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A* **1112** (2006), 31-63.
5. E. Rosenberg, Characterisation of historical organic dyestuffs by liquid chromatography - mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391** (2008), 33-57.
6. X. Zhang, R. Boytner, J. L. Cabrera, R. Laursen, Identification of yellow dye types in pre-Columbian Andean textiles, *Analytical Chemistry* **79** (2007), 1575-1582.
7. L. Burgio, R. J. H. Clark, Library of FT-Raman spectra of pigments, minerals, pigment media and varnishes, and supplement to existing library of Raman spectra of pigments with visible excitation, *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57** (2001), 1491-1521.
8. L. B. Brostoff, S. A. Centeno, P. Ropret, P. Bythrow, F. Pottier, Combined X-ray Diffraction and Raman Identification of Synthetic Organic Pigments in Works of Art: From Powder Samples to Artists' Paints, *Analytical Chemistry* **81** (2009), 6096-6106.
9. P. Ropret, S. A. Centeno, P. Bukovec, Raman identification of yellow synthetic organic pigments in modern and contemporary paintings: Reference spectra and case studies, *Spectrochimica Acta Part A -Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **69** (2008), 486-497.
10. N. C. Scherrer, Z. Stefan, D. Francoise, F. Annette, K. Renate, Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection, *Spectrochimica Acta Part aMolecular and Biomolecular Spectroscopy* **73** (2009), 505-524.
11. F. Schulte, K. W. Brzezinka, K. Lutzenberger, H. Stege, U. Panne, Raman spectroscopy of synthetic organic pigments used in 20th century works of art, *Journal of Raman Spectroscopy* **39** (2008), 1455-1463.
12. H. G. M. Edwards, L. F. C. de Oliveira, M. Nesbitt, Fourier-transform Raman characterization of brazilwood trees and substitutes, *Analyst* **128** (2003), 82-87.
13. I. Osticioli, A. Zoppi, E. M. Castellucci, Fluorescence and Raman spectra on painting materials: reconstruction of spectra with mathematical methods, *Journal of Raman Spectroscopy* **37** (2006), 974-980.
14. F. Rosi, M. Paolantoni, C. Clementi, B. Doherty, C. Miliani, B. G. Brunetti, A. Sgamellotti, Subtracted shifted Raman spectroscopy of organic dyes and lakes, *Journal of Raman Spectroscopy* **41** (2010), 452-458.
15. B. Guineau, V. Guichard, Identification des colorants organiques naturels par microspectrometrie Raman de resonance et par effect Raman exalte de surface (S.E.R.S.), en Preprints of 8th Triennial Meeting Identification des colorants organiques naturels par microspectrometrie Raman de resonance et par effect Raman exalte de surface (S.E.R.S.) of ICOM Committee for Conservation, Sydney, Australia, 6-11 September, 1987, The Getty Conservation Institute, Marina del Rey, CA, p. 659-666
16. S. SanchezCortes, D. Jancura, P. Miskovsky, A. Bertoluzza, Near infrared surface-enhanced Raman spectroscopic study of antiretrovirally drugs hypericin and emodin in aqueous silver colloids, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53** (1997), 769-779.

17. M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Surface-enhanced Raman scattering study of the adsorption of the anthraquinone pigment alizarin on Ag nanoparticles, *Journal of Raman Spectroscopy* **35** (2004), 921-927.
18. Q. T. Shadi, B. Z. Chowdhry, M. J. Snowden, R. Withnall, Semi-quantitative analysis of alizarin and purpurin by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) using silver colloids, *Journal of Raman Spectroscopy* **35** (2004), 800-807.
19. C. L. Brosseau, K. S. Rayner, F. Casadio, C. M. Grzywacz, R. P. Duyne, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A Direct Method to Identify Colorants in Various Artist Media, *Analytical Chemistry* **81** (2009), 7443-7447.
20. M. Leona, Microanalysis of organic pigments and glazes in polychrome works of art by surface-enhanced resonance Raman scattering, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (2009), 14757-14762.
21. K. L. Wustholz, C. L. Brosseau, F. Casadio, R. P. Van Duyne, Surface-enhanced Raman spectroscopy of dyes: from single molecules to the artists' canvas, *Physical Chemistry Chemical Physics* **11** (2009), 7350-7359.
22. C. L. Brosseau, A. Gambardella, F. Casadio, C. M. Grzywacz, J. Wouters, R. P. Van Duyne, Ad-hoc Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Methodologies for the Detection of Artist Dyestuffs: Thin Layer Chromatography-Surface Enhanced Raman Spectroscopy and in Situ On the Fiber Analysis, *Analytical Chemistry* **81** (2009), 3056-3062.
23. Z. Jurasekova, C. Domingo, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, In situ detection of flavonoids in weld-dyed wool and silk textiles by surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Raman Spectroscopy* **39** (2008), 1309-1312.
24. Z. Jurasekova, E. del Puerto, G. Bruno, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, C. Domingo, Extractionless non-hydrolysis surface-enhanced Raman spectroscopic detection of historical mordant dyes on textile fibers, *Journal of Raman Spectroscopy* (2010), DOI: 10.1002/jrs.2651.
25. R. Mukhopadhyay, The art of Raman, *Chemistry World* **7** (2010), 44-47.
26. M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Surface-enhanced Raman scattering study of the anthraquinone red pigment carminic acid, *Vibrational Spectroscopy* **40** (2006), 161-167.
27. M. V. Cañamares, M. Leona, Surface-enhanced Raman scattering study of the red dye laccaic acid, *Journal of Raman Spectroscopy* **38** (2007), 1259-1266.
28. C. Corredor, T. Teslova, M. V. Canamares, Z. G. Chen, J. Zhang, J. R. Lombardi, M. Leona, Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin, *Vibrational Spectroscopy* **49** (2009), 190-195.
29. Z. Jurasekova, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids, *Journal of Raman Spectroscopy* **37** (2006), 1239-1241.
30. T. Teslova, C. Corredor, R. Livingstone, T. Spataru, R. L. Birke, J. R. Lombardi, M. V. Canamares, M. Leona, Raman and surface-enhanced Raman spectra of flavone and several hydroxy derivatives, *Journal of Raman Spectroscopy* **38** (2007), 802-818.
31. M. F. Wang, T. Teslova, F. Xu, T. Spataru, J. R. Lombardi, R. L. Birke, M. Leona, Raman and surface enhanced Raman scattering of 3-hydroxyflavone, *Journal of Physical Chemistry C* **111** (2007), 3038-3043.
32. M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, Degradation of curcumin dye in aqueous solution and on Ag nanoparticles studied by ultraviolet-visible absorption and surface-enhanced Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy* **60** (2006), 1386-1391.
33. M. Leona, J.R. Lombardi, Identification of berberine in ancient and historical textiles by surface-enhanced Raman scattering, *Journal of Raman Spectroscopy* **38** (2007), 853-858.
34. M.V. Cañamares, J.R. Lombardi, M. Leona, Surface-enhanced Raman scattering of protoberberine alkaloids, *Journal of Raman Spectroscopy* **39** (2008), 1907-1914.
35. M. Leona, J. Stenger, E. Ferloni, Application of surface-enhanced Raman scattering techniques to the ultrasensitive identification of natural dyes in works of art, *Journal of Raman Spectroscopy* **37** (2006), 981-992.
36. A. V. Whitney, R. P. Van Duyne, F. Casadio, An innovative surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) method for the identification of six historical red lakes and dyestuffs, *Journal of Raman Spectroscopy* **37** (2006), 993-1002.
37. M. V. Cañamares, M. Leona, M. Bouchard, C. M. Grzywacz, J. Wouters, K. Trentelman, Evaluation of Raman and SERS analytical protocols in the analysis of Cape Jasmine dye (*Gardenia augusta L.*), *Journal of Raman Spectroscopy* **41** (2010), 391-397.
38. M. V. Cañamares, P. Sevilla, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, Surface-enhanced Raman scattering study of the interaction of red dye alizarin with ovalbumin, *Biopolymers* **82** (2006), 405-409.
39. S. A. Centeno, J. Shamir, Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art, *Journal of Molecular Structure* **873** (2008), 149-159.
40. E. Van Elslande, S. Lecomte, A. S. Le Ho, Micro-Raman spectroscopy (MRS) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) on organic colourants in archaeological pigments, *Journal of Raman Spectroscopy* **39** (2008), 1001-1006.
41. K. Chen, M. Leona, K. C. Vo-Dinh, F. Yan, M. B. Wabuye, T. Vo-Dinh, Application of surface-enhanced Raman scattering (SERS) for the identification of anthraquinone dyes used in works of art, *Journal of Raman Spectroscopy* **37** (2006), 520-527.
42. K. Chen, K. C. Vo-Dinh, F. Yan, M. B. Wabuye, T. Vo-Dinh, Direct identification of alizarin and lac dye on painting fragments using surface-enhanced Raman scattering, *Analytica Chimica Acta* **569** (2006), 234-237.
43. A. V. Whitney, F. Casadio, R. P. Van Duyne, Identification and characterization of artists' red dyes and their mixtures by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Applied Spectroscopy* **61** (2007), 994-1000.
44. M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, J. D. Gomez-Varga, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, Ag nanoparticles prepared by laser photoreduction as substrates for in situ surface-enhanced Raman scattering analysis of dyes, *Langmuir* **23** (2007), 5210-5215.
45. Z. Jurasekova, M.V. Cañamares, S. Sánchez-Cortés, C. Domingo, J.V. García-Ramos, Aplicaciones de la espectroscopía Raman intensificada por superficies metálicas nanoestructuradas (SERS) a la determinación de pigmentos y tintes orgánicos de interés en el Patrimonio Cultural en *La Investigación sobre Patrimonio Cultural*, C. Sáiz y M.A. Rogerio, Eds., Red Temática del CSIC de Patrimonio Histórico y Cultural, Sevilla, 2008, p. 169-181. ISBN: 978-84-691-0049-3.
46. S. Murcia-Mascarós, C. Domingo, S. Sanchez-Cortes, M. V. Cañamares, J. V. Garcia-Ramos, Spectroscopic identification of alizarin in a mixture of organic red dyes by incorporation in Zr-Ormosil, *Journal of Raman Spectroscopy* **36** (2005), 420-426.
47. Z. Jurasekova, C. Domingo, J.V. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes, Vibrational Spectroscopy as an analytical tool in the identification and characterization of natural dyes employed in the Cultural Heritage, *Coalition* **14** (2007), 14-21.
48. Z. Jurasekova, Espectroscopías ópticas sobre superficies metálicas nanoestructuradas aplicadas al estudio de flavonoides: Pigmentos amarillos de interés en el Patrimonio Histórico Cultural, Tesis Doctoral, 2009, UNED.
49. M.C. Alvarez-Ros, S. Sánchez-Cortés, O. Francioso, J.V. García-Ramos, Catalytic modification of gallic acid on a silver surface studied by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy* **32** (2001), 143-145.

50. S. Sánchez-Cortés, O. Francioso, J.V. García-Ramos, C. Ciavatta, C. Gessa, Catechol polymerization in the presence of silver surface, *Colloids and Surfaces. A: Physicochemical and Engineering Aspects* **176** (2001), 177-184.
51. S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, Adsorption and Chemical Modification of Phenols on a Silver Surface, *Journal of Colloid and Interface Science* **231** (2000), 98-106.
52. A. Roquero, *Tintes y tintoreros de América: catálogo de materias primas y registro etnográfico de México, Centro América, Andes Centrales y Selva amazónica*, Ministerio de Cultura de España, Madrid, 2006, ISBN: 848181282X.